

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS  
CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MÔNICA STOBIENIA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE  
HIDROLISADO DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO**

MEDIANEIRA

2018

MÔNICA STOBIEŃIA

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE  
HIDROLISADO DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado  
a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II,  
do Curso Superior em Engenharia de Alimentos  
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
– UTFPR, Câmpus Medianeira.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Colla

Coorientador: Prof. Dr. Ilton José Baraldi

MEDIANEIRA  
2018



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Medianeira  
Diretoria de Graduação e Educação Profissional  
Coordenação Engenharia de Alimentos

---

**Mônica Stobienia**

**Efeito da aplicação de ultrassom em fermentação alcoólica de hidrolisado de farelo de arroz desengordurado**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado às 15:50 horas do dia 12 de junho de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira de Alimentos, do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Medianeira. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Colla  
Orientadora

---

Prof. Dr. Ilton José Baraldi  
Co-orientador

---

Prof. Dr. Flávio Dias Ferreira  
Membro da Banca

---

Prof<sup>a</sup>. Me<sup>a</sup>. Júlia Cristiê Kessler  
Membro da Banca

---

Mônica Stobienia  
Aluna

Medianeira, 12 de junho de 2018.

**“A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso”**

Dedico este trabalho aos meus pais, Olinda e Lauro, por todo apoio e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Tenho de agradecer a Deus, pela força nos momentos de necessidade.

Aos meus pais e toda minha família, especialmente aos meus tios e ao meu namorado, por todo amparo durante minha jornada acadêmica e pessoal.

À minha orientadora, Eliane Colla, que sempre me apoiou no desenvolvimento desse e de outros trabalhos em minha graduação, transferindo com amor sua sabedoria.

Ao meu coorientador, Ilton Baraldi, por toda sua paciência e tranquilidade empregada para disseminação de seu conhecimento.

À colega e amiga, Bianca Peron, por toda ajuda e atenção oferecidos durante a construção de nossos trabalhos.

Aos demais amigos e professores, que sempre me auxiliaram e me apoiaram de alguma forma em minha caminhada.

Muito obrigada.

## RESUMO

STOBIENIA, MÔNICA. **Efeito da Aplicação de Ultrassom em Fermentação Alcoólica de Hidrolisado de Farelo de Arroz Desengordurado**. 2018. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira.

O aproveitamento de resíduos agroindustriais em bioprocessos apresenta grande relevância nos aspectos econômicos e socioambientais. O farelo de arroz desengordurado (FAD), subproduto proveniente do processamento do arroz, possui grande quantidade de carboidratos passíveis de utilização em fermentação alcoólica, além de diversos outros nutrientes que complementam o substrato. Para fins de melhoria na eficiência da fermentação, tecnologias de estímulo ao crescimento celular podem ser empregadas no intuito de aumentar o rendimento do processo. Nesta perspectiva, a aplicação de energia ultrassônica durante a fermentação é expressiva, pois diversos estudos demonstraram seus efeitos positivos sobre a fisiologia celular de microrganismos em diversos meios. Com isso, objetivou-se investigar neste estudo, os efeitos gerados pelas ondas ultrassônicas sobre as leveduras no processo de fermentação alcoólica de hidrolisado de FAD, além de analisar o aumento na produtividade em bioetanol. Inicialmente foi realizada a hidrólise enzimática do FAD moído com proteases e amilases, utilizando-se metodologias definidas em estudo anterior (SIEPMANN, 2014). A fermentação alcoólica foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL, incubados a 30 °C e 100 rpm, com aplicação de ultrassom (frequência de 37 kHz, 15 segundos de intermitência e 15 minutos de aplicação total), com variação no tempo de aplicação (2ª ou 4ª hora de fermentação), potência nominal do equipamento (40, 70 ou 100%) e tempo de exposição (5, 10 ou 15 segundos), baseando-se em dois Planejamentos Fatoriais Completos (PFC) 2<sup>2</sup> definidos em estudo preliminar, com um total de 7 ensaios cada. Para acompanhamento do processo, foram retiradas amostras a cada 2 horas para avaliação da viabilidade celular, concentração de biomassa, açúcares redutores e concentração de etanol, avaliando-se os parâmetros de rendimento e produtividade do processo em células e em etanol ao longo das 10 horas de fermentação. Além disso, foram realizados testes para aferição da potência de ultrassom absorvida pelo meio de fermentação, com medida da variação da temperatura com o tempo de sonicação. Os resultados mostraram efeitos positivos sobre o crescimento celular em ambos os planejamentos com estímulo ultrassônico, com acréscimo de mais de 160% no número de células em comparação com o meio controle, onde não houve a irradiação. Quando aplicado o ultrassom na 4ª hora de fermentação, obtiveram-se melhores valores para a produtividade em bioetanol logo após o estímulo (1,5 g·(L·h)<sup>-1</sup>), representando mais da metade da produtividade total média de todos os ensaios (2,3 g·(L·h)<sup>-1</sup>). Tais resultados ressaltam que a utilização de energia de ultrassom de baixa frequência pode melhorar o desempenho das células de levedura durante a fermentação de hidrolisado de FAD, sendo viável sua utilização em baixa potência e por curtos períodos de estimulação.

**Palavras-chave:** Ondas ultrassônicas. Efeito fisiológico em células de leveduras. Produtos agroindustriais.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do grão de arroz.....	14
Figura 2 – Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. ....	17
Figura 3 – Modalidade cavitacional do ultrassom.....	19
Figura 4 – Fluxograma esquemático da fermentação alcoólica de FAD com aplicação de ultrassom.....	24
Figura 5 – Aplicação de ultrassom durante a fermentação de hidrolisado de FAD. ...	29
Figura 6 – Perfil cinético de fermentação do planejamento A e Meio Controle: Massa Seca (▲), Etanol (*), AR (●). ....	30
Figura 7 – Perfil cinético de fermentação do planejamento B e Meio Controle: Massa Seca (▲), Etanol (*), AR (●). ....	31
Figura 8 – Contagem de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos ensaios do planejamento A ao longo da fermentação alcoólica e imediatamente após a sonicação (ultrassom). ....	37
Figura 9 – Contagem de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos ensaios do planejamento B ao longo da fermentação alcoólica e imediatamente após a sonicação (ultrassom). ....	37
Figura 10 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para produtividade em etanol após aplicação de ultrassom (P.E u) (g·(L·h) <sup>-1</sup> ) em função do tempo de exposição e da potência do ultrassom para o planejamento A. ....	42
Figura 11 – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para produtividade em etanol após aplicação de ultrassom (P.E u) (g·(L·h) <sup>-1</sup> ) em função do tempo de exposição e da potência do ultrassom para o planejamento B. ....	43
Figura 12 – Sistema de mensuração da variação de temperatura em banho ultrassônico. ....	44
Figura 13 – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 40%. ....	45
Figura 14 – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 70%. ....	45
Figura 15 – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 100%. ....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis a serem estudadas no PFC 2 <sup>2</sup> .	23
Tabela 2 – Eficiência da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) obtidos no processo de fermentação alcóolica do FAD para o planejamento A e Meio Controle. .....	32
Tabela 3 – Eficiência da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) obtidos no processo de fermentação alcóolica do FAD para o planejamento B e Meio Controle. .....	32
Tabela 4 – Matriz do PFC 2 <sup>2</sup> com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas e respectivas respostas para o Planejamento A. ....	35
Tabela 5 – Matriz do PFC 2 <sup>2</sup> com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas e respectivas respostas para o Planejamento B. ....	36
Tabela 6 – Efeitos das variáveis estudadas para as respostas de Produtividade Celular, Produtividade em Bioetanol, Número de Células, Viabilidade Celular, Eficiência e Produtividade em Bioetanol após aplicação do Ultrassom para o Planejamento A. ....	38
Tabela 7 – Efeitos das variáveis estudadas para as respostas de Produtividade Celular, Produtividade em Bioetanol, Número de Células, Viabilidade Celular, Eficiência e Produtividade em Bioetanol após aplicação do Ultrassom para o Planejamento B. ....	39
Tabela 8 – Coeficientes de regressão para a resposta da produtividade em bioetanol após o ultrassom ( $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ ) dos planejamentos A e B. ....	41
Tabela 9 – ANOVA dos modelos para predição da P.E <sup>u</sup> ( $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ ) nos planejamentos A e B.....	42
Tabela 10 – Potência real transmitida pelo banho ultrassônico e densidade de potência absorvida pelo sistema de acordo com a potência nominal do equipamento.....	46



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	12
3.1	USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS	12
3.1.1	Bioconversão de Resíduos Agroindustriais	12
3.1.2	Farelo de Arroz	14
3.2	PRODUÇÃO DE BIOETANOL	16
3.3	TRATAMENTO ULTRASSÔNICO: DEFINIÇÕES	18
3.3.1	Aplicação de Ultrassom em Processos Fermentativos	20
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
4.1	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	22
4.2	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM APLICAÇÃO DE ULTRASSOM	23
4.2.1	Contagem de Células Viáveis	24
4.2.2	Determinação de Açúcares Redutores	25
4.2.3	Determinação da Biomassa Celular	25
4.2.4	Concentração de Bioetanol	25
4.3	CÁLCULOS DE RENDIMENTO E PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	26
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	27
4.5	MEDIDAS DOS PARÂMETROS DE ULTRASSOM	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	29
5.3	CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	29
5.3.1	Análise dos Efeitos das Variáveis Estudadas no PFC	33
5.4	MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS DE POTÊNCIA DO ULTRASSOM	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	48
	REFERÊNCIAS	49

## 1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais em bioprocessos vem se tornando uma alternativa de grande interesse para a indústria, uma vez que é possível obter diversos produtos a partir do metabolismo de microrganismos com viabilidade e agregação de valor, diminuindo também os impactos ambientais.

Neste aspecto, encontram-se os resíduos vegetais caracterizados por altos teores de celulose, a exemplo do farelo de arroz. Tecnologias podem ser aplicadas para a transformação destes carboidratos complexos em açúcares fermentescíveis, e conversão em bioetanol (NUNES et al., 2013).

Na safra 2015/16, o Brasil produziu 10,6 milhões de toneladas de arroz (CONAB, 2017), sendo a maior parte dessa produção beneficiada, ou seja, faz-se necessário o descascamento e tratamento do grão para que este possa ser comercializado. Neste processamento, o farelo aparece como subproduto quantitativamente expressivo, pois representa entre 8 a 11% da massa total do grão, sendo obtido a partir do endosperma amiláceo no processo de polimento do arroz (LAKKAKULA et al., 2004).

O farelo de arroz é um subproduto de baixo custo, pouco valorizado pelas indústrias arroseiras, devido a sua utilização limitada, que atualmente restringe-se à produção de ração animal, fertilizantes ou extração de óleo (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006).

No entanto, este resíduo de composição rica em nutrientes, em destaque carboidratos, pode ser empregado como meio de cultivo de baixo custo em processos fermentativos para produção de bioetanol e outros produtos diversos, como biodiesel (SANTOS, 2006), vinagre (PAZUCH, 2015), xilitol, a partir de enriquecimento do meio de fermentação com o farelo de arroz (FELIPE, 2001), e também na produção de enzimas proteolíticas (SUMANTHA et al., 2006).

Como forma de otimizar os parâmetros que influenciam na cinética fermentativa, a aplicação de ultrassom pode ser promissora. Diversos estudos mostram seus efeitos sobre reações químicas e biológicas. Estes efeitos são capazes de promover a agitação do meio líquido favorecendo a transferência de massa e, por meio do fenômeno da cavitação em células e macromoléculas em solução, pode-se alterar a estrutura e a funcionalidade destes componentes (SINISTERRA, 1992).

Porém, a grande maioria destes estudos não explora os mecanismos de atuação do ultrassom de baixa frequência em processos fermentativos ou então não otimiza os parâmetros adequados de forma a aumentar a eficiência destes processos.

Considera-se o processo de ultrassom como um fenômeno físico onde são criadas, em um meio líquido, cavidades de vapor e gases as quais aumentam de tamanho até implodirem, gerando o evento conhecido como cavitação, provocando efeitos de ativação em reações químicas (MARTINES et al., 2000).

Estudos mostraram que a aplicação do ultrassom causou efeitos positivos no crescimento celular e na produção de bioetanol. Domingos et al. (2012) observaram um aumento de 12% na taxa de produção etanólica aplicando-se ultrassom na frequência de 20 kHz durante o processo fermentativo, quando comparado a amostras não sonicadas. Visando avaliar o mecanismo de atuação do ultrassom sobre as células, Lanchun et al. (2003) verificaram uma aceleração no crescimento celular através de estímulo intermitente de energia ultrassônica de baixa intensidade nas fases de adaptação e de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação de ultrassom em intervalos regulares e tempos distintos durante o processo de fermentação alcoólica do hidrolisado de FAD, avaliando-se o crescimento e a viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem como o rendimento e a produtividade de bioetanol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ultrassom de baixa frequência e alta potência durante o processo fermentativo do hidrolisado de FAD sobre a viabilidade celular e produtividade em bioetanol.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a hidrólise enzimática do FAD com enzimas comerciais com o intuito de promover a transformação dos carboidratos complexos em açúcares fermentescíveis;
- Avaliar a etapa de fermentação alcoólica assistida por ultrassom para produção de bioetanol a partir do hidrolisado do FAD, aplicando um planejamento fatorial completo para estudo do efeito das variáveis potência do equipamento e tempo de exposição ao ultrassom sobre as respostas de viabilidade celular, rendimento e produtividade de bioetanol;
- Medir a energia de ultrassom absorvida pelo meio de fermentação;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

A sustentabilidade em processos industriais se torna cada vez mais relevante nos aspectos que caracterizam os impactos ambientais.

Os subprodutos agroindustriais, provenientes dos processos tecnológicos que fazem parte do beneficiamento de produtos agrícolas, destacam-se pelo grande volume de produção tendo, por muitas vezes, destinação inadequada. Com isso, deixa-se de aproveitar substâncias de alto valor, subutilizando o potencial produtivo destes resíduos (PINTO et al., 2005).

Utilizando-se de tecnologias apropriadas, pode-se converter a matéria residual em produtos comerciais, ou ainda em insumos para processos secundários (LAUFENBERG et al., 2003).

O aproveitamento dos resíduos em processos biotecnológicos é relevante, pois grande parte destes materiais se constitui de natureza orgânica com grande proporção de carbono, passível de ser utilizado como substrato em fermentações (RABELO et al., 2014).

A conversão de biomassa a partir de microrganismos como agentes de transformação é promissora, apresentando vantagens frente aos processos de conversão químicos, uma vez que a biotransformação direciona as reações no sentido de obtenção de um produto definido, o qual se caracteriza como biodegradável (ANDRADE; COSTA, 2008).

##### 3.1.1 Bioconversão de Resíduos Agroindustriais

Os rejeitos denominados por biomassas são caracterizados pela matéria orgânica vegetal com potencial de geração de energia (ROCHA et al., 2017), tais como cascas, bagaços, palhas, tortas, sementes, entre outros.

As biomassas possuem como componentes principais a celulose, hemicelulose e lignina. A combinação destes compostos mediante ligações químicas não covalentes e covalentes cruzadas com associação de outros elementos, torna esta estrutura resistente à biodegradação natural (MALHERBE; CLOETE, 2002).

Desta forma, faz-se necessário o rompimento desta estrutura a partir de tratamentos que desintegrem a matriz lignina-carboidrato, tornando a celulose e a hemicelulose acessíveis para serem degradadas em açúcares simples por agentes químicos ou enzimáticos (ASSUMPTÃO, 2015). Para isso, requerem-se etapas preliminares de tratamento, com posterior hidrólise, fermentação e recuperação do produto formado para garantir a eficiência da bioconversão das biomassas lignocelulósicas (ZABED et al., 2016).

A etapa de pré-tratamento tem como objetivo promover a remoção da lignina e, parcialmente, da hemicelulose, com diminuição da cristalinidade e aumento da área superficial da celulose (FERREIRA, 2015). Esta etapa pode ser realizada a partir de métodos físicos, com moagem e irradiação; químicos, com o uso de álcalis, agentes oxidantes ou solventes orgânicos; físico-químicos, com processos de auto-hidrólise de vapor e oxidação úmida; biológica, a partir do emprego de microrganismos, ou então, uma combinação dos métodos descritos (GALBE; ZACCHI, 2007).

Posteriormente, a hidrólise da biomassa complementa o tratamento dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose), de forma a promover a quebra destes compostos em açúcares fermentescíveis. Este processo pode transcorrer por via ácida ou enzimática, sendo este último o meio mais adequado, pois não ocorre a formação de compostos indesejáveis e ainda oportuniza o desenvolvimento de técnicas avançadas para a otimização dos bioprocessos (RODRIGUES, 2009).

Na fermentação, a conversão do substrato ocorre a partir de diversas reações químicas catalisadas por microrganismos e enzimas. Esta etapa pode ser promovida por processo submerso ou em estado semi-sólido, onde neste último, dispensa-se o processo de hidrólise da biomassa, ocorrendo a bioconversão dos carboidratos em seu estado natural (GALBE; ZACCHI, 2007).

Para a obtenção dos produtos obtidos a partir do metabolismo microbiano, empregam-se diversas técnicas de recuperação e purificação, tais como destilação, precipitação, ultrafiltração, além de técnicas de cromatografia para identificação e quantificação (SCHMIDELL et al., 2001).

Conseqüentemente, o desenvolvimento e a melhoria de tecnologias já existentes são necessários em todas as etapas, de forma a otimizar os processos e viabilizar a utilização dos resíduos agrícolas, agregando valor aos produtos com sustentabilidade na produção.

### 3.1.2 Farelo de Arroz

Um dos componentes principais da dieta do brasileiro, com consumo médio de 25 kg por ano, o arroz (*Oryza sativa*) assume condição importante durante toda sua cadeia produtiva em caráter social e econômico (MAPA, 2015).

Na safra 2015/16, o Brasil produziu 10,6 milhões de toneladas de arroz (CONAB, 2016), sendo a maior parte dessa produção beneficiada, ou seja, faz-se necessário o descascamento e tratamento do grão para que este possa ser comercializado.

O farelo é obtido a partir do endosperma amiláceo no processo de polimento do arroz e representa entre 8 a 11% da massa total do grão (LAKKAKULA et al., 2004). Esta etapa é denominada como brunição, onde o arroz descascado, integral, é submetido à abrasão em equipamentos que retiram o farelo, sendo este constituído pelo germe e película (CHAUD et al., 2009), conforme representado pela Figura 1.



**Figura 1** – Estrutura do grão de arroz.

Fonte: JOSAPAR, 2008.

Por possuir elevada quantidade de lipídios insaturados, o farelo integral é suscetível a rancidez oxidativa e hidrolítica, sendo usualmente destinado para rações ou para fabricação de óleo, dispondo, o subproduto desengordurado, pouco valor para as indústrias arroseiras (FEDDERN et al., 2007).

O farelo de arroz desengordurado (FAD) contém cerca de 15% de proteínas e 15% de fibras e carboidratos, caracterizados por hemicelulose (8,7 a 11,4%), celulose (9 a 12,8%), amido (5 a 15%) e beta-glucana (1%) (MALEKIAN et al., 2000), além de composição rica em nutrientes. Tais características propiciam o interesse pela aplicação deste subproduto em processos biotecnológicos na forma de substrato ou então em suplementação de meios de cultivo (CHAUD et al., 2009).

A utilização do farelo de arroz como nutriente para produção de ácido láctico é amplamente estudada, visando a redução dos custos para obtenção deste produto (GAO et al., 2008). Tanaka et al. (2006) utilizaram o pó de farelo de arroz desengordurado, com sacarificação a partir de celulase e amilase, para produção de ácido láctico, com de uma linhagem de *L. delbrueckii*, obtendo um rendimento de 78% no processo.

Gao et al. (2008) conseguiram obter produção desejável de ácido láctico a partir de farelo de arroz hidrolisado quimicamente combinado com extrato de levedura, em pequena proporção, justificando a viabilidade desta fermentação devido ao baixo custo que este resíduo possui.

Na produção de cogumelos, o farelo aparece com importância para suplementação de substratos. Rossi, Monteiro e Machado (2001) avaliaram a velocidade de desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* (cogumelo *Shiitake*), com efeitos de profundidade e de suplementação do meio base de bagaço de cana com farelo de arroz e melaço de cana. Os autores observaram um maior crescimento no meio suplementado com farelo, em proporções de até 15%, não ocorrendo alterações na porosidade do meio, permitindo melhor difusão de oxigênio, importante para o crescimento dos micélios.

O farelo de arroz aparece também em estudos com a produção de álcoois. Felipe et al. (2001) relataram a obtenção de 10 g·L<sup>-1</sup> de xilitol a partir da bioconversão de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, enriquecido com farelo de arroz, e sulfato de amônio.

Já no estudo realizado por Siepmann (2014), o farelo desengordurado hidrolisado foi utilizado como substrato único na produção de bioetanol, obtendo-se



rendimentos em torno de 100% na fermentação, indicando o consumo total do substrato, com produção de, aproximadamente, 40 g·L<sup>-1</sup> de bioetanol.

Como forma de agregar o farelo de arroz à alimentação humana, Pazuch (2015) realizou a otimização da produção de vinagre por processo submerso, analisando sua atividade antioxidante, a qual apresentou valores acima do encontrado em vinagres comerciais pelo método da captura do radical livre (DPPH), além da presença de ácido fítico, indicando as propriedades funcionais do produto adquiridas pelo aproveitamento deste resíduo no processo de fermentação.

### 3.2 PRODUÇÃO DE BIOETANOL

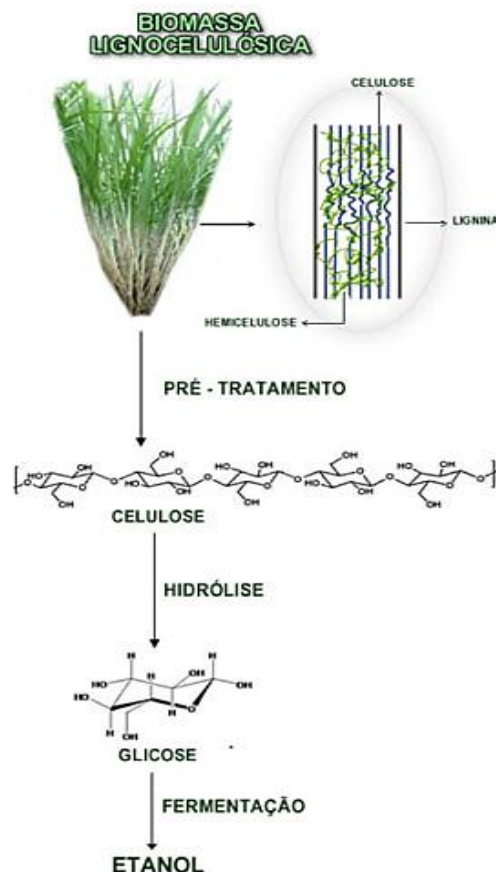
A diversificação da matriz energética vem sendo amplamente discutida no mundo todo, uma vez que os recursos naturais estão se tornando escassos, além da crescente preocupação em torno da questão do aquecimento global. Neste sentido, pesquisas estão voltadas no sentido de produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana e também de etanol lignocelulósico, produzido com resíduos agroindustriais que, geralmente, tem destinação inadequada (RUBIN, 2017).

Em processos convencionais, os custos com matéria-prima podem chegar a 40% do valor da produção do etanol, ocasionando discussão sobre a produção de alimentos voltada para combustíveis, bem como a agricultura extensiva utilizada para suprir as necessidades pela demanda do combustível. Faz-se então necessário, o desenvolvimento de tecnologias adequadas de forma a reduzir o dispêndio com insumos e diminuir os impactos socioambientais (MACHADO; ABREU, 2006).

Neste sentido, o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas obtidas de resíduos vegetais, industriais e urbanos apresenta diversas vantagens, entre elas: o preço baixo e estável, o alto teor de carboidratos não concorrentes com a cadeia alimentar e o menor teor de gases poluentes gerados na queima quando comparados ao etanol convencional (ZABED et al., 2016), representando uma alternativa para o reaproveitamento energético com vantagens ambientais e econômicas.

A produção de bioetanol a partir de biomassas lignocelulósicas se dá por meio de processos químicos, com a utilização de ácidos, ou então com aplicação de enzimas, de forma que haja a quebra das ligações lignocelulósicas com liberação de

açúcares, utilizados como substrato na fermentação alcoólica convencional (FERREIRA, 2015), como representado pela Figura 2.



**Figura 2** – Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. Fonte: SANTOS et al. 2012.

O etanol celulósico foi produzido pela primeira vez no ano de 1898 na Alemanha, com aparas de madeira tratadas com ácido diluído. Forçados a produzir seu próprio combustível, na Segunda Guerra Mundial, os alemães aperfeiçoaram a técnica com o emprego de ácido sulfúrico diluído para hidrólise do material lignocelulósico, sendo este conhecido por Processo Scholler (ALVES; MACRI, 2013).

Atualmente no Brasil, a empresa Raízen (Piracicaba – SP) possui uma planta industrial de fabricação de bioetanol de segunda geração em escala comercial, a qual aproveita os resíduos gerados no processo convencional de produção de etanol e açúcar, tais como palha e bagaço de cana. A unidade chega a produzir 40 milhões de litros de bioetanol a mais por ano, sem necessidade de aumento da área de cultivo da

matéria prima, tornando o processo sustentável com maior competitividade do produto no mercado (RAÍZEN, 2014).

### 3.3 TRATAMENTO ULTRASSÔNICO: DEFINIÇÕES

O ultrassom consiste de ondas sonoras em frequências inaudíveis para o ser humano (acima de 16 kHz), sendo estas ondas geradas por transdutores pizoelétricos, ou seja, materiais que, quando submetidos à uma voltagem elétrica na superfície de seus eletrodos, sofrem deformação mecânica em uma determinada direção na forma de vibração (BISCEGLI, 2003).

Geralmente, as ondas de ultrassom necessitam de um meio para propagação e, quando estas atravessam de um meio para outro, em decorrência dos efeitos de absorção, reflexão e espelhamento, observa-se uma atenuação na intensidade de sinal com mudança na densidade das ondas (BISCEGLI, 2003).

As ondas atravessam o meio a partir de fenômenos de compressão e redução com variação na pressão, induzindo a transmissão da perturbação inicial para as partículas adjacentes, através de vibração sucessiva das moléculas no meio de propagação (MUÑOZ, 2012).

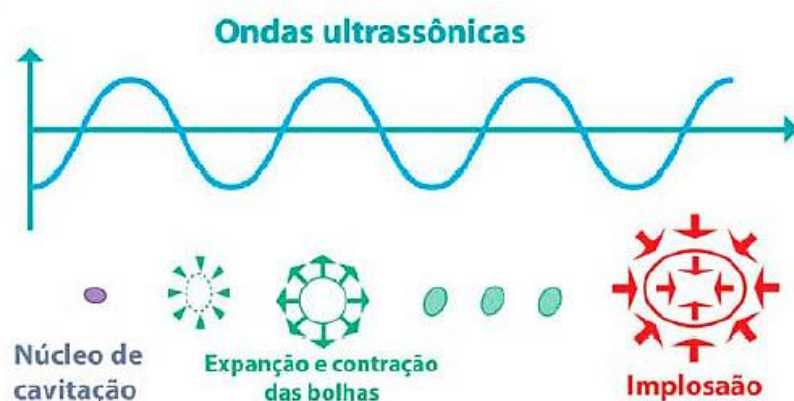
O ultrassom pode ser classificado em alta e baixa potência. Em alta potência, as ondas são caracterizadas por baixa frequência com escala em quilohertz (kHz), e intensidade maior que  $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , dispendo de diversas aplicações, tais como: homogeneização de soluções, rompimento celular, soldagem de metais, limpeza de materiais, operações de filtração e cristalização de sólidos, polimerização de moléculas, cavitação em líquidos, entre outros. O ultrassom de baixa potência apresenta ondas com alta frequência, na faixa de mega-hertz (MHz), com intensidade de energia menor que  $1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , apresentando aplicações médicas, como em exames de imagem e, na engenharia para medida de espessuras e inspeções de soldas (KNORR et al., 2004; BARBOZA; SERRA, 1992).

Para a geração do ultrassom existem dois equipamentos distintos: o banho e a sonda ultrassônica, os quais consistem em um transdutor composto por uma cerâmica pizoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. No banho ultrassônico este conjunto de chapas é fixada ao fundo da cuba do aparelho e a energia é transmitida

através de um líquido, geralmente água, havendo grande dispersão da energia. Já a sonda se encontra instalada na extremidade do amplificador do transdutor, tendo contato direto com o sistema reacional e como consequência, maior eficiência na transmissão de energia (BARBOZA; SERRA, 1992).

Dentre os diversos fenômenos mecânicos e físicos derivados do ultrassom, Sinisterra (1992) destacou alguns fatores desta energia sobre os processos biotecnológicos:

- Temperatura: o aumento da temperatura causado pelas ondas ultrassônicas pode levar a desnaturação térmica de enzimas, portanto, os processos biotecnológicos devem ser realizados em condições isotérmicas.
- Cavitação: é resultado do processo de compressão e rarefação das ondas no meio líquido, com formação de microbolhas de vapor que implodem e produzem aumentos locais de temperatura e pressão, causando efeitos de desintegração celular e inativação enzimática, além de promover a aceleração de reações químicas (Figura 3).
- Transferência de massa: esta transferência é favorecida por conta da movimentação do meio líquido causada pelas ondas de ultrassom. Este processo ocorre em três zonas distintas: na camada limite, na membrana celular e no citosol da célula.



**Figura 3** – Modalidade cavitacional do ultrassom.

Fonte: FILIPPO e JÚNIOR, 2012.

De forma geral, o uso do ultrassom é amplamente reconhecido devido aos seus processos químicos industriais com aplicações comerciais. No entanto, existem diversos outros fenômenos com grande potencial de utilização e que ainda não foram devidamente explorados, necessitando de maiores estudos e pesquisas no sentido de otimização dos mecanismos de atuação da energia ultrassônica (MASON, 2000).

### 3.3.1 Aplicação de Ultrassom em Processos Fermentativos

Nos últimos anos, diversos estudos abordaram os efeitos provocados pelas ondas ultrassônicas de baixa frequência em meios de fermentação.

Matsuura et al. (1994) realizaram a aplicação de ultrassom na fermentação de vinho, cerveja e saquê, com o auxílio de um condutor pizoelétrico acoplado em um fermentador, o qual gerava ondas intermitentes com frequência de 43 kHz e intensidade de energia de  $30 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Como resultados, eles observaram a redução do tempo de fermentação entre 50 e 64%, com aceleração da produção de bioetanol e outros componentes devido ao decréscimo na concentração de  $\text{CO}_2$  no meio.

Ciccolini et al. (1997) avaliaram o efeito combinado do ultrassom de baixa frequência (20 kHz) com a temperatura na sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* suspensas em meio aquoso. Observou-se a sinergia existente entre estas variáveis, sendo que a energia ultrassônica se mostrou não letal para a levedura, porém proporcionou danos às células, as quais se tornaram mais sensíveis em temperaturas mais elevadas.

A partir de meio celulósico derivado de resíduos mistos de papel de escritório, Wood et al. (1997) estudaram a influência da energia intermitente de ultrassom no processo de sacarificação simultânea à fermentação, verificando um acréscimo de 20% na produção de bioetanol após 96 h de fermentação. Os pesquisadores mostraram que a aplicação do ultrassom vem como alternativa à utilização de celulases, as quais possuem altos custos e inviabilizam a produção comercial de bioetanol a partir destes resíduos.

A aplicação pulsada de sonicação em biorreator com frequência de 25 kHz e intensidade energética de  $30 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$  apresentou efeitos positivos na fermentação alcoólica estudada por Schläfer et al. (2000). Comparado ao controle não sonicado,

constatou-se um aumento do rendimento na produção de etanol de mais de 50%, com aumento na concentração de biomassa e consumo de glicose, indicando a melhora na atividade biológica com otimização nas transferências de gás e de nutrientes no meio líquido.

Visando avaliar a melhor etapa de aplicação, Lanchun et al. (2003) elaboraram um experimento envolvendo as variáveis frequência ultrassônica e eficiência energética, o intervalo entre duas estimulações, tempo de estimulação e duração total da exposição à energia sobre o crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* em suas diferentes fases de crescimento. Como conclusão, os autores verificaram que a energia de baixa intensidade das ondas foi capaz de acelerar em quase 33,3% o crescimento celular em fase exponencial, mostrando a influência positiva sobre o desenvolvimento da levedura em seu processo fermentativo.

Em estudos mais recentes, observou-se aumento de 12% na produção de bioetanol em amostras de caldo de cana-de-açúcar com suspensão de leveduras submetidas à radiação ultrassônica de baixa frequência (20 kHz), mostrando que esta energia é uma alternativa promissora na fermentação em escala industrial (DOMINGOS et al., 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O FAD foi cedido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL – Pelotas/RS) na forma de *pellets*. Realizou-se a moagem do farelo em moinho de facas (SL31 Tipo Willey, Solab, Piracicaba/SP) com o objetivo de aumentar a área de contato do farelo com as enzimas na etapa de hidrólise enzimática.

Para a hidrólise enzimática foram utilizadas as seguintes enzimas comerciais: Alcalase® 2.4 L FG (protease), proveniente do microrganismo *Bacillus licheniformis*,  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis*, comercialmente denominada Liquozyme® Supra 2.2X, e a exo-1,4-alfa-D-glicosidase (amiloglucosidase), obtida a partir de uma estirpe selecionada de *Aspergillus niger*, conhecida comercialmente como AMG® 300L. Todas foram produzidas pela Novozymes® e fornecidas gentilmente pela empresa LNF Latino Americana (Bento Gonçalves/RS).

As condições utilizadas para a hidrólise enzimática foram previamente otimizadas por Siepmann (2014): razão FAD/água  $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $15 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{g FAD}^{-1}$  de protease por 2 horas a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $30 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{g FAD}^{-1}$  de  $\alpha$ -amilase com tempo de atuação de 2 horas a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $40 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{g FAD}^{-1}$  de amiloglucosidase, com atuação de 3 horas a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , nesta ordem. O hidrolisado foi preparado em reator de hidrólise de 3 litros (TE-2003/3,0-E2, Tecnal, Piracicaba/SP) com agitação de 100 rpm. Para ajuste do pH ideal para atuação das enzimas (6,5 para a protease, 6,0 para a  $\alpha$ -amilase e 4,7 para a amiloglucosidase), utilizaram-se de soluções de hidróxido de sódio e ácido cítrico, ambas de concentração  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , formuladas com reagentes de pureza analítica.

Após esse período, o hidrolisado foi centrifugado (20 minutos,  $3823 \times g$ ) (Rotina 420 R, Hettich, Alemanha) e o sobrenadante, fase de interesse, foi armazenado sob condições de congelamento até a etapa de fermentação.

## 4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM APLICAÇÃO DE ULTRASSOM

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 225 mL do hidrolisado esterilizado, com pH ajustado para 5,0 utilizando-se de soluções de hidróxido de sódio e ácido cítrico ( $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A inoculação foi realizada na proporção de 10% (v/v) com *Saccharomyces cerevisiae* previamente ativada a 30 °C por 24 h. O meio para o preparo do inóculo foi composto por glicose (2% m/v), peptona de carne (0,5% m/v) e extrato de levedura (1% m/v); a levedura liofilizada foi adicionada ao meio na proporção de 0,2% (m/v). Os ensaios foram realizados em *shaker* de agitação orbital (SL 221, Solab, Piracicaba/SP) sob temperatura de 30 °C e agitação constante de 100 rpm.

A aplicação de ultrassom se deu em banho ultrassônico (Elma E 30H, Ultra-Bohn, Alemanha) na frequência de 37 kHz, com tempo de intervalo entre as sonicações de 15 segundos e aplicação total de 15 minutos de tratamento, nos tempos de 2 h (Planejamento A) e 4 h (Planejamento B) de fermentação, variando-se a potência nominal do equipamento (40, 70 e 100%), e o tempo de sonicação, correspondendo a estímulos de 5, 10 e 15 segundos, baseando-se em dois Planejamentos Fatoriais Completos (PFC)  $2^2$  (3 pontos centrais, total de 7 ensaios cada).

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Níveis reais e codificados das variáveis a serem estudadas no PFC  $2^2$ .

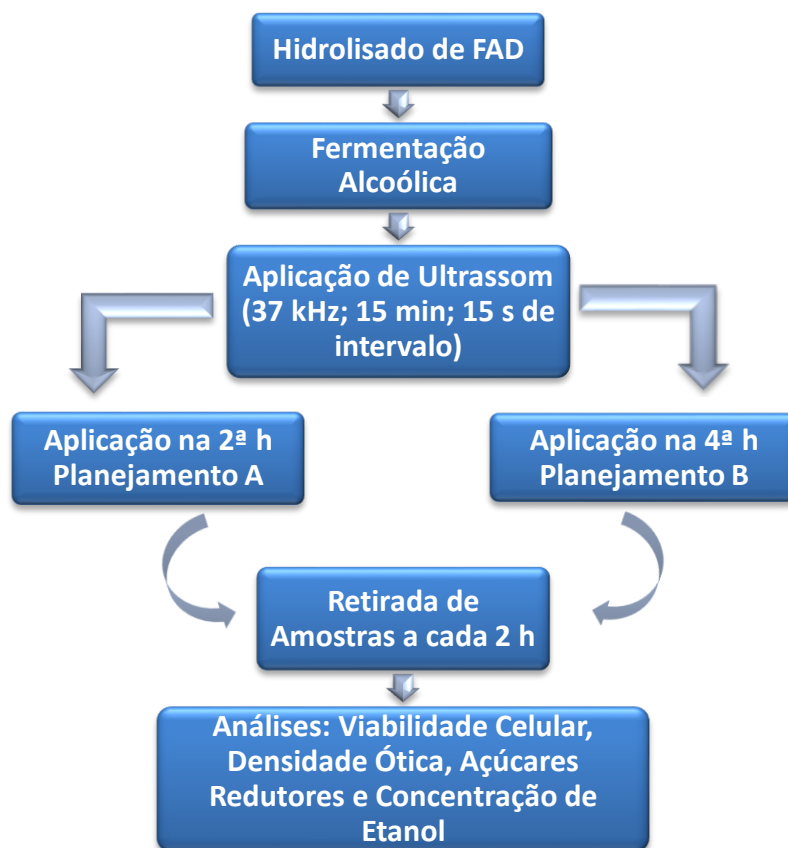
Variáveis/Níveis	Potência (%)	Tempo de aplicação do tratamento ultrassônico (segundos)
-1	40	5
0	70	10
+1	100	15

Fonte: a autora (2018).

Alíquotas das amostras foram retiradas a cada 2 horas para acompanhamento da fermentação, iniciando no tempo zero até 10 horas, avaliando-se as respostas de células viáveis, açúcares redutores (AR), biomassa celular e concentração de bioetanol.



A partir da Figura 4, pode-se observar um esquema da forma em que se conduziu a fermentação estimulada pelo ultrassom.



**Figura 4** – Fluxograma esquemático da fermentação alcoólica de FAD com aplicação de ultrassom. Fonte: a autora (2018).

#### 4.2.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

A contagem de células foi realizada conforme método descrito por Lafforgue, Delorme e Goma (1994). Esta metodologia utiliza solução padrão de azul de metileno como corante, o qual é absorvido pelas células. Células que estiverem mortas não possuem capacidade de degradar o corante permeado pela membrana celular, tornando-se azuis. A contagem de células foi realizada em Câmara de Neubauer espelhada (7301-1b, New Optics).

#### 4.2.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de AR foi determinada em triplicata pelo método Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Reino Unido), no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de AR foi calculada a partir de curva padrão de solução de glicose com concentração de 1 g·L<sup>-1</sup>, com diluições de 0 a 1 g·L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA CELULAR

A concentração da biomassa celular foi determinada conforme metodologia de Muller (2006) (adaptado), fazendo-se a leitura da densidade ótica (DO) de uma alíquota do meio de cultivo ao longo da fermentação, em espectrofotômetro (Lambda XLS, PerkinElmer, Reino Unido) no comprimento de onda de 600 nm.

Construiu-se uma curva de calibração da DO *versus* massa seca, utilizando uma alíquota do meio de cultivo ao final da fermentação, sendo as células lavadas com água destilada e centrifugadas (5 minutos, 3000 x g, 10 °C) (CT-5000R, Cientec, Belo Horizonte/MG), com posterior secagem em estufa a 50 °C até peso constante. Paralelamente, foram realizadas diluições apropriadas de alíquotas do meio de cultivo final, com leitura da DO em comprimento de onda de 600 nm.

A partir da relação com o volume de meio coletado, a concentração total de massa seca foi relacionada indiretamente para se estabelecer as concentrações de biomassa celular durante o período de fermentação, a partir da curva de calibração.

#### 4.2.4 CONCENTRAÇÃO DE BIOETANOL

A concentração de bioetanol foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Ultra-alta Pressão (UHPLC Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, EUA) equipado

com detector de índice de refração, sendo as amostras filtradas em filtros de seringa Milipore® 0,45 µm e injetadas em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). A fase móvel foi constituída de ácido sulfúrico 5 mmol·L<sup>-1</sup>, com vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. A temperatura do sistema foi mantida a 50 °C, com detecção realizada por índice de refração e volume de amostra injetado de 20 µL (BIO-RAD, 2012). Para cálculo das concentrações de bioetanol das amostras, construiu-se uma curva de referência com 6 pontos (diluições de 0 a 10% m/v), utilizando um padrão de etanol absoluto 99,5%.

#### 4.3 CÁLCULOS DE RENDIMENTO E PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A eficiência de fermentação alcoólica ( $\eta$ ) foi obtida pelo fator de conversão experimental de AR em bioetanol ( $Y_{P/S}$ ) no rendimento estequiométrico (0,511), conforme a Equação 1:

$$\eta (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (1)$$

A produtividade de bioetanol foi calculada pela Equação 2 (STROPPIA, 2009):

$$Produtividade (g \cdot (L \cdot h)^{-1}) = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (2)$$

Sendo:

$P_f$ : Concentração do produto (g·L<sup>-1</sup>) no tempo final de fermentação;

$P_0$ : Concentração do produto (g·L<sup>-1</sup>) no início da fermentação;

$t_f$ : Tempo de fermentação (horas).

Por sua vez, a produtividade em células foi calculada a partir da Equação 3 (CINELLI, 2012):

$$\text{Produtividade (g}\cdot\text{(L}\cdot\text{h)}^{-1}) = \frac{X_f - X_0}{t_f} \quad (3)$$

Onde:

$X_f$ : Concentração de células ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no tempo final de fermentação;

$X_0$ : Concentração de células ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) no início da fermentação;

$t_f$ : Tempo de fermentação (horas).

O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) foram calculados por meio das Equações 4, 5 e 6, respectivamente (STROPPIA, 2009; ALMEIDA, 2006):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (5)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \quad (6)$$

Sendo:

$P_0$  e  $P_f$  = concentrações ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inicial e final de bioetanol;

$X_f$  e  $X_0$  = as concentrações ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inicial e final de células;

$S_0$  e  $S_f$  = as concentrações ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) inicial e final de açúcares redutores.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todos os ensaios dos planejamentos foram realizados aleatoriamente e os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, EUA). A adequacidade dos modelos foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 MEDIDAS DOS PARÂMETROS DE ULTRASSOM

Foram realizados testes para mensuração da potência real transmitida pelo banho ultrassônico para o meio de fermentação. Para isso, utilizou-se de método calorimétrico, que mede a geração de calor devido à resistência das moléculas ao movimento das ondas de ultrassom, sendo esta quantidade de calor proporcional à intensidade do campo acústico, podendo ser estabelecida pelo aumento da temperatura no meio (MARGULIS; MAXIMENKO, 1991).

Esta análise foi efetuada com base em estudo feito por Raso et al. (1999), onde se estimou a potência absorvida a partir de mensuração do aumento da temperatura do meio líquido (água destilada), com a utilização de 6 termorresistores acoplados ao *hardware* Arduino®, em intervalo de tempo de aproximadamente 15 minutos, baseando-se na Equação 7:

$$P = m \cdot c_p \cdot \left( \frac{dT}{dt} \right) \quad (7)$$

Em que:

$P$ : Potência absorvida pelo sistema (W);

$m$ : massa do líquido utilizado no experimento (kg);

$c_p$ : calor específico do meio líquido ( $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$ );

$dT/dt$ : gradiente de temperatura ao longo do tempo de medida ( $K \cdot s^{-1}$ ).

A densidade de potência ( $D_p$ ) foi determinada pela divisão da potência absorvida pelo sistema ( $P$  em W) pelo volume de meio tratado ( $V$  em  $cm^3$ ), conforme Equação 8:

$$D_p = \frac{P}{V} \quad (8)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

A fermentação alcoólica do hidrolisado de FAD foi realizada em condições controladas, conforme estabelecido nos planejamentos fatoriais completos, com realização paralela da fermentação de um meio controle, o qual não recebeu tratamento ultrassônico durante o processo. A contagem inicial de células foi, em média, de  $7 \cdot 10^7 \pm 10^3$  cél·mL<sup>-1</sup> para todos os ensaios.

A aplicação de ultrassom foi realizada de forma intermitente, com tempos de ciclo de 5, 10 e 15 segundos a cada 15 segundos de intervalo entre as aplicações, com duração total de 15 minutos, e variação da potência nominal do equipamento (40, 70 e 100%), na 2<sup>a</sup> h de fermentação, no planejamento A, e na 4<sup>a</sup> h no planejamento B, sendo este processo ilustrado pela Figura 5.



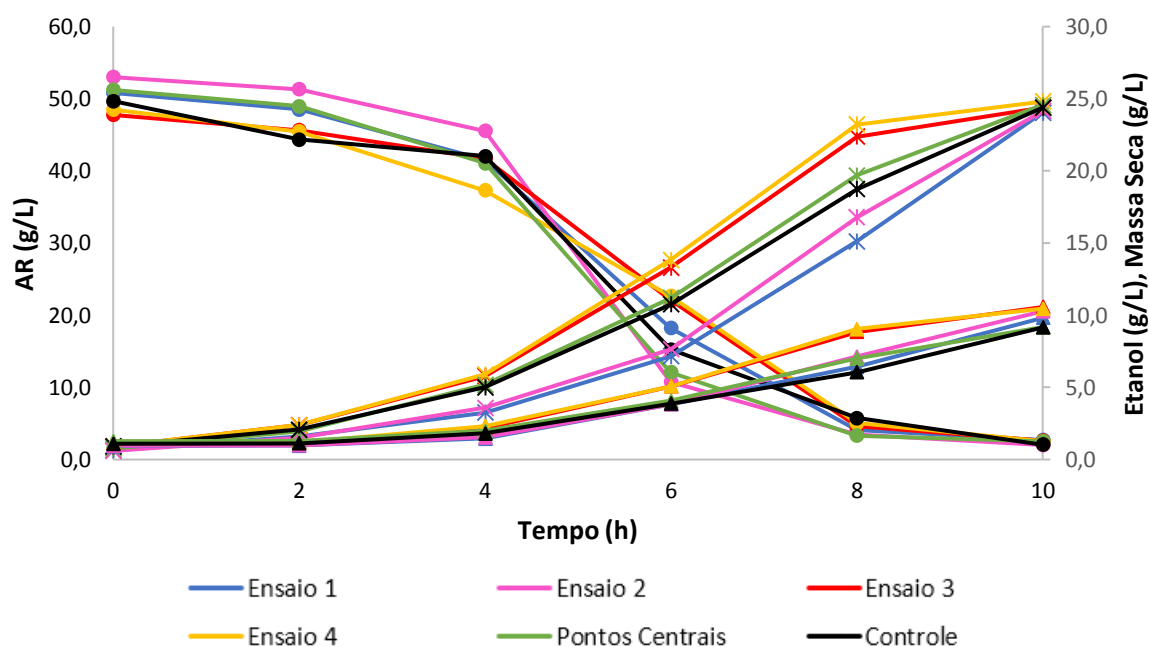
**Figura 5** – Aplicação de ultrassom durante a fermentação de hidrolisado de FAD.  
Fonte: a autora (2018).

Pode-se observar na Figura 5, a formação de espuma quando as ondas ultrassônicas entram em contato com o meio de cultivo, originada pela liberação do CO<sub>2</sub> produzido, o que implica em um aumento da área de trocas entre gás e líquido,

podendo-se aumentar a taxa de transferência de oxigênio e nutrientes para o interior das células elevando-se, também, a taxa de transporte de produtos residuais para longe das células, de forma a melhorar o crescimento celular e produção de metabólitos de interesse (PITT; ROSS, 2006).

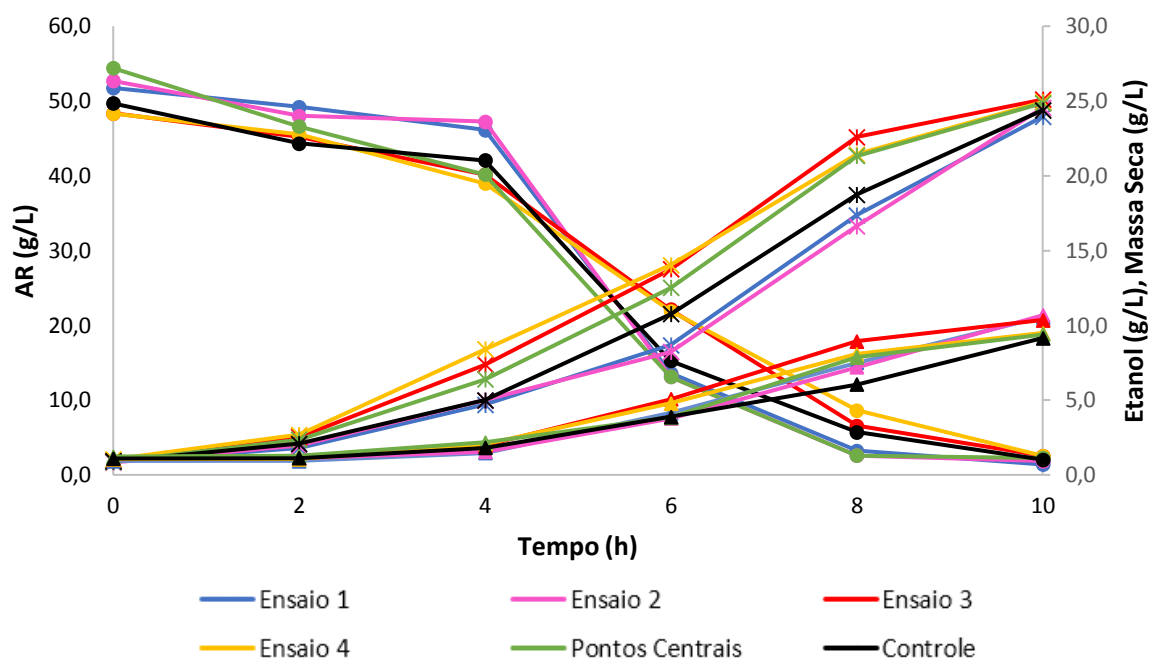
Para verificação desta implicação foi realizado o acompanhamento do crescimento celular e da produtividade das células, bem como dos fenômenos decorridos durante a fermentação nos planejamentos realizados.

Os resultados obtidos para a cinética da fermentação alcoólica do FAD estão apresentados nas Figuras 6 e 7, para os planejamentos A e B, respectivamente.



**Figura 6** – Perfil cinético de fermentação do planejamento A e Meio Controle: Massa Seca (▲), Etanol (\*), AR (●).

Fonte: a autora (2018).



**Figura 7** – Perfil cinético de fermentação do planejamento B e Meio Controle: Massa Seca (▲), Etanol (\*), AR (●).

Fonte: a autora (2018).

De acordo com as Figuras, tanto os ensaios do planejamento A como do B, apresentaram comportamentos cinéticos semelhantes ao meio controle em relação ao consumo de substrato, produção de etanol e crescimento celular. No tempo de 10 h de fermentação, houve consumo praticamente total dos açúcares redutores, produzindo-se, em média,  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de bioetanol e  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa celular. Entretanto, convém destacar no comportamento cinético, que o crescimento celular foi superior nos ensaios que receberam o estímulo ultrassônico; além disso, os ensaios 3 e 4, com 15 s de aplicação, e os pontos centrais, com 10 s de aplicação, os quais possuíam tempos superiores de exposição aos ensaios 1 e 2, com 5 s cada, resultaram em maior produção de etanol, em ambos os planejamentos.

Nas Tabelas 2 e 3, são apresentados os rendimentos de todos os ensaios dos planejamentos A e B, bem como do meio controle na etapa de fermentação alcoólica, assim como os fatores de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ).



**Tabela 2** – Eficiência da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) obtidos no processo de fermentação alcoólica do FAD para o planejamento A e Meio Controle.

Ensaio	Eficiência (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
1	95,22	0,49	0,18	2,63
2	90,38	0,46	0,18	2,53
3	101,86	0,52	0,21	2,50
4	101,81	0,52	0,20	2,58
5	93,31	0,48	0,15	3,11
6	97,87	0,50	0,16	3,21
Meio Controle	96,90	0,50	0,17	2,95

Fonte: a autora (2018).

**Tabela 3** – Eficiência da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) e da biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) obtidos no processo de fermentação alcoólica do FAD para o planejamento B e Meio Controle.

Ensaio	Eficiência (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
1	89,68	0,46	0,19	2,39
2	91,34	0,47	0,19	2,48
3	103,17	0,53	0,20	2,60
4	102,18	0,52	0,18	2,83
5	94,43	0,48	0,15	3,18
6	91,61	0,47	0,15	3,11
Meio Controle	96,90	0,50	0,17	2,95

Fonte: a autora (2018).

Ao analisar os fatores de conversão verifica-se que nos ensaios 5 e 6 (pontos centrais) de ambos os planejamentos, obtiveram-se os maiores fatores de conversão de células em produto indicando que, em relação a massa celular, alcançaram-se maiores quantidades de bioetanol produzido quando aplicada a energia de ultrassom em ciclos de 10 segundos com potência nominal de 70%. Da mesma forma, este valor foi superior quando comparado ao ensaio controle, demonstrando os efeitos positivos do estímulo sobre as células de levedura em relação à sua bioconversão de substrato em produto.

Confrontando-se os valores alcançados na conversão de biomassa em produto com estudo feito por Pazuch (2015) sobre a fermentação alcoólica de FAD sem

aplicação de ultrassom, os quais variaram entre 0,50 e 2,63 g/g, observa-se que neste trabalho conseguiram-se maiores valores na conversão, os quais alternaram entre 2,39 e 3,18 g/g.

Em estudo realizado por Furlan (2009), avaliando-se a bioconversão de etanol a partir da palha e casca de arroz, conseguiu-se atingir uma concentração de  $23,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de bioetanol na fermentação do substrato contendo  $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de AR, com eficiência de 35%, sendo este valor muito menor quando comparado às eficiências obtidas neste estudo, as quais atingiram a faixa de 100% na conversão do substrato em produto, indicando o potencial do FAD como substrato para produção de bioetanol em fermentação estimulada por ultrassom.

#### 5.1.1 Análise dos Efeitos das Variáveis Estudadas no PFC

As matrizes dos ensaios realizados nos planejamentos A e B com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e respostas de produtividade celular, produtividade em bioetanol, número de células, viabilidade celular, eficiência e produtividade em bioetanol logo após o ultrassom, assim como os resultados obtidos para o meio controle, estão apresentadas nas Tabelas 6.3 e 6.4, respectivamente.

Comparando-se as respostas dos planejamentos com os resultados obtidos para o meio controle, observa-se que a viabilidade celular foi maior com a aplicação de ultrassom para todos os ensaios (>94%), bem como o número de células por mL de meio ao final da fermentação. O menor valor encontrado no planejamento A foi de  $1,10 \times 10^8 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$  no ensaio 2, representando um acréscimo de 177% na quantidade de células em relação ao resultado médio obtido com o meio controle ( $6,60 \times 10^7 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Já para o planejamento B, constatou-se um aumento de cerca de 167% no número de células do ensaio 4, de maior contagem ( $1,76 \times 10^8 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em relação ao meio controle ao final das 10 horas de fermentação. Ao longo do experimento, notou-se este mesmo comportamento para os ensaios com aplicação de ultrassom nos dois planejamentos, em comparação ao controle, como mostrado nas Figuras 8 e 9.

Analisando-se os resultados das Tabelas 4 e 5, foi possível calcular os efeitos das duas variáveis estudadas nos planejamentos A e B, os quais estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 4** – Matriz do PFC 2<sup>2</sup> com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas e respectivas respostas para o Planejamento A.

Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	P.C <sup>c</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	P.E <sup>d</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	N.C <sup>e</sup> (cél·mL <sup>-1</sup> )	V.C <sup>f</sup> (%)	E <sup>g</sup> (%)	P.E <sup>u</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )
1	-1 (40)	-1 (5)	0,89 ± 0,01	2,34 ± 0,04	1,45·10 <sup>8</sup>	97,64	95,22	0,39 ± 0,06
2	+1 (100)	-1 (5)	0,93 ± 0,01	2,35 ± 0,05	1,08·10 <sup>8</sup>	99,54	90,38	0,48 ± 0,06
3	-1 (40)	+1 (15)	0,94 ± 0,01	2,35 ± 0,01	1,83·10 <sup>8</sup>	95,31	101,86	0,95 ± 0,08
4	+1 (100)	+1 (15)	0,93 ± 0,01	2,39 ± 0,04	1,74·10 <sup>8</sup>	96,67	101,81	0,95 ± 0,05
5	0 (70)	0 (10)	0,77 ± 0,02	2,40 ± 0,30	1,65·10 <sup>8</sup>	97,92	93,31	0,72 ± 0,03
6	0 (70)	0 (10)	0,75 ± 0,01	2,40 ± 0,12	1,45·10 <sup>8</sup>	97,97	97,87	0,82 ± 0,02
Meio Controle <sup>h</sup>	-	-	0,81 ± 0,01	2,35 ± 0,41	6,60·10 <sup>7</sup>	89,80	96,90	-

<sup>a</sup> Potência (%); <sup>b</sup> Tempo de aplicação do ultrassom; <sup>c</sup> Produtividade Celular ± erro padrão\*; <sup>d</sup> Produtividade em Bioetanol ± erro padrão\*; <sup>e</sup> Número de Células; <sup>f</sup> Viabilidade Celular; <sup>g</sup> Eficiência; <sup>u</sup> Produtividade em Bioetanol (imediatamente após aplicação do ultrassom) ± erro padrão\*; <sup>h</sup> Sem aplicação de ultrassom\*. \*Os resultados representam a média de 3 determinações.

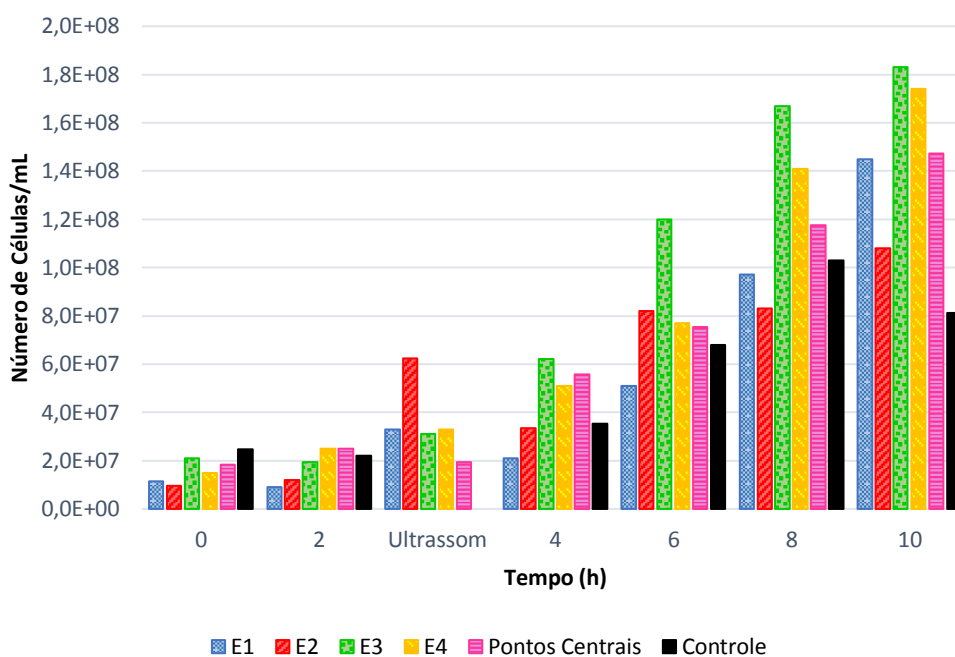
Fonte: a autora (2018).

**Tabela 5** – Matriz do PFC 2<sup>2</sup> com valores codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas e respectivas respostas para o Planejamento B.

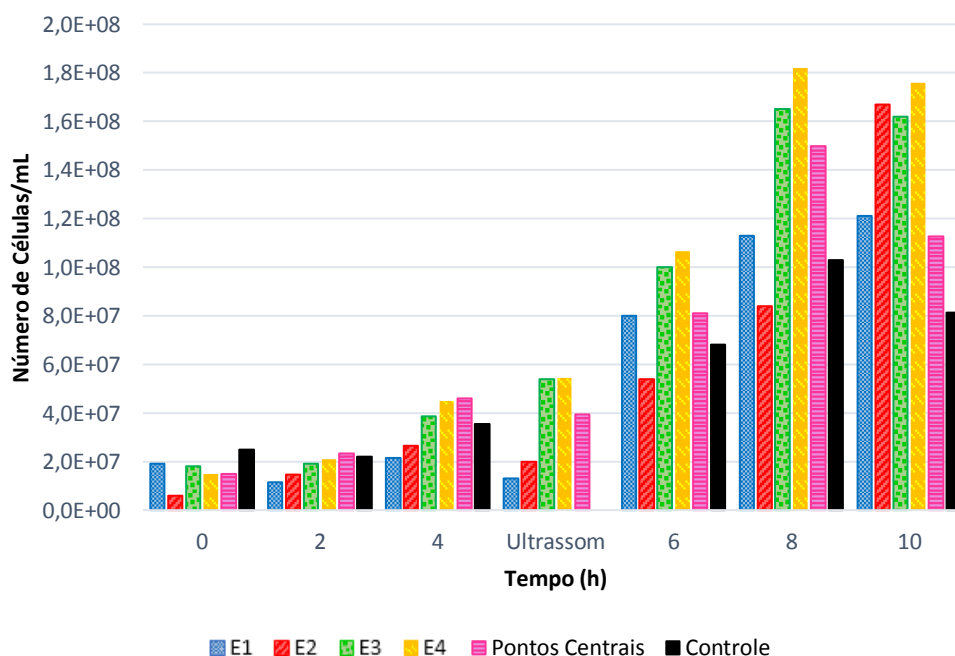
Ensaio	x <sub>1</sub> <sup>a</sup>	x <sub>2</sub> <sup>b</sup>	P.C <sup>c</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	P.E <sup>d</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	N.C <sup>e</sup> (cél·mL <sup>-1</sup> )	V.C <sup>f</sup> (%)	E <sup>g</sup> (%)	P.E <sup>u</sup> (g·(L·h) <sup>-1</sup> )
1	-1 (40)	-1 (5)	0,96 ± 0,00	2,31 ± 0,17	1,21·10 <sup>8</sup>	96,80	89,68	0,85 ± 0,06
2	+1 (100)	-1 (5)	0,96 ± 0,01	2,37 ± 0,50	1,67·10 <sup>8</sup>	95,43	91,34	0,88 ± 0,06
3	-1 (40)	+1 (15)	0,93 ± 0,01	2,42 ± 0,30	1,62·10 <sup>8</sup>	94,19	103,17	1,43 ± 0,08
4	+1 (100)	+1 (15)	0,84 ± 0,01	2,39 ± 0,04	1,76·10 <sup>8</sup>	97,24	102,18	1,55 ± 0,05
5	0 (70)	0 (10)	0,76 ± 0,01	2,41 ± 0,18	1,19·10 <sup>8</sup>	96,36	94,43	1,34 ± 0,03
6	0 (70)	0 (10)	0,77 ± 0,01	2,39 ± 0,00	4,9·10 <sup>7</sup>	94,23	91,61	1,30 ± 0,02
Meio Controle <sup>h</sup>	-	-	0,81 ± 0,01	2,35 ± 0,41	6,60·10 <sup>7</sup>	89,80	96,90	-

<sup>a</sup> Potência (%); <sup>b</sup> Tempo de aplicação do ultrassom (segundos); <sup>c</sup> Produtividade Celular ± erro padrão\*; <sup>d</sup> Produtividade em Bioetanol ± erro padrão\*; <sup>e</sup> Número de Células; <sup>f</sup> Viabilidade Celular; <sup>g</sup> Eficiência; <sup>u</sup> Produtividade em bioetanol (imediatamente após aplicação do ultrassom) ± erro padrão\*; <sup>h</sup> Sem aplicação de ultrassom\*. \*Os resultados representam a média de 3 determinações.

Fonte: a autora (2018).



**Figura 8** – Contagem de células de *Saccharomyces cerevisiae* dos ensaios do planejamento A ao longo da fermentação alcoólica e imediatamente após a sonicação (ultrassom).  
Fonte: a autora (2018).



**Figura 9** – Contagem de células de *Saccharomyces cerevisiae* dos ensaios do planejamento B ao longo da fermentação alcoólica e imediatamente após a sonicação (ultrassom).  
Fonte: a autora (2018).

**Tabela 6** – Efeitos das variáveis estudadas para as respostas de Produtividade Celular, Produtividade em Bioetanol, Número de Células, Viabilidade Celular, Eficiência e Produtividade em Bioetanol após aplicação do Ultrassom para o Planejamento A.

Fator	Produtividade Celular				Produtividade em Bioetanol				Número de Células			
	Efeito (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Erro Pad.	t (2)	p-valor	Efeito (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Erro Pad.	t (2)	p-valor	Efeito (cél·mL <sup>-1</sup> )	Erro Pad.	t (2)	p-valor
Média	0,87	0,055	15,80	0,0040 <sup>c</sup>	2,37	0,013	188,35	<0,0001 <sup>c</sup>	1,5·10 <sup>8</sup>	4,2·10 <sup>6</sup>	36,80	0,0007 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> ) <sup>a</sup>	0,01	0,134	0,11	0,9234	0,03	0,031	0,88	0,4736	-2,3·10 <sup>7</sup>	1,0·10 <sup>7</sup>	-2,25	0,1530
(x <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	0,02	0,134	0,18	0,8735	0,03	0,031	0,71	0,5496	5,2·10 <sup>7</sup>	1,0·10 <sup>7</sup>	5,09	0,0364 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> )×(x <sub>2</sub> )	-0,03	0,134	-0,21	0,8541	0,01	0,031	0,44	0,7043	1,4·10 <sup>7</sup>	1,0·10 <sup>7</sup>	1,37	0,3038

Fator	Viabilidade Celular				Eficiência				Produtividade em Bioetanol <sup>d</sup>			
	Efeito (%)	Erro Pad.	t (2)	p-valor	Efeito (%)	Erro Pad.	t (2)	p-valor	Efeito (g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Erro Pad.	t (2)	p-valor
Média	97,51	0,219	444,39	<0,0001 <sup>c</sup>	97,19	0,403	240,89	<0,0001 <sup>c</sup>	0,72	0,032	22,29	0,0020 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> ) <sup>a</sup>	1,63	0,537	3,02	0,0942	-2,45	0,988	-2,48	0,1314	0,05	0,079	0,64	0,5884
(x <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	-2,60	0,537	-4,84	0,0401 <sup>c</sup>	9,04	0,988	9,14	0,0118 <sup>c</sup>	0,52	0,079	6,55	0,0225 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> )×(x <sub>2</sub> )	-0,27	0,537	0,50	0,6642	2,40	0,988	2,42	0,1363	-0,04	0,079	-0,55	0,6356

<sup>a</sup> Potência (%); <sup>b</sup> Tempo de aplicação do ultrassom (segundos); <sup>c</sup> Fatores significativos (p<0,05 ou 95% de confiança); <sup>d</sup> Imediatamente após a aplicação de ultrassom.

Fonte: a autora (2018).

**Tabela 7** – Efeitos das variáveis estudadas para as respostas de Produtividade Celular, Produtividade em Bioetanol, Número de Células, Viabilidade Celular, Eficiência e Produtividade em Bioetanol após aplicação do Ultrassom para o Planejamento B.

Fator	Produtividade Celular				Produtividade em Bioetanol				Número de Células			
	Efeito	Erro	t (2)	p-valor	Efeito	Erro	t (2)	p-valor	Efeito	Erro	t (2)	p-valor
	(g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Pad.			(g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Pad.			(cél·mL <sup>-1</sup> )	Pad.		
Média	0,87	0,054	16,25	0,0038 <sup>c</sup>	2,38	0,010	241,87	<0,0001 <sup>c</sup>	1,5·10 <sup>7</sup>	1,1·10 <sup>7</sup>	13,67	0,0053 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> )	-0,05	0,131	-0,35	0,7576	0,02	0,024	0,80	0,5083	3,0·10 <sup>7</sup>	2,7·10 <sup>7</sup>	1,10	0,3867
(x <sub>2</sub> )	-0,07	0,131	-0,56	0,6298	0,06	0,024	2,60	0,1213	2,5·10 <sup>7</sup>	2,7·10 <sup>7</sup>	0,92	0,4567
(x <sub>1</sub> )×(x <sub>2</sub> )	-0,01	0,131	-0,30	0,7938	-0,04	0,024	-1,86	0,2045	-1,6·10 <sup>7</sup>	2,7·10 <sup>7</sup>	-0,59	0,6174

Fator	Viabilidade Celular				Eficiência				Produtividade em Bioetanol <sup>b</sup>			
	Efeito	Erro	t (2)	p-valor	Efeito	Erro	t (2)	p-valor	Efeito	Erro	t (2)	p-valor
	(%)	Pad.			(%)	Pad.			(g·(L·h) <sup>-1</sup> )	Pad.		
Média	96,38	0,608	158,64	<0,0001 <sup>c</sup>	95,40	1,323	72,11	0,0002 <sup>c</sup>	1,22	0,048	25,51	0,0015 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> )	0,84	1,488	0,56	0,6293	0,33	3,241	0,10	0,9273	0,07	0,117	0,63	0,5941
(x <sub>2</sub> )	-0,40	1,488	-0,27	0,8122	12,17	3,241	3,75	0,0642	0,62	0,117	5,32	0,0335 <sup>c</sup>
(x <sub>1</sub> )×(x <sub>2</sub> )	2,21	1,488	1,49	0,2756	-1,32	3,241	-0,41	0,7225	0,04	0,117	0,38	0,7398

<sup>a</sup> Potência (%); <sup>b</sup> Tempo de aplicação do ultrassom (segundos); <sup>c</sup> Fatores significativos (p<0,05 ou 95% de confiança); <sup>d</sup> Imediatamente após a aplicação de ultrassom.

Fonte: a autora (2018).



Pode-se verificar pela Tabela 6 que, no planejamento A, o tempo de exposição ao ultrassom teve efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) e positivo sobre as respostas de número de células, eficiência e produtividade em bioetanol logo após a aplicação de ultrassom, sendo este efeito negativo apenas na viabilidade das células, provavelmente causado pela ação do ultrassom sobre células fisiologicamente mais sensíveis em sua fase inicial de adaptação. Para o número de células, o efeito foi bem pronunciado quando se passa do nível inferior para o nível superior da variável, causando um aumento de  $5,2 \cdot 10^7$  cél·mL<sup>-1</sup>, em média.

De forma geral, estudos não indicam alteração negativa na viabilidade celular causada pelo ultrassom, como mostrado por Pedro (2008), onde o índice de viabilidade manteve-se acima de 97% em amostras irradiadas. Porém, em pesquisa realizada por Tomasin (2001), avaliando-se a biorresistência de suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* à aplicação de ultrassom, constatou-se a morte celular em amostras que eram irradiadas por um longo período de tempo, sob baixa frequência ultrassônica (20 kHz), efeito este que pode vir em decorrência da sensibilidade que as células possuem na fase inicial de crescimento, estando mais susceptíveis às alterações do meio devido ao efeito da cavitação e do aumento da temperatura ocasionado pelas ondas ultrassônicas.

Observando-se a Tabela 7, nota-se que no planejamento B a variável tempo de exposição ao ultrassom causou efeito positivo sobre a resposta de produtividade em bioetanol logo após a aplicação da energia ultrassônica. Sulaiman et al. (2012) também obteve resultado satisfatório na produção de etanol a partir de fermentação da lactose pela levedura *Kluyveromyces marxianus* assistida por ultrassom, alcançando uma concentração final cerca de 3,5 vezes maior que o ensaio controle, sem sonicação.

Analisando-se os resultados dos planejamentos A e B, foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta de produtividade em bioetanol após o ultrassom apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Coeficientes de regressão para a resposta da produtividade em bioetanol após o ultrassom ( $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ ) dos planejamentos A e B.

Planejamento	Coeficientes de Regressão		Erro Padrão		t (2)		p - valor	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Média	0,72	1,22	0,03	0,05	22,29	25,51	0,0020*	0,0015*
$x_1^a$	0,03	0,04	0,04	0,06	0,64	0,63	0,5884	0,5941
$x_2^b$	0,26	0,31	0,04	0,06	6,55	5,32	0,0225*	0,0335*
$x_1 \times x_2$	-0,02	0,02	0,04	0,06	-0,55	0,38	0,6356	0,7398

<sup>a</sup> Potência (%); <sup>b</sup> Tempo de aplicação do ultrassom (segundos); \* $p \leq 0,05$ .

Fonte: a autora (2018).

Considerando os parâmetros significativos ( $p \leq 0,05$ ) foram obtidas as Equações 9 e 10, que representam os modelos da produtividade em bioetanol após o ultrassom em função da variável tempo de exposição, estudadas nos planejamentos A e B, respectivamente. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9. Como o  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão foi significativo ( $p < 0,01$ ), e o percentual de variação explicada pelos modelos foram adequados ( $R^2 \approx 94\%$ ), levando em conta a variabilidade inerente aos bioprocessos (HAALAND, 1989), pode-se concluir que os modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, sendo possível construir as superfícies de resposta das Figuras 10 e 11.

$$P.E^u(g \cdot (L \cdot h)^{-1}) = 0,72 + 0,26 \cdot x_1 \quad (9)$$

$$P.E^u(g \cdot (L \cdot h)^{-1}) = 1,22 + 0,31 \cdot x_1 \quad (10)$$

**Tabela 9** – ANOVA dos modelos para predição da P.E<sup>u</sup> (g·(L·h)<sup>-1</sup>) nos planejamentos A e B.

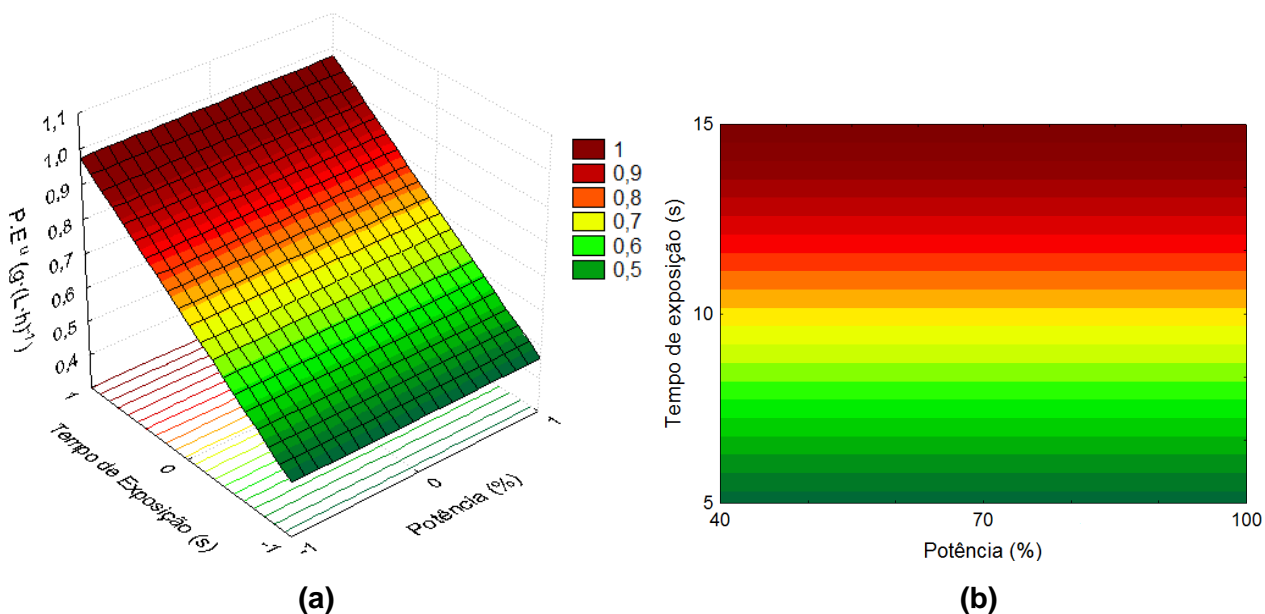
Fonte de Variação	SQ <sup>a</sup>		GL <sup>b</sup>		QM <sup>c</sup>		F <sub>calculado</sub>		p-valor	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Planejamentos										
Regressão	0,27	0,39	1	1	0,267	0,309	63,20	44,60	0,0014	0,0026
Resíduos	0,02	0,04	4	4	0,004	0,009				
Total	0,29	0,43	5	5						

<sup>u</sup> Produtividade em bioetanol (imediatamente após aplicação do ultrassom)

% variação explicada ( $R^2$ ) = 94,05       $F_{1;4;0,05} = 7,71$

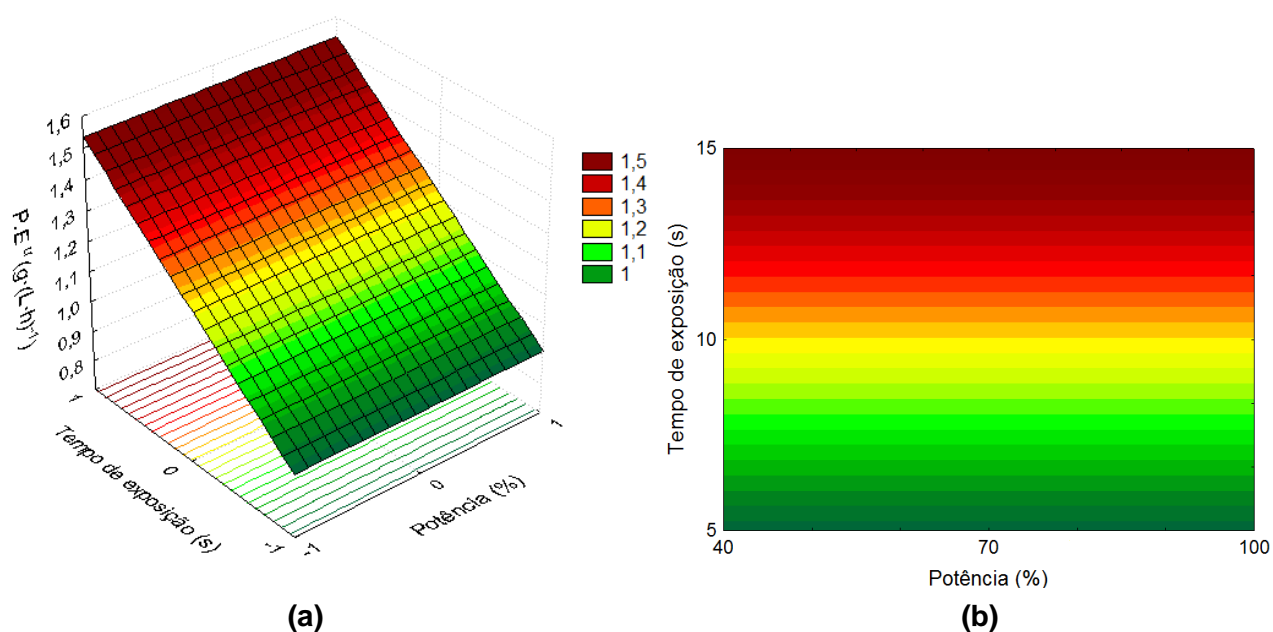
<sup>a</sup> soma de quadrados; <sup>b</sup> graus de liberdade; <sup>c</sup> quadrados médios.

Fonte: a autora (2018).



**Figura 10** – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para produtividade em etanol após aplicação de ultrassom (P.E<sup>u</sup>) (g·(L·h)<sup>-1</sup>) em função do tempo de exposição e da potência do ultrassom para o planejamento A.

Fonte: a autora (2018).



**Figura 11** – Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para produtividade em etanol após aplicação de ultrassom (P.E u) ( $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ ) em função do tempo de exposição e da potência do ultrassom para o planejamento B.

Fonte: a autora (2018).

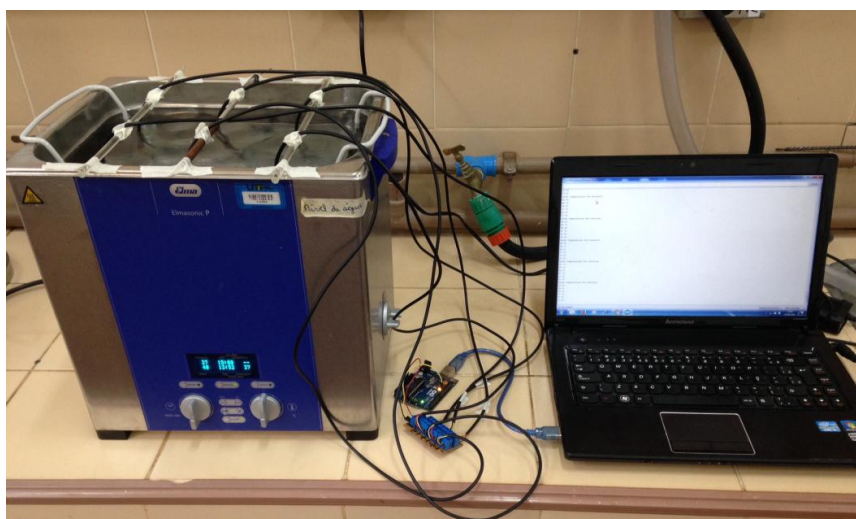
Pode-se observar através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno do planejamento A (Figura 10) que a região de maior produtividade em bioetanol se encontra no nível superior de tempo de exposição à energia ultrassônica (15 s), podendo alcançar uma produtividade de até  $0,9 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ . Este valor é relativamente baixo quando comparado ao resultado obtido no planejamento B (Figura 11), no qual se atingiu cerca de  $1,5 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ . Isto pode ser justificado pela condição fisiológica das leveduras, sendo que nas duas horas iniciais de fermentação estas ainda se encontram na fase de adaptação (lag) com baixa produção de bioetanol além de que, neste estágio, as células estão regulando seu metabolismo de forma a se adaptar ao meio para sua reprodução (LANCHUN et al., 2013).

Para o planejamento B, a produtividade em bioetanol alcançada logo após a aplicação de ultrassom representa mais da metade da produtividade total média de todos os ensaios dos dois planejamentos ao final das 10 h de fermentação (cerca de  $2,3 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ ) em apenas 4 h de fermentação, mostrando que nesta fase a aplicação do ultrassom foi mais eficiente, uma vez que este pode acelerar o transporte de nutrientes e oxigênio através da membrana celular, melhorando o seu crescimento e, conseqüentemente, seu desempenho na produção de metabólitos neste estágio (PITT; ROSS, 2006).

Desta forma, ressalta-se a importância da definição do tempo de aplicação do ultrassom nas diferentes fases de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que este estímulo pode apresentar maior potencial quando aplicado na fase exponencial de crescimento celular, como estudado no planejamento B, onde após 4 h de fermentação conseguiu-se obter melhores resultados na produtividade em bioetanol imediatamente após a sonicação.

## 5.2 MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS DE POTÊNCIA DO ULTRASSOM

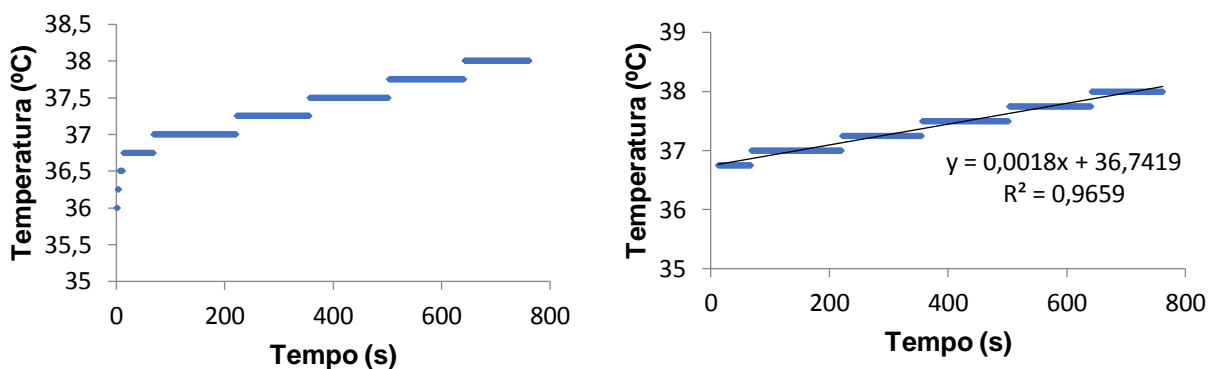
Para a análise dos valores reais das potências transmitidas pelo banho ultrassônico, foram realizadas mensurações das variações na temperatura nas diferentes potências nominais utilizadas neste estudo. Com isso, utilizaram-se de 6 termorresistores dispostos uniformemente dentro do equipamento, conectados ao *software* Arduino® (Figura 12), o qual realizava a leitura das temperaturas em intervalos de 1 segundo, por aproximadamente 15 minutos.



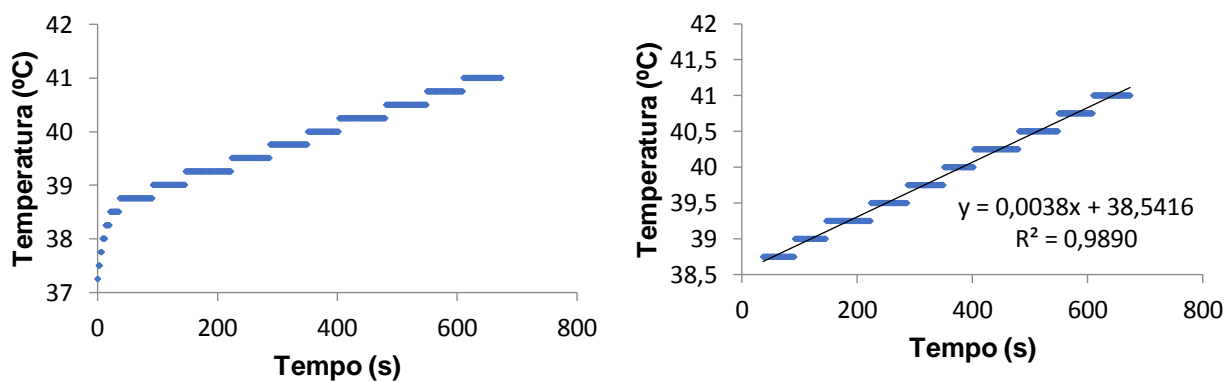
**Figura 12** – Sistema de mensuração da variação de temperatura em banho ultrassônico.  
Fonte: a autora (2018).

Com isso, construíram-se gráficos relacionando a média das temperaturas medidas pelo tempo de aplicação da energia, os quais são apresentados nas Figuras 13, 14 e 15. Pode-se observar que nos minutos iniciais de estímulo as temperaturas aumentaram exponencialmente, porém, quando atingido um determinado equilíbrio,

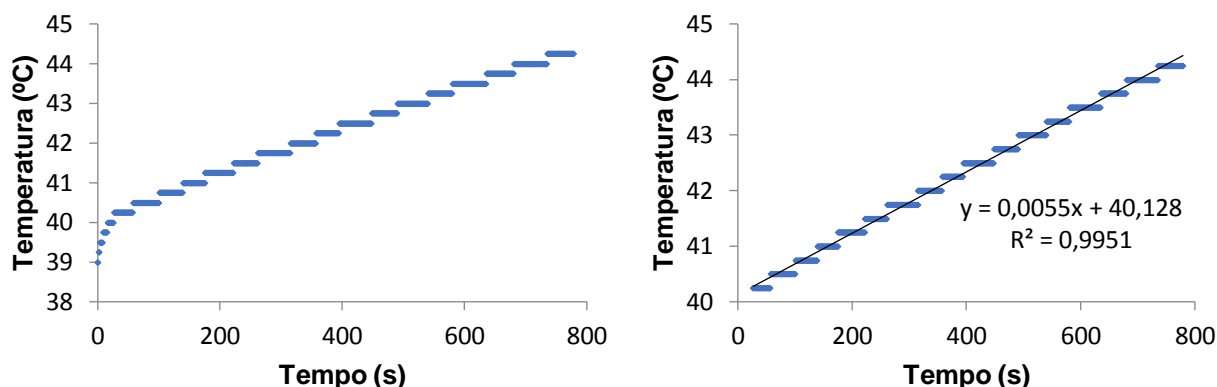
estas passaram a subir de forma proporcional ao tempo de aplicação do ultrassom, podendo-se assim, estabelecer uma relação linear para predição da potência real transmitida pelo aparelho.



**Figura 13** – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 40%.  
Fonte: a autora (2018).



**Figura 14** – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 70%.  
Fonte: a autora (2018).



**Figura 15** – Relação Temperatura x Tempo de exposição para a potência nominal de 100%.  
Fonte: a autora (2018).

Com os valores dos coeficientes angulares obtidos nas curvas de cada mensuração, os quais determinam a taxa de aumento da temperatura, bem como do calor específico e da massa de água utilizada no equipamento, conseguiu-se obter por meio da Equação 1, descrita no item 3, as potências reais transmitidas pelo banho de ultrassom para cada potência nominal utilizada, além da densidade de potência absorvida pelo sistema de fermentação (Equação 2), os quais são apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10** – Potência real transmitida pelo banho ultrassônico e densidade de potência absorvida pelo sistema de acordo com a potência nominal do equipamento.

Potência Nominal (%)	Taxa de Aumento de T (K·s <sup>-1</sup> )	Potência Real (W)	Densidade de Potência (W·(cm <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup> )
40%	0,0018	0,066	2,64·10 <sup>-4</sup>
70%	0,0038	0,144	5,76·10 <sup>-4</sup>
100%	0,0055	0,208	8,32·10 <sup>-4</sup>

$C_p$  água a 20 °C = 4,184 J·(kg·K)<sup>-1</sup>

$m$  água = 9 kg

Volume de meio de fermentação tratado com ultrassom = 250 cm<sup>3</sup>

Fonte: a autora (2018).

Pode-se verificar na Tabela 10 que os valores de potência real absorvidas pelo sistema são baixos quando comparados com a potência média efetiva de ultrassom transmitida pelo equipamento, que é de 40 W, conforme descrição no manual do fabricante (TECHSPAN, 200-?).

Da mesma forma, os valores de densidade de potência absorvidos pelo meio de fermentação também são inferiores quando comparados aos relatados por Oliveira et al. (2014), o qual avaliaram o efeito do ultrassom na estabilidade do licopeno puro em tomates utilizando, entre outros equipamentos, o banho ultrassônico (USC1450) na frequência de 25 kHz, que forneceu densidade de potência variando entre 0,055 e 0,063 W·(cm<sup>3</sup>)<sup>-1</sup>.



## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho foi possível concluir que o desempenho das células de levedura durante a fermentação de hidrolisado de FAD foi favorecido pela aplicação de estímulo ultrassônico de baixa frequência.

A aplicação dos planejamentos experimentais permitiu observar que a potência do ultrassom na frequência de 37 kHz não causou influência sobre o crescimento e produtividade em bioetanol das células. O oposto foi observado com o tempo de exposição, sendo que quanto maior o tempo (nos limites deste estudo), melhores foram as respostas obtidas em relação ao metabolismo da levedura.

Em relação ao crescimento celular, observou-se que a viabilidade se manteve alta com a aplicação de ultrassom para todos os ensaios, bem como o número de células por mL de meio ao final da fermentação, representando um acréscimo de cerca de 160% na quantidade de células em relação ao resultado médio obtido com o ensaio controle, onde não ocorreu este estímulo.

Já para a produtividade em bioetanol, conseguiu-se alcançar  $1,5 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  logo após a aplicação de ultrassom na 4ª hora de fermentação, o que representou mais da metade da produtividade total média de todos os ensaios ao final das 10 h de fermentação.

Constatou-se, então, que a melhor fase para a aplicação do estímulo ultrassônico se deu a partir da 4ª hora de fermentação pois, neste estágio de crescimento exponencial, as leveduras já se encontram totalmente adaptadas ao meio de fermentação, com aumento do transporte de nutrientes para a membrana celular e aceleração na produção de metabólitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. et al. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.
- ALVES, J. M. B. .; MACRI, R. C. V. Etanol De Segunda Geração: Estudo De Materiais Lignocelulósicos E Aplicações Da Lignina. **Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 1, p. 1, 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E 1758-01**. Standard test method for determination of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography. Philadelphia: ASTM, v.1, 2015.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32 n.5, 2008.
- ASSUMPÇÃO, S. M. N. Pré-tratamento químico combinado do bagaço da cana visando a produção de etanol de segunda geração. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** - Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2015.
- BALACHANDRAN, C. et al. An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2905–2912, 2008.
- BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. **Ultra-som(I): Influência do Ultra-som na Química**. Química Nova, v.15, n.4, p. 302-316, 1992.
- BIO-RAD. **Bulletin 6333**, Rev A. Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012.
- BISCEGLI, C. I. Conceitos da Física do Ultra-Som. **Instrumentação Agropecuária**, p. 19, São Paulo, 2004.
- CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial Do Farelo De Arroz Para Utilização Em Bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, n. 2, p. 33–46, 2009.
- CICCOLINI, L. et al. Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and of ultrasonic power. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, n. 2, p. 145–149, 1997.
- CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Monitoramento agrícola- Safra 2017**, v. 4, n. 1, p. 1–98, 2017.
- DOMINGOS, R. N. et al. Ondas ultrassônicas:bioefeitos sobre células de leveduras ultrasonic waves: bioeffects on yeast cells. **HOLOS Environment**, v. 12, n.1, p. 41–44, 2012.

FEDDERN, V.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. D. S. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 800–804, 2007.

FELIPE, M. G. A. CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A. E.; Application of factorial design to the Study of Xylitol Production from Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 159-168, 2001.

FERREIRA, J.. Etanol de segunda geração: Definição e Perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 12, n. 1, p. 11, 2015.

FILIPPO A. A.; JÚNIOR A. S. Tratamento de gordura localizada e lipodistrofia ginóide com terapia combinada: radiofrequência multipolar, LED vermelho, endermologia pneumática e ultrassom cavitacional. **Surg Cosmet Dermatol**. v. 4(3), p. 41-6, 2012.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41–65, 2007.

GAO, M. et al. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3659–3664, 2008.

HAALAND, P.D.. Statistical Problem Solving. In **Haaland**, P.D., Ed., *Experimental Design in Biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 1989.

JOSAPAR. Disponível em: <<http://www.josapar.com.br/>>. Acesso em: 14 junho 2018.

KNORR, D. et al. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 261–266, 2004.

LAFFORGUE, D. C.; DELORME, P. e GOMA, G. Continuous alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* recycle by tangential filtration: key points for process modelling. **Biotechnology Letters**, v.16, n.7, p.741-46, 1994.

LAKKAKULA, N. R.; LIMA, M.; WALKER, T. Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 157–161, 2004.

LANCHUN, S. et al. The research into the influence of low-intensity ultrasonic on the growth of *S. cerevisiae*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 30, n. 1–2, p. 43–49, 2003.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:(A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167–198, 2003.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. E. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Política Agrícola**, v. 15, p. 64–78, 2006.

MALEKIAN, F. et al. Lipase and Lipoxygenase Activity, Functionality, and Nutrient

Losses in Rice Bran During Storage. **LSU AgCenter Research and Extension**, n. 870, p. 1–69, 2000.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105–114, 2002.

MARGULIS, M. A.; MAXIMENKO, N. A. The influence of ultrasound on oscillating reactions. Appendix: Measurement of ultrasound absorbed power (Calorimetric method). **Advances in Sonochemistry**, v.2, p.253- 291, 1991.

MARTINES, M. A. U. et al. O Efeito Do Ultra-Som Em Reações Químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251–256, 2000.

MASON T J. Large scale sonochemical processing: Aspiration and actuality. **Ultrason Sonochem**, v. 7, n. 4, p. 145–9, 2000.

MATSUURA, K. et al. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 1, p. 36–40, 1994.

MULLER, J.L. Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator tipo air lift e em frascos agitados mecanicamente. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**, Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

MUÑOZ, J. A. V. Caracterização Multiparamétrica por Ultra-som do Processo de Fermentação Alcoólica Mediante Sistema Híbrido de Processamento de Sinais. 150 f. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NUNES, R. M. et al. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–123, 2013.

OLIVEIRA, V. S. et al. Efeito do ultrassom de baixa frequência de alta potência de processamento na estabilidade do licopeno puro e em tomates. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, vol. 1 num. 2, Florianópolis, 2014.

PAZUCH, C. M. Otimização da fermentação acética para a produção de vinagre de farelo de arroz e avaliação do potencial antioxidante. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2015.

PEDRO, C. R. L. Ação de ultra-som em leveduras no processo de fermentação etanólica. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

PINTO, G. A. S. et al. Solid state fermentation: An alternative to reuse and valorization

of tropical agroindustrial residues. **Embrapa Comunicado Técnico**, v. 102, p. 1–5, 2005.

PITT, W. G.; ROSS, S. A. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 3, p. 1038–44, 2006.

RABELO, S. C., ANDRADE, R. R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349-357. 2014.

RAÍZEN. **Tecnologia em energia renovável - Etanol de segunda geração**. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: 14 out. 2017.

RASO, J. et al. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, n. 4, p. 157-162, 1999.

ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Avaliação Do Potencial Energético De Resíduos Agroindustriais Provenientes De Diferentes Regiões Brasileiras. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

RODRIGUES, M. F. A. **Produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço**. São Paulo: Centro Nacional De Referência em Biomassa - CENBIO, 2009. Disponível em: <[http://cenbio.iee.usp.br/download/documentos/%20seminbioenergia/filomenarodrigues\\_2608.pdf](http://cenbio.iee.usp.br/download/documentos/%20seminbioenergia/filomenarodrigues_2608.pdf)>. Acesso em: 7 out. 2017.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 887–891, 2001.

RUBIN, C. **A química do bioetanol de segunda geração**. Disponível em: <<http://pre.univesp.br/a-quimica-do-bioetanol-de-segunda-geracao#.WelKZFtSxdg>>. Acesso em: 14 out. 2017.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, vol.35 no.5 São Paulo, 2012.

SANTOS, G. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. 81 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2006.

SANTOS, J. C. O. Síntese e Estudo da Estabilidade Térmica e Oxidativa do Biodiesel Derivado do Óleo de Farelo de Arroz. **Química do Brasil**, v.1, n.2, p. 101-108, 2007.

SCHLÄFER, O. et al. Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors. **Ultrasonics**, v. 38, n. 1–8, p. 711–716, 2000.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. E. A.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Volume

2. São Paulo: Blucher, 554 p. 2001.

SIEPMANN, F. B. Estudo preliminar para produção de vinagre de farelo de arroz desengordurado por processo submerso. 89 f. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2014.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.487–491, 2006.

SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v. 30, n. 3, p. 180–185, 1992.

SOMOGYI, M. A. A. New Reagent for the Determination of Sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

STROPPIA, C. T. et al. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

SUMANTHA, A. et al. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 843–851, 2006.

TANAKA, T. et al. Production of d-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 211–217, 2006.

TECHSPAN. Elmasonic E - Ultrasonic Cleaning Units. **Operating Instructions**. Techspan Group, 200-?.

TOMASIN, A. C. Biorresistência e efeitos causados pela ação acoplada da irradiação ultrasônica e processo eletrolítico no aproveitamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. 2001. 91f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

WOOD, B. E.; ALDRICH, H. C.; INGRAM, L. O. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 3, p. 232–237, 1997.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.