

## PROTOCOLO DE AULA PRÁTICA

**CURSO:** Biotecnologia

**Unidade Curricular:** Laboratório VB

**DOCENTE:** Natália Osório

**TEMA:** Imobilização de leveduras em esferas de alginato de cálcio

---

### Introdução

Este trabalho tem como objectivo imobilizar leveduras em esferas de alginato.

Muitas vezes o uso de biocatalisadores industriais é limitado pela relativa instabilidade das células ou das moléculas com bioatividade (por exemplo as enzimas), e por dificuldades na separação de produtos e recuperação das células (ou enzimas) das misturas reaccionais. A imobilização dos biocatalisadores em suportes sólidos permite eliminar algumas das desvantagens encontradas com as enzimas/células solúveis e, em certos casos, a actividade e a estabilidade catalítica podem ser alteradas favoravelmente. Vários métodos de imobilização têm sido descritos, nomeadamente por oclusão ou por ligação química. A imobilização de células inteiras é também usada para evitar o processo de extração das enzimas das células.

Neste método de imobilização o biocatalisador é incorporado numa solução de alginato de sódio, a qual é seguidamente adicionada a uma outra contendo iões cálcio. A gelificação ocorre por troca iônica ficando as células retidas na malha interna do gel.

O alginato de sódio é constituído por cadeias poliméricas individualizadas, constituídas por uma longa “cauda” de alginato associada a um ião sódio. Quando o alginato de sódio é misturado com a solução aquosa de cloreto de cálcio os iões sódio do alginato de sódio são substituídos pelos iões cálcio da solução de cloreto de cálcio. Por cada ião de cálcio que entra para se ligar às cadeias de alginato saem dois iões de sódio. Esta troca de iões tem como consequência a formação de cadeias que antes estavam individualizadas e passaram a estar associadas duas a duas, entre si, por um ião cálcio. O polímero resultante é, assim mais denso e, por isso, mais rijo. Esta reacção química é instantânea, por isso, a formação de “pérolas” é observada imediatamente após o contacto das soluções.

## **Procedimento Experimental: Imobilização de leveduras em esferas de alginato de cálcio**

1. Prepare 10 mL de uma suspensão com 1,0 g de levedura em água;
2. Prepare 300 ml de uma solução de cloreto de cálcio (2 %, m/v)
3. Num copo de precipitação prepare 40 mL de uma matriz líquida contendo alginato de sódio a 3 % (em água) da seguinte forma:
  - Pese o alginato de sódio necessário para os 40 mL solução;
  - Coloque primeiro a água num copo de precipitação e em agitação magnética adicione o alginato em pequenas porções até dissolução total;
  - Aqueça a matriz líquida (60-70 °C) para dissolver o alginato (a agitação pode ser feita com o auxílio de uma vareta), após total dissolução arrefecer até cerca de 30 °C;
4. Adicione à matriz líquida de alginato os 10 mL da suspensão de levedura;
5. Usando uma pipeta de plástico adicione à solução de cloreto de cálcio 2 % (100 mL), contida numa proveta de 100 mL, a matriz de alginato de sódio com a suspensão de levedura gota a gota. Espere cerca de 3-5 minutos para que se complete a gelificação;
6. Recolha as esferas com uma rede e faça uma lavagem com água. Seque-as colocando apenas o passador em sobre um papel absorvente.
7. Pese as esferas e registe o valor.
8. As esferas devem ser armazenadas, a 4 °C, em solução de cloreto de cálcio 2 % dentro de frascos rolhados.