



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



CAROLINE ZABOTTI

PARÂMETROS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO

MEDIANEIRA 2014

CAROLINE ZABOTTI

**PARÂMETROS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE ARROZ PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Medianeira, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Colla

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Canan

MEDIANEIRA

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Rita que fizeram tudo ao seu alcance para que eu pudesse me formar. Ao meu namorado Mateus, que sempre esteve junto comigo quando sempre precisei me apoiando, se preocupando, me ouvindo e aconselhando.

À professora Eliane Colla que esteve presente em parte da minha graduação, sendo professora de disciplinas, orientadora de projeto de iniciação científica e também orientadora deste trabalho. Obrigada pelos conhecimentos que me transmitiu além de toda a seriedade, compromisso, responsabilidade e modo de trabalho.

A Catiussa agradeço toda a força, compromisso e pela grande contribuição com este trabalho, assim como para a Camila e a Andressa que sempre estiveram dispostas a ajudar com o que podiam.

RESUMO

ZABOTTI, Caroline. Parâmetros de hidrólise enzimática de farelo de arroz para produção de etanol de segunda geração. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

A importância atribuída aos biocombustíveis aumentou nos últimos anos em virtude das preocupações mundiais com as consequências do avanço do aquecimento global e da elevação dos preços do petróleo. Porém, a produção destes biocombustíveis convencionais defronta-se com sérias dificuldades para atingir os níveis desejados, pois são originados, em geral, de plantas que exigem áreas de cultivo extensas, limitando a produção de alimentos, o que constitui um forte estímulo à adoção de tecnologias avançadas. Por isso, as pesquisas atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol combustível a partir de biomassas como alternativa para a utilização de combustíveis renováveis. Sendo assim, a produção de álcool etílico a partir de resíduos agroindustriais, como o farelo de arroz, apresenta-se como uma alternativa para transformar o resíduo amiláceo em coproduto, gerando para a indústria os benefícios de uma indústria limpa. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol de segunda geração a partir do farelo de arroz, que se apresenta como uma fonte amilácea e um resíduo agroindustrial, conferindo a importância de agregar valor a este resíduo e contribuir com as pesquisas emergentes para a produção de etanol de segunda geração. Isto foi realizado por meio da investigação do processo de hidrólise do farelo de arroz desengordurado por via enzimática aplicando um DCCR para a avaliação do efeito das variáveis do processo (concentração da enzima alcalase, tempo de exposição ao ultrassom, e frequência utilizada no ultrassom) visando maximizar o processo de liberação de açúcares fermentescíveis para a etapa subsequente de fermentação alcoólica. As maiores concentrações de açúcares redutores foram alcançadas quando se utilizou a frequência de 80 kHz no banho de ultrassom, verificando-se que as variáveis do DCCR não apresentaram diferença significativa na resposta a 95% de significância, ou seja, a utilização de quaisquer valores para ambas as variáveis do DCCR, dentro da faixa estudada, não apresentaria diferença na resposta, considerações estas também observadas para a resposta percentual de etanol. Ainda confirmou-se a importância da agitação no processo de quebra das moléculas complexas, visto que as maiores concentrações de açúcares redutores foram obtidas através da realização de ensaios em diferentes condições de agitação.

Palavras-chave: Bioetanol. Hidrólise enzimática. Resíduo amiláceo.

ABSTRACT

ZABOTTI, Caroline. Enzymatic hydrolysis of rice bran for production of second generation ethanol parameters of. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2014.

The importance attached to biofuels has increased in recent years due to global concerns about the consequences of global warming advances and rising oil prices. However, the production of these conventional biofuels is faced with serious difficulties to achieve the desired levels because originate in general, plants that require extensive cultivation areas, limiting food production, which is a strong stimulus to the adoption of advanced technologies. Therefore, the current research indicate emerging technology as the production of fuel ethanol from biomass as an alternative to the use of renewable fuels. Thus, the production of ethyl alcohol from agricultural residues such as rice bran, presents as an alternative to transform the starch residue coproduct generating industry for the benefit of a clean industry. Therefore, the objective of this study was to evaluate the second-generation ethanol from rice bran, which is presented as a starchy source and an agricultural residue, giving the importance of adding value to this residue and contribute to the emerging research for second-generation ethanol. This was done by investigating the hydrolysis process of the defatted rice bran enzymatically applying a CCRD to evaluate the effect of process variables (concentration of the enzyme Alcalase, the ultrasound exposure time, and the frequency used in ultrasound) aiming process maximize the release of fermentable sugars for subsequent fermentation step. The highest concentrations of reducing sugars were achieved when using the frequency of 80 kHz in the ultrasonic bath, verifying that the CCRD variables showed no significant difference in response to 95% of significance, that is, the use of any values for both CCRD variables within the range studied, would not present difference in response, these considerations also observed for the percentage of ethanol response. Also confirmed the importance of the unrest in the breaking process of complex molecules, whereas the highest concentrations of reducing sugars were obtained by testing in different conditions of agitation.

Keywords: Bioethanol. Enzymatic hydrolysis. Starchy residue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do processamento do bioetanol.....	19
Figura 2 - Beneficiamento do arroz em casca com as proporções aproximadas de seus produtos e subprodutos.....	21
Figura 3 – Estrutura do grão de arroz.....	22
Figura 4 – Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b).....	24
Figura 5 – Representação esquemática da fermentação e da respiração.....	31
Figura 6 – Curva de ajuste para uma cinética de fermentação idealizada X, P e S referente às concentrações de células, produtos e substrato, respectivamente.....	34
Figura 7 – Curva de crescimento típica de um microrganismo em cultivo descontínuo.....	35
Figura 8 – Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.....	41
Figura 9 – Ensaio incubados em <i>shaker</i> para realização da fermentação alcoólica.....	42
Figura 10 – Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa celular.....	44
Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em função das concentrações de alcalase ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$) e tempo de exposição ao banho ultrassônico (min).....	49
Figura 12 – Acompanhamento da concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante a fermentação alcoólica.....	54
Figura 13 – Acompanhamento da concentração celular durante a fermentação alcoólica.....	56
Figura 14 – Chapa de aquecimento com agitação magnética (a) Teste no banho termostático com agitação mecânica (b) <i>shaker</i> com agitação orbital (c).....	60
Figura 15 – Banho termostático com agitação de 100 RPM.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das enzimas amilolíticas fúngicas.....	29
Tabela 2 – Concentração de nutrientes e minerais necessários para obtenção de um processo fermentativo adequado à levedura.....	33
Tabela 3 – Variáveis do DCCR para o estudo da etapa de sacarificação enzimática do farelo de arroz (níveis reais e codificados).	39
Tabela 4 – Matriz do DCCR 2 ² com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no processo de hidrólise do farelo de arroz.	39
Tabela 5 – Matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis, resposta de concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a frequência de 37 kHz.....	45
Tabela 6 – Coeficientes de regressão para a resposta A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	47
Tabela 7 – ANOVA do modelo quadrático para concentração de A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	47
Tabela 8 – Matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis, resposta de concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), para a frequência de 80 kHz.	50
Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a resposta A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).	51
Tabela 10 – Concentrações de Açúcares redutores em 12 horas de fermentação.	53
Tabela 11 – Acompanhamento da concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada ensaio em função do tempo de fermentação.....	55
Tabela 12 – Porcentagem de etanol em 12 h de fermentação.	57
Tabela 13- Matriz de ensaio do DCCR com os níveis reais e codificados das variáveis sob a resposta % de etanol, nos tempos 6 e 12 horas de fermentação.	58
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para a resposta percentual de etanol em 6 h de fermentação.	59

Tabela 15 - Coeficientes de regressão para a resposta percentual de etanol em 12 h de fermentação.59

Tabela 16 – Comparação das condições de realização da etapa de hidrólise enzimática para o ensaio 8 do DCCR na frequência de 80 kHz.61

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E ACRÔNIMOS

FAD – Farelo de Arroz Desengordurado

2G – Segunda Geração

AMG – Amiloglicosidase

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

AR – Açúcar Redutor

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ – grama por litro

$\mu\text{L}\cdot\text{g de farelo}^{-1}$ – Microlitro por grama de farelo

$\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ – Microlitro por litro

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ – Miligrama por litro

$\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ – Mililitro por litro

$\text{mL}\cdot\text{min}$ – Mililitro por minuto

μL – Mililitro

μm – Micrometro

min – Minutos

RPM – Rotação por minutos

D.O – Densidade ótica

UPLC – Cromatógrafo Líquido de Ultra-alta pressão

ATP – Adenosina trifosfato

A. niger – *Aspergillus Niger*

A. oryzae – *Aspergillus Oryzae*

Kg/mol – Quilograma por mol

kHz – quilo hertz

nm - nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
4.1	PANORAMA DA PRODUÇÃO DE ETANOL	17
4.1.1	Vantagens e desvantagens da produção de etanol e bioetanol	18
4.2	PANORAMA DO FARELO DE ARROZ	21
4.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FARELO DE ARROZ	23
4.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E ENZIMAS AMIOLÍTICAS	23
4.4.1	Enzimas amilolíticas	26
4.5	Alcalase	29
4.6	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	30
4.6.1	Fatores que interferem no processo	32
4.6.2	Cinética dos processos fermentativos	33
4.7	UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM EM BIOPROCESSOS	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	MATÉRIA PRIMA	38
5.2	MICRO-ORGANISMO	38
5.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ	38
5.4	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO HIDROLISADO	42
5.5	TESTES REALIZADOS PARALELAMENTE AOS PLANEJAMENTOS	43
5.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	43

5.6.1	Determinação de biomassa celular	43
5.6.2	Determinação da concentração de açúcares redutores.....	44
5.6.3	Determinação da concentração de etanol	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ – FREQUÊNCIA 37 kHz.	45
6.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ – FREQUÊNCIA 80 kHz ..	49
6.3	COMPARAÇÃO DO USO DAS DIFERENTES FREQUÊNCIAS UTILIZADAS NO BANHO ULTRASSÔNICO	51
6.4	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO HIDROLISADO	53
6.4.1	Concentração de açúcares redutores	53
6.4.2	Determinação de biomassa celular.....	55
6.4.3	Determinação de Etanol.....	56
6.5	TESTES REALIZADOS PARALELAMENTE AOS PLANEJAMENTOS.....	60
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
8	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis aumentou o nível de gases de efeito estufa na atmosfera da Terra. Esses fatos, juntamente com o esgotamento inevitável do abastecimento de energia do mundo, e do mercado de petróleo instável, renovaram o interesse da sociedade na busca de combustíveis alternativos. O etanol tem sido considerado como uma alternativa adequada aos combustíveis fósseis quer como único combustível em carros com motores dedicados, ou como aditivo em combustível com nenhuma exigência de modificação do motor quando misturado em até 30%. Hoje, o bioetanol é o biocombustível mais dominante e sua produção global mostrou uma tendência de crescimento ao longo dos últimos 25 anos, com um aumento acentuado a partir de 2000. A capacidade de produção mundial em 2005 e 2006 foi de cerca 45 e 49 bilhões de litros por ano, respectivamente, e a produção total em 2015 deverá atingir mais de 115 bilhões de litros (TELEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

A produção de álcool combustível a partir de recursos renováveis tem recebido considerável interesse nos últimos anos. Os custos das matérias primas, bens de capital e de processamento, influenciam significativamente na rentabilidade da produção de álcool combustível. Amido e outras matérias primas à base de hidratos de carbono podem ser convertidos em álcool de combustível com um elevado grau de eficiência (HERNANDEZ CARRILLO; SERNA-SALDIVA, 2009).

Materiais à base de açúcar e amido, como cana e grãos são dois grupos de matérias primas usadas atualmente como os principais recursos para a produção de etanol. O terceiro grupo é o de materiais lignocelulósicos e subprodutos, representando a melhor alternativa para a produção de etanol. A crescente demanda por alimentos faz dos dois primeiros grupos de matérias primas insumos caros e menos competitivos em um futuro próximo em comparação com materiais lignocelulósicos e subprodutos agroindustriais para a obtenção de etanol, já que estes não competem diretamente com a agricultura (TELEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

Neste contexto, surge o farelo de arroz, que é resultado das partículas sólidas do polimento do arroz, o qual pode ser aplicado como uma fonte de amido para a produção de etanol, pois é classificado como um biomaterial não comestível, como subproduto agrícola, resíduo florestal, ou cultura energética. Sua composição é caracterizada por açúcares complexos, tornando necessária a quebra destes açúcares para a etapa de fermentação alcoólica, pois a levedura *S. cerevisiae* carece de enzimas amilolíticas (α -amilase e

glucoamilase). O resíduo do polimento de arroz contém apenas α -glicosidase, necessitando que outras enzimas amilolíticas sejam adicionadas (especialmente α - e β -amilase) para um processo de sacarificação completo (WATANABE et al., 2009).

Um gargalo importante na conversão de biomassa em etanol é o custo da hidrólise enzimática da biomassa. Embora a hidrólise enzimática tenha várias vantagens em relação à hidrólise ácida (tal como a redução do impacto ambiental e a diminuição da formação de produtos com efeito negativo sobre a fermentação), os custos e a eficiência deste processo, ou seja, a determinação das melhores condições, ainda requer melhoria (OKAMOTO et al., 2011).

Por isso, o objetivo deste estudo é determinar as melhores condições do processo de sacarificação do farelo de arroz para obter máxima quantidade de açúcares fermentescíveis, visando melhorar o rendimento em bioetanol na etapa de fermentação alcoólica. Isto foi realizado pela aplicação de um Delineamento Composto Central Rotacional onde se avaliou os efeitos das variáveis concentração de Alcalase e tempo de exposição ao banho ultrassônico, em diferentes frequências sobre a resposta de concentração de açúcares redutores liberados e o percentual de etanol.

2 JUSTIFICATIVA

A preocupação atual com a preservação e proteção do meio ambiente aumenta a demanda por pesquisas de fontes alternativas para a produção de combustíveis, que sejam sustentáveis economicamente e ambientalmente. Assim, os resíduos de biomassa agrícola aparecem como uma importante alternativa de matéria prima para energia renovável e biocombustível. Uma alternativa de transformação de resíduos amiláceos em coproduto é a produção de etanol a partir de resíduos agroindustriais, que além de reduzir os impactos ambientais aumenta a produção da indústria alcooleira.

Neste contexto, o farelo de arroz se destaca como importante subproduto, proveniente do beneficiamento do arroz, é uma alternativa para a produção de etanol de segunda geração devido a sua rica composição em amido. Porém estes açúcares não são passíveis de fermentação pelas leveduras comumente utilizadas para a obtenção de etanol (açúcares complexos), sendo necessária a transformação a mono e dissacarídeos fermentáveis, o que pode ser realizado pela ação de enzimas amilolíticas (via hidrólise enzimática).

Por isto este trabalho é justificado pela importância de buscar a otimização do processo de hidrólise enzimática deste resíduo para a produção de etanol de segunda geração e conseqüentemente no desenvolvimento de processos de produção de bioetanol a partir de fontes menos dispendiosas e renováveis, ou seja, agregação de valor a este resíduo e a contribuição com pesquisas emergentes para a produção de combustíveis renováveis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo preliminar para a produção de etanol de segunda geração a partir do farelo de arroz desengordurado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o processo de hidrólise do farelo de arroz desengordurado por via enzimática, aplicando uma estratégia de planejamento experimental para a avaliação do efeito das variáveis do processo (concentração da enzima protease, tempo de exposição ao ultrassom e frequência utilizada no ultrassom) visando maximizar o processo de liberação de açúcares fermentescíveis para a etapa subsequente de fermentação alcoólica;
- Realizar a fermentação alcoólica do hidrolisado de farelo de arroz utilizando cepas de *Sacharomices cerevisiae*;
- Determinar a concentração de etanol, açúcares redutores e biomassa microbiana para o acompanhamento da fermentação alcoólica e para determinar a eficiência do processo de sacarificação enzimática.

4 REFERÊNCIAL TEÓRICO

4.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO DE ETANOL

No contexto sócio econômico, a questão energética é um assunto de grande importância. Mais da metade do consumo de energia mundial, cerca de 55%, é proveniente dos derivados de petróleo e do gás natural. Sabe-se, porém que as reservas de combustíveis fósseis são limitadas e que a previsão de pesquisadores é de que durarão apenas mais algumas décadas. O uso destes combustíveis é a principal causa de emissão dos gases de efeito estufa, causadores das mudanças climáticas (ORTIZ, 2010).

O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando apenas álcool como combustível ou sob a forma de uma mistura contendo de 22% a 25% de álcool na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO₂ (SILVA, 2010).

Este avanço deve-se principalmente ao fato de o Brasil ter sido pioneiro na implementação de um programa de bioenergia em larga escala, o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975. Este programa foi incentivado pela elevação do preço do petróleo e para reduzir a dependência deste combustível da matriz energética nacional. Até então, a produção de biocombustíveis era praticamente insignificante. Em apenas dez anos de programa, cerca de 96% da frota de veículos brasileiros era movida a álcool (ORTIZ, 2010).

Nesta década houve um grande incentivo à modernização do setor sucroalcooleiro e desde então, o país desenvolveu suas técnicas agrônomicas e industriais referente à cultura de cana-de-açúcar, sempre aprimorando a qualidade do produto final (açúcar e etanol), além de buscar novas fontes de matérias primas para fins energéticos, com o intuito de reduzir a dependência do petróleo (OMORI et al., 2011). O programa também foi o responsável pela expansão da cultura da cana-de-açúcar, ocorrida a partir de 1975 e teve importante repercussão na geração de empregos no meio rural e na substituição de culturas alimentares pela cultura da cana-de-açúcar (CARVALHO; CARRIJO, 2007).

Com a diminuição do preço do barril de petróleo, no final dos anos 90, e com a falta de uma política energética objetiva para o país, o Proálcool decaiu, estagnando em 1995, com apenas 3,3% de veículos movidos a álcool (ORTIZ, 2010).

Atualmente, o mercado do etanol combustível sofre incentivos devido às inovações das tecnologias do motor flex, que permitiram o uso de etanol, gasolina ou mistura dos dois (OMORI et al., 2011).

4.1.1 Vantagens e desvantagens da produção de etanol e bioetanol

Sob o ponto de vista ambiental, são reconhecidas as vantagens do álcool, seja quando empregado isoladamente sob a forma de álcool hidratado, seja quando misturado à gasolina sob a forma de álcool anidro. Em ambos os casos, apresenta imensa vantagem por reduzir a emissão de monóxido de carbono e dispensar o emprego do chumbo tetraetila como aditivo. Além dessa vantagem, o álcool combustível propicia redução na emissão de poluentes primários e também redução considerável nas chamadas emissões poluidoras reativas. Em termos gerais, portanto, o álcool é uma fonte de produção de energia mais limpa (MACHADO; ABREU, 2006).

Atualmente, o Brasil produz cerca de 25 bilhões de litros de etanol de primeira geração por ano a partir da cana-de-açúcar. O plantio dessa matéria prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deve ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional por álcool, tornando sua produção desvantajosa devido a grande extensão territorial que esta matéria prima ocupa, limitando, portanto, o cultivo de outros produtos (SILVA, 2010).

Surge, nesse contexto, o etanol de segunda geração, que utiliza os resíduos de plantações e das indústrias para a produção de bioetanol. Os biocombustíveis ou etanol de segunda geração permitem aumentar a produção de etanol sem a necessidade de aumentar a área plantada, o que disponibilizaria essas áreas para outros fins, como a produção de alimentos. Esses resíduos tratam-se do aproveitamento de biomassa da agropecuária ou dos resíduos de outros processos, como bagaço de cana, palha de cereais, farelo de trigo, farelo de arroz e sabugo de milho (FERREIRA, 2012).

O etanol de primeira e de segunda geração (constituente do grupo dos biocombustíveis) diferem-se pela forma que são obtidos. Quando na fonte de produção têm-se os açúcares necessários para a fermentação livres, como no caso do caldo da cana-de-açúcar, denomina-se o produto final como bioetanol ou biocombustível de primeira geração. Quando a etapa de sacarificação é necessária, ou seja, a glicose encontra-se em forma de amido ou celulose, como no caso dos resíduos agroindustriais, denomina-se bioetanol ou

biocombustível de segunda geração (ORTIZ, 2010). Esta diferença pode ser visualizada na Figura 1.

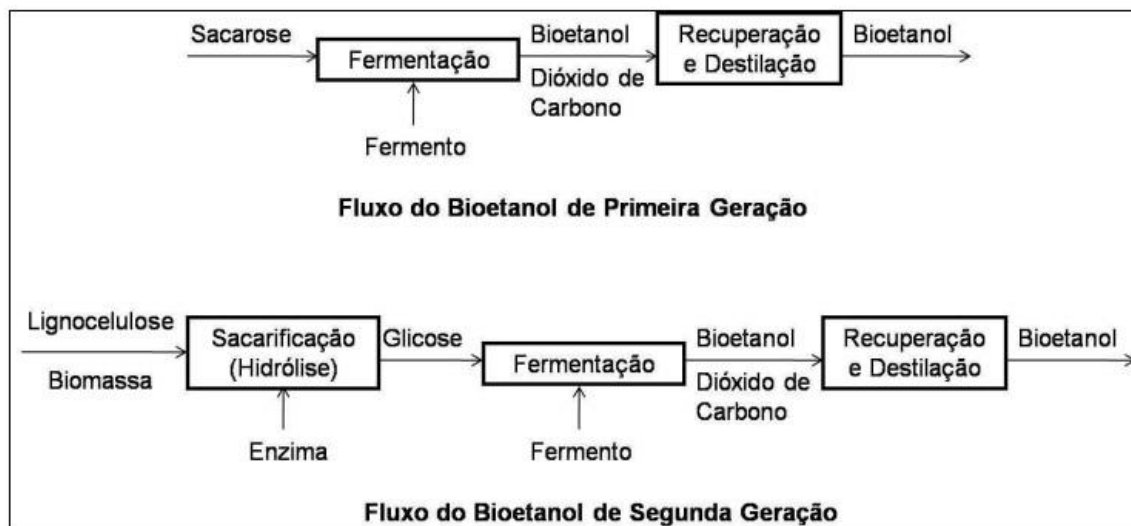


Figura 1 – Etapas do processamento do bioetanol

Fonte: Ortiz (2010)

No território brasileiro existe uma grande biodiversidade que gera resíduos variados. Pesquisas na área de produção de bioetanol focam seus objetivos em utilizar estes resíduos como coproduto para produção de bioetanol, por ser matéria-prima de baixo custo, com o objetivo de tornar seu processo viável financeiramente. Como exemplo, podem-se citar resíduos de beterraba, cevada, aveia, batata, milho, arroz, mandioca, entre outros. A utilização destes resíduos para produção de bioetanol, além dos fatores positivos já citados, são disponibilizados pela indústria alimentícia, não havendo necessidade de desmatamento para a ampliação de áreas plantadas para sua obtenção. Portanto, produzir bioetanol a partir de biomassa é de grande interesse para o país, uma vez que no território brasileiro existe uma grande biodiversidade, o que gera variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais (ORTIZ, 2010).

A utilização ampla do potencial da biomassa florestal para a geração de energia é um dos exemplos para a adoção de um modelo energético sustentável para o país, o qual priorize a diversificação das fontes, a desconcentração e descentralização da geração de energia, a preservação ambiental e o atendimento às camadas mais necessitadas da população (BENEDETTI et al., 2009).

O aumento dos custos na cadeia produtiva de alimentos ricos em amido e o incremento de novas tecnologias empregadas no setor agrícola desencadeou um aumento na

obtenção de produtos e subprodutos. Portanto, há a necessidade de agregar valor aos resíduos desta cadeia já que os teores médios de amido encontrados mostram uma grande potencialidade para a produção de etanol (WERLE et al., 2012).

Recentemente, o Brasil começou a investir em pesquisas voltadas ao etanol de segunda geração e possui vantagens comparativas na corrida pelo desenvolvimento do mesmo. Mesmo que este tipo de pesquisa ainda seja muito novo, o país possui enorme disponibilidade de matéria-prima barata, além de ter infraestrutura muito bem estabelecida na produção de etanol. O governo brasileiro busca ampliar a quantidade de etanol fabricada sem aumentar a área de plantio, o que aumentaria a competitividade do etanol (OMORI, et al., 2011).

Portanto as pesquisas em laboratório estão voltadas para a utilização destes subprodutos como alternativa econômica para produção de biocombustível em um processo que envolve várias etapas, tais como, pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica. Um dos desafios da produção de bioetanol a partir de biomassa consiste em determinar o melhor processo para obtenção dos monossacarídeos. O processo de hidrólise escolhido deve ser economicamente viável, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado (SILVA, 2010).

Genericamente o processo para obtenção de bioetanol é constituído de três partes: preparo do substrato, fermentação e destilação do fermentado. No preparo do substrato, há a realização da hidrólise enzimática da matéria prima para dela obter os açúcares fermentescíveis. A fermentação é o processo pelo qual os carboidratos são transformados em álcool e gás carbônico pela ação de micro-organismos. Finalmente, na destilação, o etanol é separado do caldo de fermentação e purificado (MACHADO; ABREU, 2006).

Portanto na hidrólise enzimática, a molécula de celulose ou de amido, dependendo da fonte utilizada no processo, é “quebrada” em açúcares menores (sacarificação) passíveis de fermentação. Na etapa de fermentação, os substratos açucarados são convertidos em etanol e dióxido de carbono, por processo anaeróbio. Esta transformação envolve uma sequência de 12 reações, sendo estas catalisadas por enzimas. A mesma ocorre no citoplasma da célula, onde se localizam estas enzimas, denominadas de enzimas glicolíticas. Por fim, a etapa da destilação que consiste na separação de misturas líquidas de substâncias voláteis em seus componentes individuais, por vaporização. Neste caso, o objetivo é remover o álcool da água, resultantes da etapa de fermentação. A pureza do álcool é de aproximadamente 96 °GL e o processo ocorre em sistema multi-colunas. O álcool obtido da destilação passa através de um

sistema de desidratação, para remover a água restante. O álcool desidratado é chamado etanol anidro, com pureza da aproximadamente 99,6 °GL (ORTIZ, 2010).

4.2 PANORAMA DO FARELO DE ARROZ

Dentre os cereais cultivados, o arroz (*Oryza sativa*, L.) destaca-se por ser alimento básico da maioria da população em várias regiões do planeta. No Brasil, o consumo médio varia de 74 a 76 kg/habitante/ano, tomando-se por base o grão em casca. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Arroz Parboilizado (Abiap), 23% do consumo de arroz do Brasil é do cereal que passa por parboilização, sendo este índice significativo, visto que há 25 anos, o produto representava apenas 4% do mercado (DORS; PINTO; FURLANG, 2009).

Segundo as estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de março de 2013/14 o Brasil produziu aproximadamente 12,8 milhões de toneladas de arroz, apresentando um acréscimo de 8% em relação à safra de 2012/13.

O farelo, um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, representa de 8% a 11% do peso total do grão, sendo obtido a partir do seu polimento. A sua obtenção ocorre na etapa de brunição, onde o arroz já descascado (integral) é lixado por máquinas compostas por pedras abrasivas que retiram o farelo (Figura 2), o qual é composto pelo germe e película. Então o farelo é separado do arroz branco, que após passar pelo processo de polimento, torna-se o componente da alimentação humana (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009).

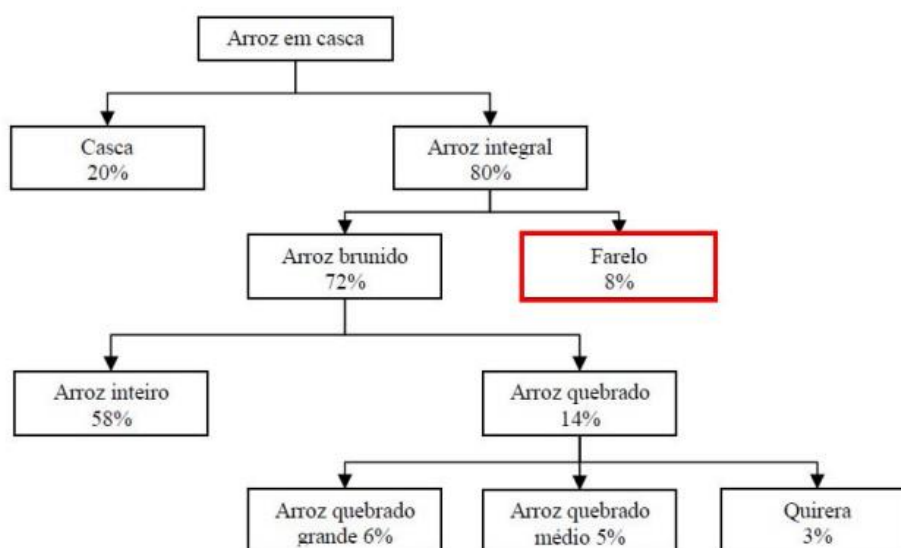


Figura 2 - Beneficiamento do arroz em casca com as proporções aproximadas de seus produtos e subprodutos

Fonte: Silva (2012)

O farelo de arroz apresenta aspecto farináceo, fibroso e suave ao tato. O pericarpo, o tegumento, a camada de aleurona e o gérmen (embrião) são eliminados durante a operação de polimento na forma de farelo de arroz, separados por peneiramento, restando o endosperma (grão de arroz polido) como pode ser visualizado na Figura 3 (PESTANA et al., 2008).

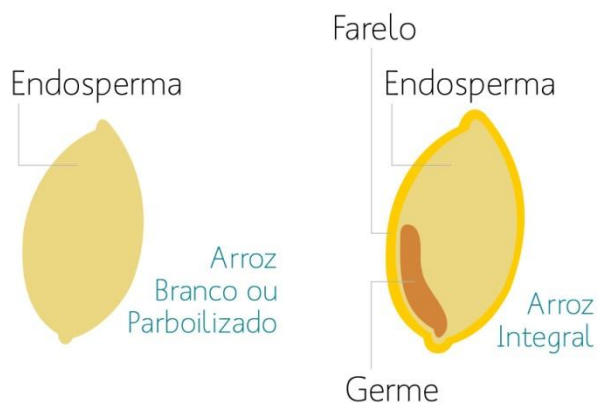


Figura 3 – Estrutura do grão de arroz

Fonte: Küster (2011)

O grão inteiro é constituído por diversos tecidos, que apresentam estrutura, composição química e funções diferenciadas. A casca constitui de 15 a 30% do peso do grão (dependendo da variedade, práticas culturais, localização geográfica, estação do ano e temperatura). Minerais e celulose são os maiores componentes da casca. O pericarpo (farelo) é composto por camadas que envolvem o endosperma amiláceo do grão de arroz, sendo rico em proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais, constituindo de 5 a 8% do peso do grão. As células do endosperma são uma excelente fonte de carboidratos complexos representados principalmente pelo amido (DORS; PINTO; FURLANG, 2009).

Nas regiões onde o arroz é altamente consumido, grandes quantidades de farelo são desprezadas em função da falta de controle sanitário no seu beneficiamento e da fácil rancificação do produto. No Brasil, o farelo de arroz é mais utilizado para extração de óleo, como ingrediente da ração animal e como fertilizante orgânico. O mesmo apresenta-se em abundância e com baixo valor comercial devido a limitações relacionadas à falta de controle das condições sanitárias de recolhimento e às dificuldades relativas à contaminação deste farelo, que apresenta resíduos de casca e/ou amido (MOTA E PILLETI, 2012).

Pesquisas que envolvam a viabilização da utilização do farelo de arroz, na alimentação humana, podem garantir ao consumidor um produto seguro, do ponto de vista

nutricional, microbiológico e sensorial, além de auxiliar no planejamento de estratégias de promoção da saúde pública (LACERDA, et al., 2010).

4.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO FARELO DE ARROZ

A sua composição química depende de fatores associados à própria constituição do grão ou ao processo de beneficiamento. A variedade genética e as condições ambientais nas quais a planta foi cultivada também influenciam a composição química e a distribuição dos componentes químicos do grão de arroz (SILVA et al., 2012).

O farelo de arroz é um produto rico em fibras, nutrientes, minerais e vitaminas, sendo um alimento muito barato e abundante no Brasil. Possui quantidades significativas de carboidratos, proteínas e lipídios, especialmente ácidos graxos insaturados, alta concentração de fibras insolúveis, vitaminas e sais minerais (LACERDA, et al., 2010). Contém um grande número de Ca^{2+} , Mg^{2+} , fosfato, sílica, Zn^{2+} , tiamina e niacina (JIEUN et al., 2008).

Também são encontrados alguns outros componentes alimentares bioativos como γ -orizanol, tocoferóis, tocotrienóis, polifenóis, fitosteróis e carotenóides, além de aminoácidos essenciais (triptofano, histidina, metionina, cisteína e arginina) e micronutrientes (magnésio, cálcio, fósforo, manganês e vitaminas do complexo B) (SILVA, 2012).

Silva et al. (2012) determinaram a composição química do farelo de arroz *in natura*, encontrando teores médios de 49,80% de carboidratos e teores médios de 14,94% de proteínas. Silveira e Furlong (2007) encontraram cerca 47% de carboidratos e 15% de proteínas para o farelo de arroz desengordurado. Esta grande quantidade de carboidratos justifica a utilização deste subproduto como um substrato de potencial e interesse para a utilização em processos fermentativos.

4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E ENZIMAS AMIOLÍTICAS

No conceito de carboidratos complexos incluem-se o amido e os polissacarídeos, os quais possuem diferenças em suas estruturas químicas e em seus efeitos fisiológicos. O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. Nos vegetais, o amido encontra-se em pequenos grânulos, de características peculiares a cada espécie, contendo as duas frações que o constituem: amilose (de 15 a 30%) e amilopectina (de 70 a 85%) (COSTA, 2010).

Apresenta estrutura granular semicristalina e é composto pelas macromoléculas amilose e amilopectina. A fração amilose é um polímero de glicose de cadeias lineares formada por ligações glicosídicas α -1,4, com massa molar entre 10^1 e 10^2 kg/mol. A amilopectina, de estrutura ramificada, representa a maior fração de amido com massa molar entre 10^4 e 10^6 kg/mol (Figura 4) (CORRADINI et al., 2005).

Resumidamente o amido é um polímero de glicose, que possui configuração ramificada formada por ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. A Figura 4 apresenta a estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b).

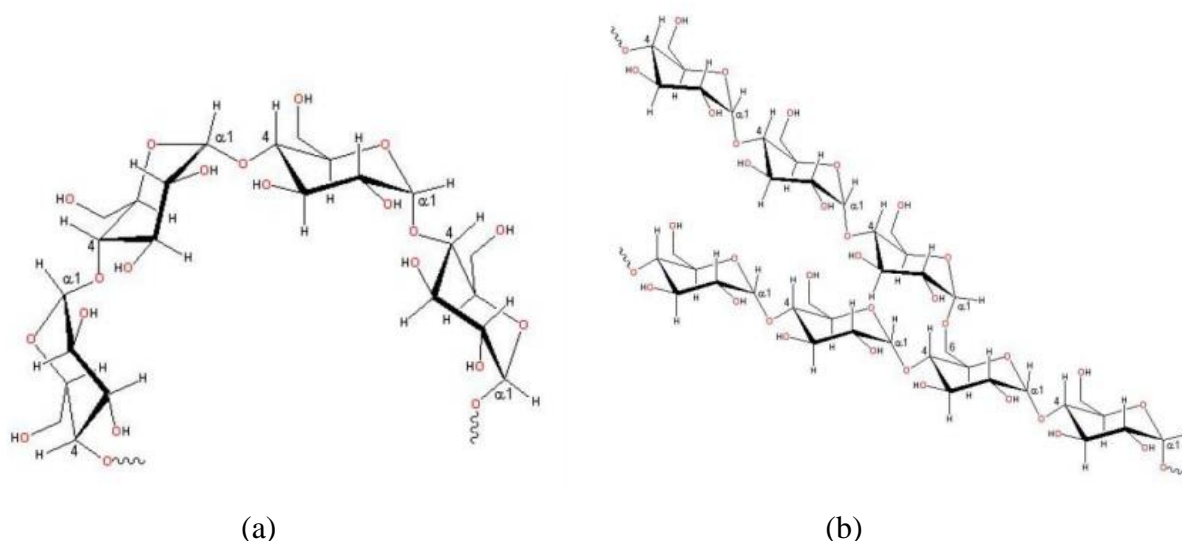


Figura 4 – Estrutura química da amilose (a) e da amilopectina (b)

Fonte: Costa (2010)

Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos (açúcares) constitui-se em matéria prima para a obtenção de álcool. Porém, como visto, estas matérias primas geralmente contêm carboidratos complexos em sua composição, não sendo disponíveis como fonte de energia para levedura na produção de etanol. Isto leva à necessidade da transformação dos açúcares complexos a mono e dissacarídeos fermentescíveis, que pode ser realizada utilizando enzimas no processo de hidrólise. A hidrólise é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos à fermentação (NUNES et al., 2009).

Esta hidrólise é realizada comumente por duas vias: enzimática e química. Almeida (2009) define a hidrólise enzimática como sendo uma reação química, em meio aquoso, para a quebra de uma molécula em frações menores catalisada por enzimas. Estas enzimas, ao

contrário dos catalisadores comuns, apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos bem como os problemas de tratamento de efluentes. No caso da hidrólise enzimática a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (RIBEIRO, 2010).

Os hidrolisados enzimáticos estão entre os amidos modificados mais valorizados comercialmente em relação aos hidrolisados químicos em virtude da variedade e pureza dos produtos obtidos, desde açúcares derivados do amido até ciclodextrinas, fornecendo produtos finais com maior qualidade. A hidrólise por via enzimática também permite o uso de uma mesma linha de produção, a fabricação de uma ampla gama de hidrolisados, enquanto que por via ácida somente a produção de glicose e dextrinas é possível. Ainda, a neutralização de uma hidrólise ácida produz quantidades significativas de sal no produto final e necessita de uma maior quantidade de carvão ativado para remoção de compostos coloridos e odores indesejáveis (ALMEIDA, 2009).

Portanto, a hidrólise enzimática é de maior relevância em relação às demais porque, além de apresentar as características já citadas, também é capaz de se desenvolver nas condições brandas de temperatura e de concentração iônica existentes, necessárias aos processos celulares (COLLARES, 2011).

Costa (2010) demonstrou que a hidrólise enzimática fornece conversões de amido em glicose com 70 a 90% de eficiência, enquanto que a hidrólise ácida fica apenas em torno de 58% de eficiência de conversão e que as maiores conversões da hidrólise enzimática geram, conseqüentemente, maiores concentrações de açúcar, que não deve ser usado sem diluição, pois leva à inibição do metabolismo da levedura.

Para haver o aproveitamento do amido como fonte energética, dado o seu teor de glicose, usam-se micro-organismos que, ou são capazes de hidrolisar o amido que é disponível, ou são capazes de fermentar, isto é, transformar em outros produtos o amido hidrolisado disponível. São muitos os micro-organismos capazes de realizar as duas opções, porém menos difundidos em relação aos capazes de fermentar (COLLARES, 2011).

Para realizar a conversão dos açúcares complexos em fermentescíveis por hidrólise enzimática, é necessário o uso das enzimas amilolíticas comerciais α -amilase e amiloglicosidase, sintetizadas pelos micro-organismos, *Bacillus licheniformes* e *Aspergillus niger* respectivamente, largamente utilizados para obtenção de glicose a partir de fontes amiláceas (ALMEIDA, 2009).

4.4.1 Enzimas amilolíticas

As enzimas são proteínas sintetizadas em células vivas com estruturas protéicas, as quais podem ser primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias, dependendo da atividade catalítica para qual são destinadas. A atividade catalítica depende da integralidade de sua conformação protéica nativa, sendo que esta pode ser perdida caso haja a desnaturação ou dissociação das mesmas em subunidades. A estrutura e o centro ativo enzimático são decorrentes de sua estrutura tridimensional, e podem ser afetados por agentes capazes de provocar alterações conformacionais na proteína. Isso torna a atividade enzimática dependente das características do meio, principalmente o pH e a temperatura reacionais. As enzimas catalisam reações químicas específicas sem serem consumidas, além de não haver a formação de produtos colaterais, e agem em soluções aquosas diluídas (tampões), em condições muito suaves de temperatura e pH, sendo que cada enzima possui uma temperatura e um pH ótimos, onde sua atividade é máxima, ou seja, a velocidade da reação a qual está catalisando é máxima (FRADE, 2011).

As enzimas são obtidas de três grandes fontes: Vegetais superiores, animais superiores e de micro-organismos (podem ser de origem fúngica ou bacteriana). Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana. A atividade enzimática ótima das enzimas microbianas ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos micro-organismos (SPIER, 2005).

As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio (SPIER, 2005).

4.4.1.1 α – Amilase

Define-se α -amilase (1,4- α -glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1.) como sendo uma enzima que quebra as ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união α -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva (tipo endoenzima) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose (LEÃES, 2012). Após a

ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas. As α -amilases podem ser encontradas nos mamíferos, vegetais superiores, fungos, bactérias e crustáceos (PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2005).

O pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0. Possui caráter ácido e é solúvel em água (LEÃES, 2012). Sua atividade diminui rapidamente acima de 50 °C. A faixa ótima de temperatura para sua atividade é de 55 a 70 °C, que varia dependendo da fonte. Santana (2012) cita um estudo da estabilidade da enzima com o aumento da temperatura até 80 °C. As amilases fúngicas perderam sua atividade em 80 °C e mantiveram somente 1% de sua atividade, enquanto que nesta mesma temperatura, as amilases bacterianas preservaram 92% de sua atividade.

Isto pode ser visualizado no Quadro 1 que ilustra as temperaturas de inativação, temperaturas ótimas, faixas e valores de pH ótimos da enzima α -amilase dependendo de sua fonte de obtenção.

Origem	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Temperatura de Inativação (°C)
Pancreática	6,9 (7,0-8,8)	46	55
Fúngica	5,0 (5,5-8,5)	55	82
Malte	5,0 (4,9-9,1)	60	80
Bacteriana	7,0 (4,8-8,5)	70	93

Quadro 1 – Condições de processo da enzima α -amilase obtida de diferentes fontes

Fonte: Leães (2012)

No mesmo estudo, os autores verificaram que as enzimas α -amilase e amiloglucosidase, parcialmente purificadas, exibiram máxima atividade na faixa de pH entre 4,5-6,0, apresentando grande estabilidade sob condições ácidas (pH 4,0 a 7,0). A máxima atividade ocorreu em temperaturas entre 50 e 60 °C, apresentando estabilidade por mais de 10 horas a 55 °C (SANTANA, 2012).

Os íons de cálcio atuam como cofatores das α -amilases, estabilizando-as, dentro de certos limites, contra a desnaturação pelo calor e álcalis. O cálcio não participa diretamente na formação do complexo enzima substrato, mas mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade. Traços de cálcio presentes no amido são suficientes para compensar enzimas (LEÃES, 2012).

4.4.1.2 Amiloglucosidase

A glucoamilase é também conhecida como amiloglucosidase, enzima glucogênica, amido glucogenase, gama-amilase e exo-1,4- α -D-glucano glucohidrolase (EC. 3.2.1.3). Ao contrário de α -amilase, muitas glucoamilases também são hábeis em hidrolisar as ligações α -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, embora em uma razão menor que as ligações α -1,4, fornecendo quase a degradação completa do amido em glicose. Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas, como maltose, dextrinas e glicogênio, são hidrolisadas pela enzima. Também chamadas de enzimas de sacarificação, elas são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos períodos. Ocorrem em muitos micro-organismos, principalmente em fungos filamentosos, bactérias e no trato digestivo de mamíferos. A amiloglucosidase é, na sua maior parte, produzida por linhagem dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus sp.*, sendo que, dentre essas, a amiloglucosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável (SANTANA, 2012).

As amiloglucosidases provenientes de diferentes fontes apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0. Essas amiloglucosidases incluem as produzidas por *A. niger* e *A. oryzae*. O pH em que a enzima amiloglucosidase de *A. niger* apresenta máxima atividade está entre 3,5 e 5,0. A temperatura ótima da enzima encontra-se, na maioria das vezes, entre 50 e 60 °C (SANTANA, 2012; SPIER, 2005) que incluem a amiloglucosidase de *A. niger*, *A. oryzae*, *Monascus kaoliang*, *Mucor rouxinol*, *Penicillium oxalicum* (LEÃES, 2012).

Segundo Pandey, Soccol e Larroche (2005) as enzimas α -amilases e amiloglucosidases produzidas a partir de micro-organismos são amplamente empregadas em indústrias e são produzidas nas condições mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades das enzimas amilolíticas fúngicas.

FONTE	ENZIMA	PM (kDa)	pH ótimo	TEMP ótima (°C)	INIB.	ESTAB.	REFERÊNCIAS
<i>A. niger</i>	AM	58,0	4,0-5,0	50	-	Ca ²⁺	GUPTA <i>et al</i> (2003)
<i>A. niger</i>	AM	56,23	5,0	60	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺	Ca ²⁺	RAMACHANDRAN <i>et al</i> (1979)
<i>A. niger</i>	AM	-	4,0	60	-	-	Pandey (1990) citado por SOCCOL <i>et al</i> (2005)
<i>A. niger</i>	AM	-	4,5	50	-	-	Takahasi <i>et al</i> (1985) citado por SOCCOL <i>et al</i> (2005)
<i>A. niger</i>	AM	-	3,5-5,0	30-60	-	-	FELLOWS (1994)
<i>A. niger</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)
<i>A. oryzae</i>	AM	52,0-53,0	5,0-6,5	50	-	-	YABUKI <i>et al</i> (1977)
<i>A. niger</i>	AA	-	5,0	55	-	Ativada por Ca ²⁺	SMITH (1991)
<i>A. niger</i>	AA	-	5,0	50	-	-	Bhumibhamon (1983) citado por PANDEY <i>et al</i> (2005)
<i>A. oryzae</i>	AA	-	5,0-6,0	30-40	-	-	SILLS <i>et al</i> (1983)
<i>A. oryzae</i>	AA	-	4-6,6	30-55	-	-	FELLOWS (1994)
<i>A. oryzae</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)
<i>A. awamori</i>	AM	54,0	4,8-5,0	50	Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , maltose	-	BHELLA & ALTOSAAR (1985)
<i>Rhizopus sp.</i>	AM	-	4-5	55	-	-	SMITH (1991)

NOTA: PM = Massa molecular; Temp = Temperatura; Inib = Inibidores; Estab = Estabilizantes.
AA = α-amilase
AM = amiloglucosidase

Fonte: Spier (2005).

4.5 ALCALASE

Alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa do micro-organismo *Bacillus licheniformis*. A mesma foi desenvolvida na década de 60 para a indústria de detergentes e desde lá vem sendo utilizada tanto na indústria de detergentes como na produção de hidrolisados enzimáticos de variadas fontes proteicas de grau alimentício (DIETERICH, 2014).

A enzima Alcalase pertence à classe das hidrolases (EC 3.4.21.62) e a sua atividade enzimática é de 1,11 U/mg de enzima. Tem-se provado repetidamente, por muitos pesquisadores, que é a melhor enzima usada na preparação de diversos hidrolisados proteicos, pois apresenta uma ampla especificidade ao substrato. Em outras palavras, pode hidrolisar a maioria das ligações peptídicas dentro de uma molécula de proteína (SILVA, 2002). As mesmas clivam muitos tipos de ligações peptídicas, preferencialmente aquelas com cadeia lateral hidrofóbica na porção C – terminal (DIETERICH, 2014).

A alcalase é ativa numa faixa de pH de 6,5 a 8,5 e a uma faixa de temperatura de 45 a 65 °C, com máxima atividade em cerca de 60 °C. Acima disto, a atividade da mesma diminui rapidamente (SCHMIDT; MELLADO 2009).

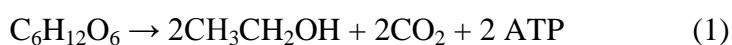
Silva (2002) afirma que quando a atividade da alcalase foi medida num intervalo de pH de 2 a 12, a mesma apresentou máxima atividade quando o pH era igual a 9,0, e ainda, que a mesma enzima apresentou sua atividade em 60% numa faixa de pH de 5 a 10. O efeito da temperatura na sua atividade também foi estudado num intervalo de 20 a 90 °C, observando-se máxima atividade entre 60 e 70 °C.

4.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Na fermentação alcoólica é essencial que o substrato utilizado apresente açúcares fermentescíveis, principalmente glicose e frutose, para que seja possível a transformação anaeróbia de açúcares em etanol e dióxido de carbono, produzindo líquidos ligeiramente alcoólicos, denominados “vinho”. Este processo é realizado por leveduras e também por algumas bactérias (ZAMOR, 2009). A mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, pois são cepas tolerantes ao álcool (PRETORIUS, 2000).

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico, que ocorre no citoplasma da levedura, responsável pela transformação de açúcar em álcool etílico. Esse processo bioquímico é realizado por mais de uma dezena de enzimas e pode ser considerado como a oxidação anaeróbica, parcial, da glicose, por ação de leveduras, com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos secundários, tais como glicerol, ácido succínico e álcoois superiores (COSTA, 2010).

Ela pode ser resumida na reação global expressa pela equação (1), na qual ocorre a formação de etanol e dióxido de carbono a partir de hexoses:



É um processo biológico em que a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e para a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO₂. O objetivo da levedura ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP), que é empregada na realização de diversas funções biológicas e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. Portanto, as leveduras, são organismos vivos com múltiplas habilidades metabólicas que podem alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações do meio, com grande impacto no rendimento do processo. O etanol e CO₂ resultantes se

constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (PACHECO, 2010; VANZELLA et al., 2014).

A levedura, portanto é um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, na presença de oxigênio a mesma transforma glicose em biomassa, CO_2 e H_2O . Na ausência de oxigênio, a maior parte da glicose é convertida em etanol e CO_2 , sempre com o objetivo de obter ATP para a realização de suas atividades metabólicas (DARÉ, 2008).

A célula de levedura possui no citoplasma celular um aparato enzimático no qual ocorre a transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO_2 , envolvendo 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica como visto na Figura 5 (CAETANO; MADALENO, 2011).

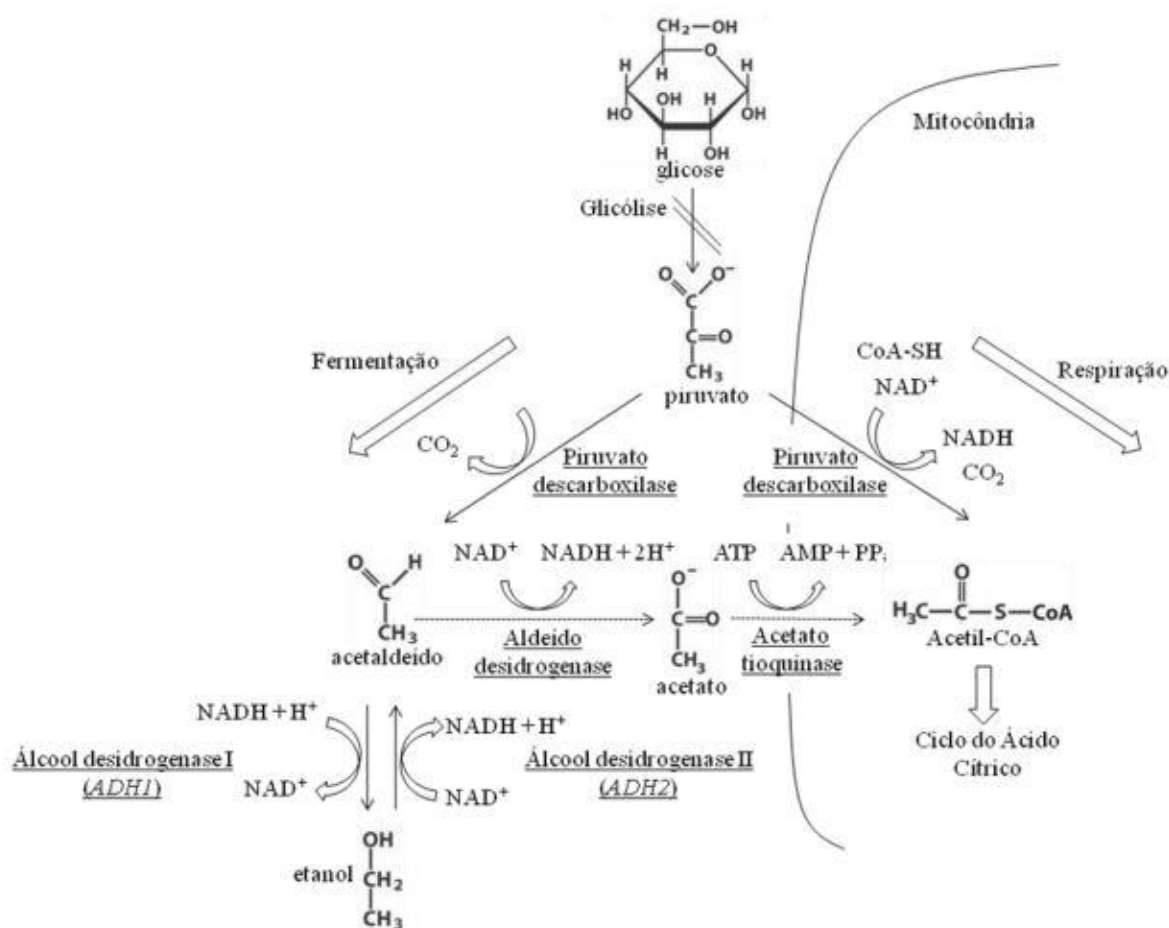


Figura 5 – Representação esquemática da fermentação e da respiração

Fonte: Omori et al. (2011)

O processo que envolve a fermentação das moléculas dos açúcares ocorre em uma via catabólica localizada no interior das células microbianas, como já mencionado. A via central do catabolismo da glicose é a glicólise, gerando como produto final o piruvato, que

pode seguir para o processo de respiração ou para outras vias metabólicas, como a da fermentação alcoólica e láctica. As leveduras produzem etanol a partir do piruvato em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a descarboxilação e formação de acetaldeído e CO₂, reação esta catalisada pela enzima piruvato descarboxilase (E.C. 4.1.1.1) e, na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.1). A enzima álcool desidrogenase, em princípio, pode catalisar a reação em duas direções, pois ela é codificada por dois genes e as enzimas por eles codificadas recebem o nome de *ADH1* e *ADH2* (álcool desidrogenase I e II). A síntese de etanol é realizada pela *ADH1* e, somente no caso do esgotamento da glicose disponível no meio, ocorrerá a transcrição do gene da *ADH2* que oxidará o etanol do meio convertendo-o a acetaldeído. O acetaldeído é então convertido a acetato seguindo para o ciclo do ácido cítrico (OMORI et al., 2011).

Como pode-se verificar na Figura 5 trata-se de um processo complexo e, ao mesmo tempo em que esta reação prossegue, uma grande quantidade de outros processos bioquímicos e físico-químicos são realizados, produzindo além do etanol, vários outros compostos tais como álcoois superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol (ZAMOR, 2009).

4.6.1 Fatores que interferem no processo

No processo fermentativo do etanol as condições do meio sofrem influências de todas as etapas antecedentes, a citar, desde a colheita da matéria prima até a formação do mosto, precauções devem ser tomadas para preservar o caldo nas melhores condições possíveis, para que favoreçam o desenvolvimento das leveduras, resultando em conversões elevadas de substrato em álcool (VANZELLA et al., 2014).

Estas precauções dizem a respeito a fatores que interferem no processo, que são vários. Podem ser citados os processos físicos (pressão osmótica e temperatura), os químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e os microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) (CAETANO; MADALENO, 2011). Estes fatores afetam o rendimento da fermentação alcoólica e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (PACHECO, 2010).

A faixa de pH ideal encontra-se entre 4 e 5 pois fermentações conduzidas em meios ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol devido à baixa produção de glicerol e a não contaminação por outras bactérias, que não resistem ao pH ácido. A contaminação

bacteriana influencia de forma negativa a fermentação, uma vez que as bactérias competem pelo mesmo substrato e geram subprodutos que são inibidores do crescimento da levedura (DARÉ, 2008). A faixa de temperatura recomendada está entre 15 e 36 °C, temperaturas inferiores retardam a fermentação e superiores ocasionam a evaporação do álcool e comprometem o desempenho da levedura (PACHECO, 2010).

Em relação aos nutrientes necessários, as leveduras necessitam de fonte de carbono que forneça energia. O meio deve ser fonte de algumas vitaminas, nitrogênio, ferro, cobre, enxofre, fósforo, entre outros. A levedura não é capaz de se beneficiar com as proteínas do meio e não possui capacidade metabólica de aproveitar o nitrogênio em forma de nitrato, somente na forma amoniacal, amídica ou amínica. Na Tabela 2 apresentam-se as concentrações de nutrientes minerais necessárias para a obtenção de um processo fermentativo adequado à levedura.

Tabela 2 – Concentração de nutrientes e minerais necessários para obtenção de um processo fermentativo adequado à levedura.

Nutriente mineral	Concentração (mg/L)
NH ₄ ⁺	40 – 5900
P	62 – 560
K ⁺	700 – 800
Ca ⁺⁺	120
Mg ⁺⁺	70 – 200
SO ₄ ⁻	7 – 280
Na ⁺	200
Co ⁺⁺	3,5
Zn ⁺⁺	0,5 – 10
Cu ⁺⁺	7
Mn ⁺⁺	10 – 33
Fe ⁺⁺	0,2

Fonte: Ortiz (2010).

4.6.2 Cinética dos processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se por componente o micro-organismo ou biomassa (X), os produtos do metabolismo (P) e os nutrientes ou substrato (S) que compõe o meio de cultura. Tais valores experimentais de concentração quando representados em função do tempo permitem traçar as curvas de ajustes como exemplificado na Figura 6 (PARENTE, 2014).

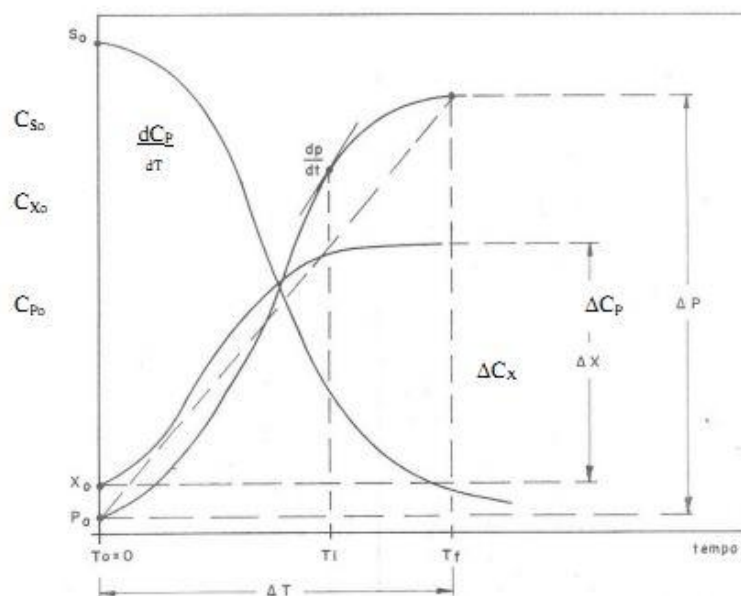


Figura 6 – Curva de ajuste para uma cinética de fermentação idealizada X, P e S referente às concentrações de células, produtos e substrato, respectivamente

Fonte: Daré (2008)

A cinética de uma fermentação possibilita comparar quantitativamente diferentes condições de cultivo de variáveis como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão obtidos a partir das curvas de ajuste do bioprocessamento (NASCIMENTO, 2012).

Também é importante na determinação das velocidades de transformação que ocorrem durante a fermentação. É possível determinar os fatores que influenciam nesta velocidade de transformação e correlacioná-los por meio de equações matemáticas. Uma vez determinados os fatores que influenciam na velocidade de transformação, tem-se uma ferramenta de otimização de processo (DARÉ, 2008).

Portanto, esses valores representam parte de um conjunto de dados necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva. Ainda, a cinética possibilita uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, por intermédio de valores como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão (PAGNONCELLI, 2008).

O micro-organismo ou agente vivo promove a transformação dos componentes do meio em produtos graças às atividades de diversas enzimas que são sintetizadas por ele mesmo, sendo esta síntese controlada pelo meio externo (fenômenos de indução e repressão) (PAGNONCELLI, 2008). Durante o crescimento celular são observadas diferentes fases semelhante ao indicado na Figura 7, apresentando sete etapas distintas.

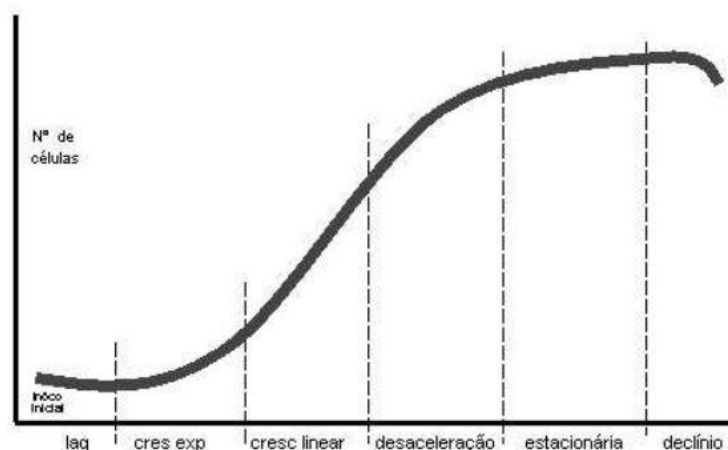


Figura 7 – Curva de crescimento típica de um micro-organismo em cultivo descontínuo

Fonte: Nascimento (2012)

A etapa inicial, denominada fase lag, é a fase que se segue logo após a inoculação do micro-organismo no meio, apresentando-se como uma fase de adaptação, na qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Não ocorre reprodução celular e assim $X = X_0$. A duração desta fase depende de diversos fatores como a concentração do inóculo, tempo de pré-cultivo e seu estado fisiológico. Se as células forem pré-cultivadas em meio de composição idêntica é possível que tal fase não exista (NASCIMENTO, 2012; PAGNONCELLI, 2008).

Na fase 2 há o período de transição, no qual ocorre o início da reprodução dos micro-organismos, e, portanto, um aumento gradual da velocidade de reprodução e da velocidade específica de crescimento. A fase 3 é a denominada logarítmica ou exponencial, na qual a velocidade específica de crescimento é constante e máxima. A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração celular. A fase 4 é a fase linear de crescimento e apresenta velocidade de reprodução constante dos micro-organismos. Na fase 5, ocorre a desaceleração do crescimento microbiano devido ao esgotamento dos componentes do meio de cultura e aumento da concentração de metabólitos inibidores do crescimento (PAGNONCELLI, 2008).

Por fim, a fase 6 é denominada de estacionária, pois a concentração de células atinge seu valor máximo e constante. Nessa fase há um balanço entre a velocidade de crescimento celular e a velocidade de morte dos micro-organismos. Na última fase ocorre o declínio, ou seja, as células começam a morrer (lise celular) e a concentração celular decai a uma velocidade maior que a velocidade de produção de novas células, ou seja, ocorre autólise

provocada pela ação das enzimas intracelulares, indicando o final do processo de fermentação (NASCIMENTO, 2012).

4.7 UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM EM BIOPROCESSOS

A utilização de ultrassom em reações de hidrólise pode ser uma ferramenta simples e importante no controle de agregação e/ou dispersão de partículas. Em reações enzimáticas o ultrassom é uma boa ferramenta a ser utilizada, podendo perturbar ligações fracas e induzir a mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (BABICZ, 2009).

A aplicação do ultrassom em processos químicos e a inúmeras inovações tecnológicas vem despertando o interesse dos pesquisadores ao longo do tempo. A influência de ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação. A aplicação de ultrassom em enzimas pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, principalmente o efeito físico da cavitação estável, na qual bolhas oscilam de um modo regular induzindo ao redor uma microcorrente que afeta algumas partículas diminuindo o estresse. Assim, esses parâmetros devem ser analisados visando sua aplicação em bioquímica e biotecnologia (LEÃES, 2012).

A irradiação por ultrassom é um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima e também proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro ambiente em função do efeito cavitacional. O fator limitante mais comum para o uso do ultrassom nas reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas (BABICZ, 2009).

Outro fator a ser considerado em reações com enzimas em ultrassom é o solvente que está sendo utilizado. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, pois ocorre aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona como um mecanismo de proteção porque as moléculas de água encontram-se em torno da enzima e, desta forma, não são facilmente movidas pelo ultrassom (MARTINEZ et al., 2000).

O emprego do ultrassom tem sido analisado para a liberação e extração de proteínas, principalmente enzimas intracelulares, e concomitante aumento da atividade enzimática. A aplicação do ultrassom em enzimas pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, embora ultrassom de alta intensidade possa causar desnaturação. Portanto, sua influência na atividade e estabilidade das enzimas tem-se demonstrado específica (LEÃES, 2012).

Estudos demonstram que ondas ultrassônicas de baixa frequência e baixa intensidade favorecem as reações enzimáticas através da cavitação estável e melhoria de transferência de massa conforme verificado por vários autores (BARTON; BULLOCK; WEIR, 1996; SAKAKIBARA et al., 1996; ÖZBEK; ULGEN, 2000; CONDON et al., 2009 e LEÃES, 2012).

Tendo em vistas estas considerações, Watanabe et al. (2009) avaliaram a produção de bioetanol a partir da fermentação alcoólica do farelo de arroz e da água de lavagem do arroz, incorporando o uso do ultrassom em seus estudos. Os autores realizaram a hidrólise das proteínas e dos lipídeos, anterior a do amido, justificando que a hidrólise protéica e lipídica permite a remoção de uma “capa” da superfície das partículas de amido, aumentando a exposição do amido para a sacarificação. Desta forma o rendimento em etanol observado foi de 3,0 – 3,4%. Devidos aos resultados encontrados, os autores utilizaram o banho de ultrassom (1 a 4 min) para que os grânulos de amido do farelo de arroz ficassem dispersos e assim aumentasse sua superfície específica, para permitir a melhor sacarificação do amido e consequente maior concentração de etanol. Os resultados obtidos indicaram que após 3 minutos de exposição, o rendimento em etanol na fermentação alcoólica foi de 6,2% de etanol, concentração 5 vezes superior à obtida inicialmente sem o uso do ultrassom .

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATÉRIA PRIMA

Foi utilizado o farelo de arroz desengordurado proveniente da Indústria Riograndense de Óleos Vegetais (IRGOVEL), situada na cidade de Pelotas/RS no período de março de 2013.

As enzimas utilizadas para a hidrólise enzimática do farelo de arroz foram a α -amilase termoestável (TERMAMYL 2X, Novozymes), Amiloglucosidase (AMG 300L - Amyloglucosidase de *Aspergillus niger*) e a Protease (ALCALASE 2.4 L Food Grade), sendo todas elas cedidas pela empresa LNF – Latino Americana, Bento Gonçalves - RS.

5.2 MICRO-ORGANISMO

Para a realização da fermentação alcoólica foi utilizada uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* obtida no comércio local de Medianeira-Pr, na forma de fermento comercial liofilizado (Fleishmann, Rio de Janeiro - Brasil).

5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ

O processo de hidrólise do farelo de arroz desengordurado foi realizado por via enzimática, pela aplicação das enzimas amilolíticas (α -amilase e amiloglucosidase) (SIEPMANN et al., 2014).

Anteriormente a ação das enzimas amilolíticas foi avaliada a influência da ação de proteases e da exposição da suspensão de farelo de arroz em banho ultrassônico, sobre a eficiência da sacarificação e posterior rendimento em etanol na etapa de fermentação alcoólica.

Para tal, foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 (4 ensaios, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios) no qual foi avaliado a influência das variáveis concentração de protease e tempo de exposição ao banho ultrassônico, sobre as respostas de concentração de açúcares redutores na etapa de sacarificação e etanol na etapa de fermentação alcoólica. Foram aplicadas as frequências de

37 e 80 kHz em banho ultrassônico (Elamsonic P, 120 H, Singen - Germany), de modo que foram realizados dois DCCR 2^2 , totalizando 22 ensaios.

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos DCCRs estão apresentados na Tabela 3. A matriz dos ensaios está apresentada na Tabela 4.

Tabela 3 – Variáveis do DCCR para o estudo da etapa de sacarificação enzimática do farelo de arroz (níveis reais e codificados).

Variáveis / Níveis	Protease ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$)	Tempo de exposição ao ultrassom (min)
$-\alpha$ (-1,41)	0,0	0
-1	3,6	3
0	12,5	10
+1	21,4	17
$+\alpha$ (+1,41)	25,0	20

Tabela 4 - Matriz do DCCR 2^2 com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no processo de hidrólise do farelo de arroz.

Ensaio	x_1^a	x_2^b
1	-1 (3,6)	-1 (3)
2	+1 (21,4)	-1 (3)
3	-1 (3,6)	+1 (17)
4	+1 (21,4)	+1 (17)
5	-1,41 (0,0)	0 (10)
6	+1,41 (25,0)	0 (10)
7	0 (12,5)	-1,41 (0)
8	0 (12,5)	+1,41 (20)
9	0 (12,5)	0 (10)
10	0 (12,5)	0 (10)
11	0 (12,5)	0 (10)
TC1	-	-

^a Concentração de protease ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$); ^b Tempo de exposição ao banho ultrassônico (min);

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL com volume total de 150 mL, os quais foram incubados em banho termostático sob agitação de 100 RPM.

Inicialmente o farelo de arroz foi suspenso em água destilada na proporção de 200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, segundo estudo preliminar realizado por Siepmann et al. (2014). O pH da suspensão foi ajustado para 6,5 e adicionada a enzima protease (Alcalase 2.4 L FG, Bento Gonçalves - Brasil) para realizar a remoção das proteínas da superfície das partículas de amido e, assim, aumentar a exposição das mesmas à hidrólise com as amilases. Após a ação da alcalase (nas condições definidas pelo planejamento), a mistura foi exposta a um tratamento em banho

ultrassônico (sob temperatura de 30 °C, potência fixa em 100%, sendo a frequência e o tempo definidos pelo planejamento) para que os grânulos de amido do farelo de arroz, que tendem a floccular, ficassem dispersos, e para aumentar a superfície exposta dos mesmos, visando melhorar a eficiência do processo de sacarificação (WATANABE *et al.*, 2009).

Após esse processo, a suspensão com pH ajustado para 6,0 sofreu a adição da enzima α -amilase, na concentração de 30 $\mu\text{L}\cdot\text{g}$ de farelo⁻¹, sob a temperatura de 60 °C, a qual foi posteriormente aumentada para 90 °C e mantida durante o tempo de atuação da enzima (2 h). Para a adição da amiloglucosidase na concentração de 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}$ de farelo⁻¹ a temperatura e o pH foram ajustados para 55 °C e 4,5-5,0 respectivamente. O tempo de atuação da amiloglucosidase foi de 3 horas. Estas condições foram definidas em estudos realizados por Siepmann *et al.* (2014).

O pH do meio hidrolisado foi ajustado para 5,0 e centrifugado (5 min/5000 RPM) em centrífuga refrigerada, a temperatura de 4 °C (CIENITEC, CT-5000R, Piracicaba, São Paulo), para a posterior etapa de fermentação alcoólica.

Os valores das faixas de estudo do DCCR foram fundamentados em estudos encontrados na literatura. Todos os dados dos planejamentos foram tratados com o auxílio do software Statistica versão 10.

Resumidamente a Figura 8 apresenta um fluxograma de todas as partes envolvidas do processo de hidrólise enzimática do farelo de arroz e da etapa de fermentação alcoólica.

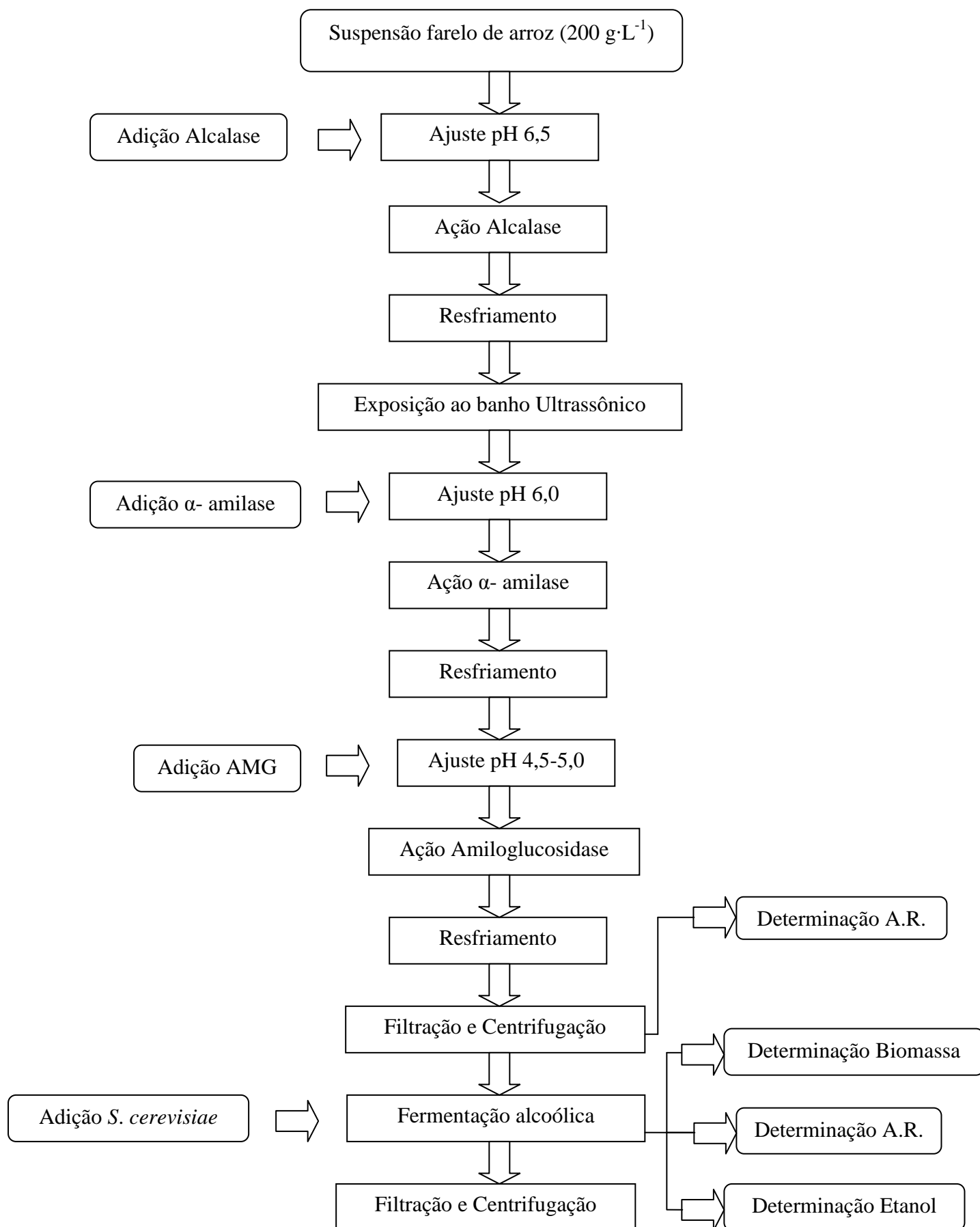


Figura 8 – Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica

5.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO HIDROLISADO

Quanto à condução, o processo de fermentação alcoólica foi um cultivo descontínuo, no qual, no tempo inicial, adicionou-se o substrato esterilizado, inoculou-se com o microorganismo e permitiu-se que o crescimento microbiano ocorresse.

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio hidrolisado os quais foram incubados em *shaker* de agitação orbital (SOLAB, Modelo SL 221, Piracicaba, São Paulo), durante 12 horas (Figura 9). O processo ocorreu à temperatura de 30 °C, com o pH do mosto ajustado para 5,0. O inóculo foi adicionado na proporção de 5%, segundo metodologia proposta por Siepmann et al. (2014).

Após a inoculação, que correspondeu ao tempo zero de fermentação, foi realizado o acompanhamento do processo pela retirada de amostras a cada 3 horas de fermentação, durante 12 horas, para o acompanhamento da concentração de biomassa e da concentração de açúcares redutores. Para o acompanhamento da concentração de etanol amostras foram retiradas a cada 6 horas.

Para a realização da fermentação alcoólica foram utilizados os hidrolisados provenientes dos ensaios do DCCR à frequência de 80 kHz, já que a concentração de açúcares redutores encontradas neste planejamento foi superior em relação às concentrações encontradas no planejamento realizado na frequência de 37 kHz.



Figura 9 – Ensaios incubados em *shaker* para realização da fermentação alcoólica

5.5 TESTES REALIZADOS PARALELAMENTE AOS PLANEJAMENTOS

Através dos resultados observados no DCCR aplicado, alguns testes foram realizados visando a melhor condição de realização da etapa de hidrólise enzimática do farelo de arroz desengordurado.

Assim, através da quantificação dos açúcares redutores dos ensaios do DCCR, selecionaram-se as faixas de estudo das variáveis do ensaio em que mais se obteve açúcar redutor, repetindo este ensaio em condições diferentes da anterior (banho termostático com agitação de 100 RPM) pelas seguintes condições: chapa de aquecimento com agitação magnética, banho termostático com agitação mecânica e em *shaker* com agitação orbital, comparando-se os resultados, a fim de se determinar qual a melhor condição.

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.6.1 Determinação de biomassa celular

A concentração de biomassa celular (massa seca) foi determinada por meio da leitura da densidade ótica (DO) a 600 nm de uma alíquota do meio de cultivo, utilizando-se curvas de calibração de densidade ótica *versus* massa seca (Figura 10).

Para a obtenção das curvas de calibração, foi coletada uma alíquota do meio de cultivo (10 mL) ao final do processo fermentativo e as células foram lavadas três vezes com água destilada, por centrifugação (5000 RPM) em equipamento refrigerado a 4 °C (CIENTEC, CT-5000R, Piracicaba, São Paulo). O precipitado foi submetido à secagem em estufa (60 °C) até peso constante. Através da relação com o volume de meio coletado, foi determinada a concentração total de massa seca. Paralelamente, diluições apropriadas do meio de cultivo foram realizadas e a densidade ótica foi medida a 600 nm. A partir da massa seca total foram determinadas indiretamente as concentrações de massa seca para cada diluição, construindo-se a curva de calibração.

A Figura 10 apresenta a curva de calibração para a concentração celular (em gramas por litro) *versus* a densidade ótica.

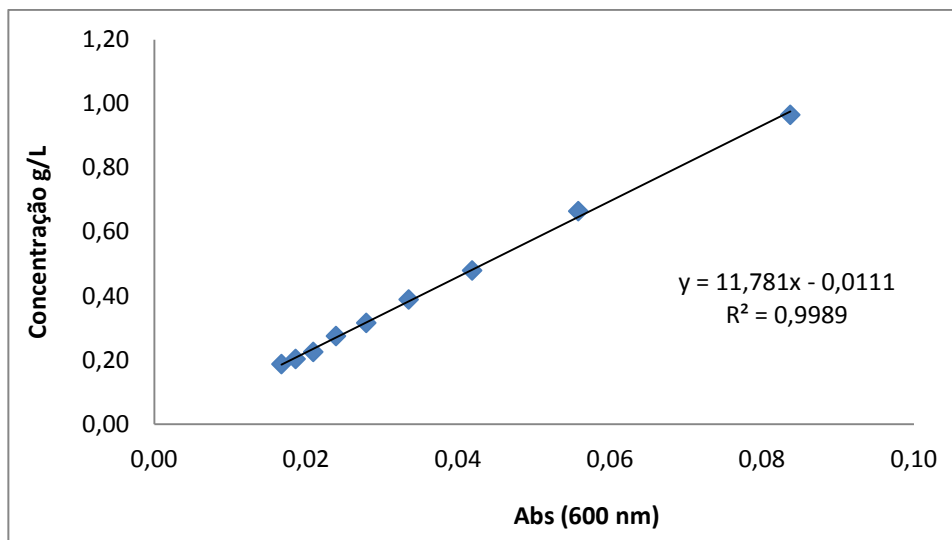


Figura 10 – Curva de calibração para determinação da concentração de biomassa celular

5.6.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada, em triplicata, pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

5.6.3 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Ultra-alta pressão (UPLC) (DIONEX, Modelo U3000) equipado com detectores de Índice de Refração e de Arranjo de Diodos. As amostras foram convenientemente diluídas, filtradas em membrana Millipore 0,45 μm e injetadas em coluna Rezex ROA-Organic Acid H^+ (8%). A fase móvel foi constituída de H_2SO_4 5 mM mantida sob fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do sistema foi mantida a 30 °C e a detecção foi realizada por índice de refração, sendo o volume de amostra injetado igual a 5 μL . Um padrão de etanol (Sigma) foi utilizado na curva de referência para cálculo da concentração de etanol das amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ – FREQUÊNCIA 37 kHz

Na Tabela 5 está apresentada a matriz de ensaios do planejamento com as respostas (concentração de açúcares redutores) na frequência de 37 kHz aplicada no banho ultrassônico.

Tabela 5 – Matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis, resposta de concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), valores preditos pelo modelo e desvios relativos, para a frequência de 37 kHz.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c	AR predito ^d	Desvios Relativo(%) ^e
1	-1 (3,6)	-1 (3)	47,86±0,59	47,43	2,20
2	+1 (21,4)	-1 (3)	42,45±0,40	41,96	1,45
3	-1 (3,6)	+1 (17)	42,64±0,20	41,96	3,92
4	+1 (21,4)	+1 (17)	52,01±0,11	47,43	2,59
5	-1,41 (0,0)	0 (10)	36,37±0,43	37,26	-1,29
6	+1,41 (25,0)	0 (10)	32,40±0,53	37,26	-18,15
7	0 (12,5)	-1,41 (0)	51,34±0,14	52,05	-2,99
8	0 (12,5)	+1,41 (20)	50,76±0,48	52,05	-1,63
9	0 (12,5)	0 (10)	38,59±0,78	37,26	3,59
10	0 (12,5)	0 (10)	39,55±0,82	37,26	3,51
11	0 (12,5)	0 (10)	39,26±0,82	37,26	2,95
TC1 ^f	-	-	47,23±0,34	-	-

^a Concentração de protease ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$); ^b Tempo de exposição ao ultrassom (min);

^c Resposta concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) \pm erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

^d Valores de A.R. preditos pelo modelo.

^e Desvio Relativo= $((Y - \hat{Y})/Y)*100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo;

^f Tratamento Controle – Ausência da ação da enzima protease e exposição ao banho ultrassônico.

Pode-se verificar que as concentrações de açúcares redutores variaram de 32,401 a 52,019 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os pontos centrais apresentaram pequena variação (erro padrão de $\pm 0,809$) indicando boa repetibilidade do processo.

Jieun et al. (2009) avaliaram a produção de etanol a partir do farelo de arroz integral e desengordurado. Na hidrólise enzimática do substrato os autores encontraram cerca de 20 a 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares redutores nas condições de 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de farelo de arroz desengordurado, 15 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ de α -amilase (a 30 °C durante 4 horas), 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ β -amilase e 1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de amiloglucosidade (ambas a 37 °C durante 4 horas).

Devi, Vijayendra e Shamala (2012) estudando a hidrólise enzimática do farelo de arroz para a obtenção de polímeros intra e extracelulares, obtiveram concentrações de 26,4 g·L⁻¹ de açúcares redutores quando utilizaram 100 g·L⁻¹ do substrato em água, hidrólise enzimática com α -amilase (a 80 °C durante 30 min) e amiloglicosidase (a 50 °C e pH 5,5 durante 4 horas).

Portanto, verificou-se que os resultados encontrados neste trabalho foram superiores aos relatados por estes autores, visto que a menor concentração de açúcar redutor encontrada foi de 32,40 g·L⁻¹.

Por meio da Tabela 6, constatou-se que a interação das variáveis concentração de alcalase e tempo de exposição ao banho ultrassônico apresentou efeito positivo e significativo na resposta concentração de A.R. A variável tempo de exposição ao banho ultrassônico, no ponto axial (+ α) também apresentou efeito positivo e significativo na resposta.

Verificou-se na Tabela 5 que quando a variável concentração de alcalase passou do nível inferior (- α) para o superior (+ α) quando a variável tempo de exposição ao banho ultrassônico encontrava-se fixa no ponto central, houve efeito negativo na resposta, ou seja, as concentrações de A.R. diminuíram como demonstrado na Tabela 6.

As maiores concentrações de açúcares redutores foram encontradas quando as variáveis estudadas encontravam-se nos pontos axiais (+ α e - α). Portanto é possível constatar que as maiores concentrações encontradas ocorreram quando as faixas de estudos das variáveis encontravam-se nos pontos axiais, e as menores concentrações, quando as variáveis encontravam-se nos pontos centrais.

Assim, depois de analisado os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão do modelo quadrático para a resposta concentração de açúcares redutores os quais estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Coeficientes de regressão para a resposta A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	38,54	1,35	28,53	0,0000*
x_1 (L)	-1,04	0,82	-1,25	0,2644
x_1 (Q)	-1,36	0,98	-1,38	0,2249
x_2 (L)	0,28	0,82	0,33	0,7482
x_2 (Q)	7,03	0,98	7,11	0,0008*
$x_1 x x_2$	2,73	1,16	2,33	0,0664*

* $p \leq 0,05$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Considerando-se os parâmetros significativos dos coeficientes de regressão ($p \leq 0,05$) determinou-se a equação (2), que representa o modelo quadrático de concentração de açúcar redutor em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 7. A interação das variáveis concentração de alcalase e tempo de exposição ao banho ultrassônico ($x_1 x x_2$) apresentou-se como significativa no intervalo de confiança de 90% portanto foi mantida no modelo. Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi altamente significativo ($p < 0,0001$), sendo 7 vezes maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 89\%$), considerando a variabilidade inerente aos bioprocessos, constatou-se que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta apresentada na Figura 11. Além disto, os desvios relativos (Tabela 5) foram inferiores a 20%, comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

$$\text{A.R. (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 37,26608 + 7,436 \cdot x_2^2 + 2,737 \cdot x_1 x_2 \quad (2)$$

Tabela 7 – ANOVA do modelo quadrático para concentração de A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
Regressão	368,49	2	184,24	31,27	<0,0001
Erro	47,12	8	5,89		
Total	415,61	10			

% variação explicada $R^2 = 88,66$ $F_{2;8;0,05} = 4,45$

^a soma de quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Verificou-se através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 11) que há uma região ótima para concentração de açúcares redutores na faixa de combinações de concentração de alcalase igual a 0 a 12,5 $\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ e tempo de exposição ao banho ultrassônico de 0 a 2,5 min. Ou ainda, quando a concentração de alcalase está entre 12,5 a 25 $\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ e o tempo ao banho ultrassônico de 18 a 20 min.

De acordo com Rodrigues e Iemma (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada.

A superfície de resposta e de contorno (Figura 11) apresentaram faixas ótimas para a máxima obtenção da concentração de açúcares redutores. Porém verificou-se que os valores pontuais de 0 $\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ e 0 min de exposição ao ultrassom, ou seja, a não utilização destas variáveis, encontraram-se dentro da região ótima, pois as maiores concentrações de açúcares redutores foram encontradas quando as variáveis estudadas estavam nos pontos axiais, sendo 0 min e 0 $\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ os pontos axiais (- α) das variáveis tempo de exposição ao banho e concentração de alcalase, respectivamente. Por isso, em termos de custos e otimização de tempo, a não utilização destas variáveis, ou seja, a não aplicação do tratamento ultrassônico e do tratamento enzimático com protease, foi à opção mais viável em relação às faixas ótimas.

Esta evidência foi confirmada quando os dados dos ensaios foram confrontados com o tratamento controle (ausência da ação da enzima alcalase e a exposição ao banho ultrassônico) que apresentou concentração de açúcar redutor de 47,237 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Observou-se que as concentrações de A.R. dos níveis quadrático das variáveis diferiram do tratamento controle, já as concentrações de A.R. dos níveis superiores e inferiores e dos pontos centrais das variáveis quase não diferiram. Portanto, as menores concentrações de A.R. foram observadas quando as variáveis encontravam-se nos seus níveis superiores, inferiores e nos pontos centrais, o que pode ser visualizado na Figura 11, onde os mesmos encontram-se entre as regiões ótimas indicadas, ou seja, no centro das superfícies.

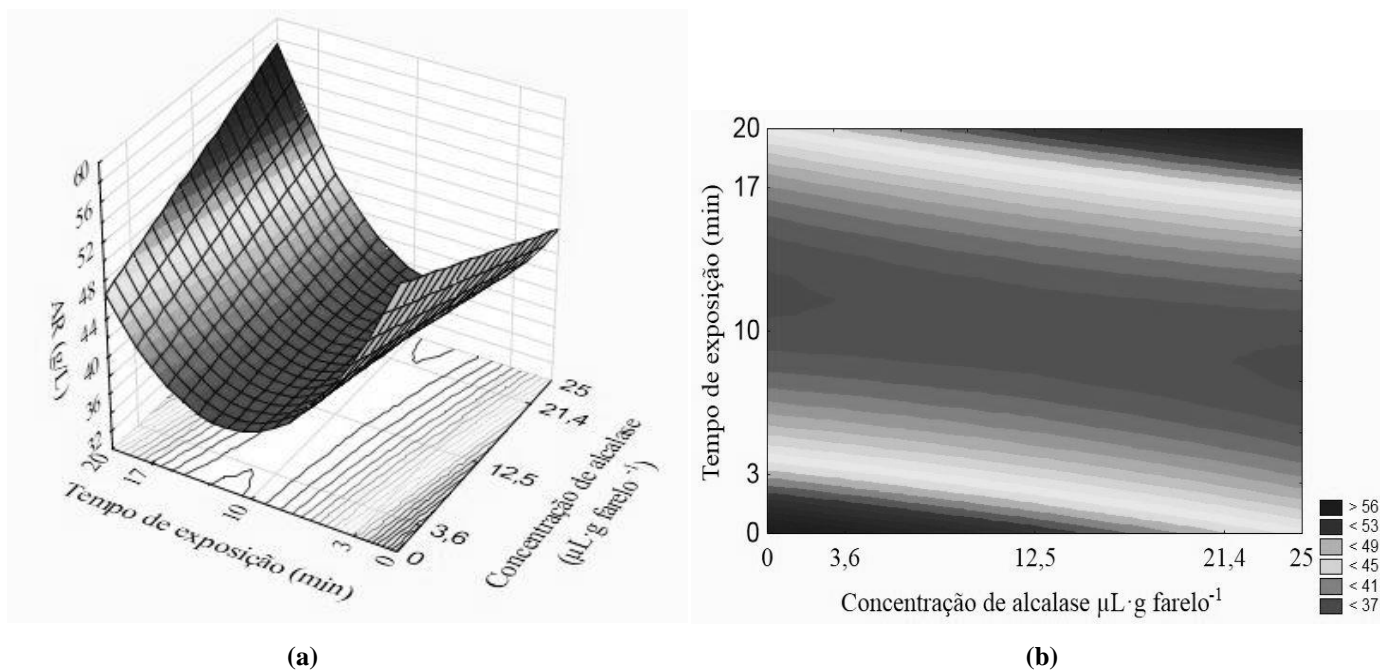


Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a resposta concentração de açúcar redutor ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em função das concentrações de alcalase ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$) e tempo de exposição ao banho de ultrassom (min)

Portanto, para a frequência de 37 kHz utilizada no banho ultrassônico, verificou-se na Figura 11 que a região ótima para a concentração de açúcares redutores ocorreu quando as variáveis encontram-se nos seus pontos axiais (0 min e $0 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$). Assim, como a ausência destas variáveis apresentou-se dentro da região ótima, é possível constatar que a não utilização destas variáveis foi à opção mais vantajosa em termos de custos e otimização de tempo de processo.

6.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO FARELO DE ARROZ – FREQUÊNCIA 80 kHz

Na Tabela 8 está apresentada a matriz de ensaios do planejamento com as respostas (concentração de açúcares redutores) para frequência de 80 kHz utilizada no banho ultrassônico.

Tabela 8 – Matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis, resposta de concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), para a frequência de 80 kHz.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c
1	-1 (3,6)	-1 (3)	54,24±0,78
2	+1 (21,4)	-1 (3)	50,66±0,16
3	-1 (3,6)	+1 (17)	53,56±0,33
4	+1 (21,4)	+1 (17)	49,79±0,45
5	-1,41 (0,0)	0 (10)	62,74±0,27
6	+1,41 (25,0)	0 (10)	54,62±0,78
7	0 (12,5)	-1,41 (0)	55,59±0,43
8	0 (12,5)	+1,41 (20)	65,54±0,53
9	0 (12,5)	0 (10)	54,82±0,83
10	0 (12,5)	0 (10)	53,85±0,29
11	0 (12,5)	0 (10)	51,82±0,62
TC1	-	-	46,97±0,34

^a Concentração de protease ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$); ^b Tempo de exposição ao ultrassom (min);

^c Resposta concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

Pôde-se verificar que as concentrações de açúcares redutores variaram de 49,798 a 65,543 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sendo superiores às concentrações de A.R. para a frequência de 37 kHz. Em relação ao tratamento controle (A.R. = 46,97 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) os resultados foram bem superiores, principalmente para os ensaio 5 e 8 com concentrações de 62,74 e 65,54 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Constatou-se que quando a variável tempo de exposição ao ultrassom permaneceu fixa e a variável concentração de alcalase passou do nível inferior (-1) para o superior (+1) houve efeito negativo na resposta (Tabela 8 e 9). Quando a mesma variável passou do nível superior (+ α) para o nível inferior (- α , ou seja, 0 $\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$) com a variável tempo de exposição ao ultrassom fixa no ponto central, as concentrações de A.R. obtidas foram bem superiores (62,74 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) comprovando que a variável concentração de alcalase apresentou efeito negativo na resposta. Na Tabela 9, verificou-se o efeito negativo desta variável sob a resposta concentração de A.R.

Quando a variável tempo de exposição ao ultrassom passou do nível inferior (- α) para o superior (+ α) com a concentração de alcalase fixa no ponto central ocorreu grande acréscimo na resposta, confirmando seu efeito positivo sob a resposta (Tabela 9).

Analisando-se os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão do modelo quadrático apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão para a resposta A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	53,62	2,96	18,08	0,0000*
x_1 (L)	-2,22	1,81	-1,22	0,2759
x_1 (Q)	0,14	2,16	0,06	0,9497
x_2 (L)	1,85	1,81	1,01	0,3555
x_2 (Q)	1,50	2,16	0,69	0,5190
$x_1 \times x_2$	0,27	2,56	0,10	0,9192

* $p \leq 0,05$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Por meio da Tabela 9, verifica-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si a 95% de significância, ou seja, qualquer valor utilizado para as variáveis, dentro da faixa estudada, não resultou diferença significativa na resposta obtida, portanto, os ensaios do planejamento apresentaram-se estatisticamente iguais.

Porém, as variáveis concentração de alcalase e tempo de exposição ao banho ultrassônico para a frequência de 80 kHz aumentaram as concentrações de açúcares redutores obtidas em relação aos ensaios à frequência de 37 kHz, indicando, portanto, que as condições deste planejamento foram de maior interesse para o trabalho em questão, visto a sua utilização em processos fermentativos.

6.3 COMPARAÇÃO DO USO DAS DIFERENTES FREQUÊNCIAS UTILIZADAS NO BANHO ULTRASSÔNICO

Verificou-se que houve diferenças nas respostas dos planejamentos quando submetidos a diferentes frequências no banho ultrassônico (Tabela 5 e 8). Para a frequência de 37 kHz a resposta dos ensaios foi menor em relação à resposta dos ensaios realizados na frequência de 80 kHz.

Gonzaga (2012) cita que umas das consequências do fenômeno cavitacional do ultrassom é a geração de ondas de choque e de jatos acelerados que provocam colisões violentas das partículas em suspensão. Assim, a ocorrência de cavitação em suspensões provoca importantes alterações morfológicas nas partículas diminuindo suas dimensões médias, aumentando a área superficial e a acessibilidade aos sítios reativos. Korn, Santana e Borges (2003) citam que estas cavitações são dependentes da frequência utilizada, além de outros fatores como a pressão de vapor, condutividade térmica do solvente, presença de

sólidos no meio exposto ao campo ultrassônico, temperatura, pressão externa, viscosidade e tensão superficial.

As ondas ultrassônicas de alta frequência são conhecidas por produzirem uma maior quantidade de radicais hidroxila em meio aquoso em relação às de baixas frequências. As altas frequências geralmente favorecem os mecanismos químicos envolvendo radicais (clivagem de ligações do substrato ou pela sonólise da água). Por outro lado, baixas frequências são mais eficientes para efeitos mecânicos, como a eliminação de gases e a limpeza das superfícies eletródicas (GARBELLINI; SALAZAR-BANDA; AVACA, 2008), o que justifica o fato da utilização de uma frequência maior ter aumentado a resposta de concentração de açúcares redutores, comportamento observado neste trabalho.

Siepmann et al. (2014) avaliaram o uso da enzima alcalase ($15 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$) em conjunto com o banho ultrassônico (37 kHz, temperatura de 30 °C, potência de 100% e tempo de exposição de 5 minutos) na hidrólise enzimática do farelo de arroz sobre a resposta obtenção de etanol. Os resultados mostraram que a ação da alcalase e o tratamento ultrassônico não influenciaram significativamente na obtenção de etanol.

Leães (2012) avaliando o efeito do ultrassom na atividade das enzimas amilolíticas, demonstrou que o efeito da aplicação de ultrassom na frequência de 40 kHz não foi significativo sobre a atividade das enzimas α -amilase e amiloglucosidase, ou seja, as atividades das enzimas foram semelhantes em qualquer condição experimental. Portanto este estudo demonstrou que a utilização do ultrassom a baixa frequência não aumentou a atividade enzimática.

Watanabe et al. (2009) avaliaram em seus estudos a produção de bioetanol a partir da fermentação alcoólica do farelo de arroz e da água de lavagem do arroz realizando a hidrólise das proteínas, dos lipídeos e o banho de ultrassom (1 a 4 min), anteriormente à aplicação das enzimas amilolíticas. Os resultados obtidos indicaram que após 3 minutos de exposição ao banho o rendimento em etanol na fermentação alcoólica foi 5 vezes superior às concentrações obtidas inicialmente sem o uso do ultrassom. Apesar destes resultados serem importantes na área de estudo, os autores não indicaram a potência, temperatura e a frequência utilizada na exposição ao banho de ultrassom.

6.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO MOSTO HIDROLISADO

6.4.1 Concentração de açúcares redutores

As respostas para o acompanhamento da concentração de açúcares redutores em função do tempo de fermentação, para os 11 ensaios do DCCR podem ser visualizados na Tabela 10.

Verificou-se que aproximadamente 97% do teor de A.R. foi reduzido nas primeiras 3 horas de fermentação em todos os ensaios, ou seja, grande parte do substrato foi consumido nas 3 primeiras horas de fermentação (Tabela 10).

Em 6 horas de fermentação praticamente todo substrato foi consumido, sendo as concentrações de açúcares inferiores a $0,578 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O consumo deste substrato foi igual a 100% em 12 horas de fermentação, como demonstrado pela Tabela 10 e Figura 12.

Tabela 10 – Concentrações de Açúcares redutores em 12 horas de fermentação.

Ensaio/tempo	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a				
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h
1	54,24±0,78	1,89±0,09	0,43±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00
2	50,66±0,16	1,32±0,01	0,30±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00
3	53,56±0,33	1,12±0,12	0,44±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00
4	49,79±0,45	1,48±0,01	0,54±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00
5	62,74±0,27	1,45±0,02	0,42±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00
6	54,62±0,78	1,75±0,90	0,39±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00
7	55,59±0,43	1,49±0,01	0,53±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
8	65,54±0,53	1,33±0,13	0,40±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00
9	54,82±0,83	1,27±0,00	0,57±0,07	0,00±0,00	0,00±0,00
10	53,85±0,29	0,45±0,16	0,36±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
11	51,82±0,62	0,23±0,09	0,20±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00

^a Resposta concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

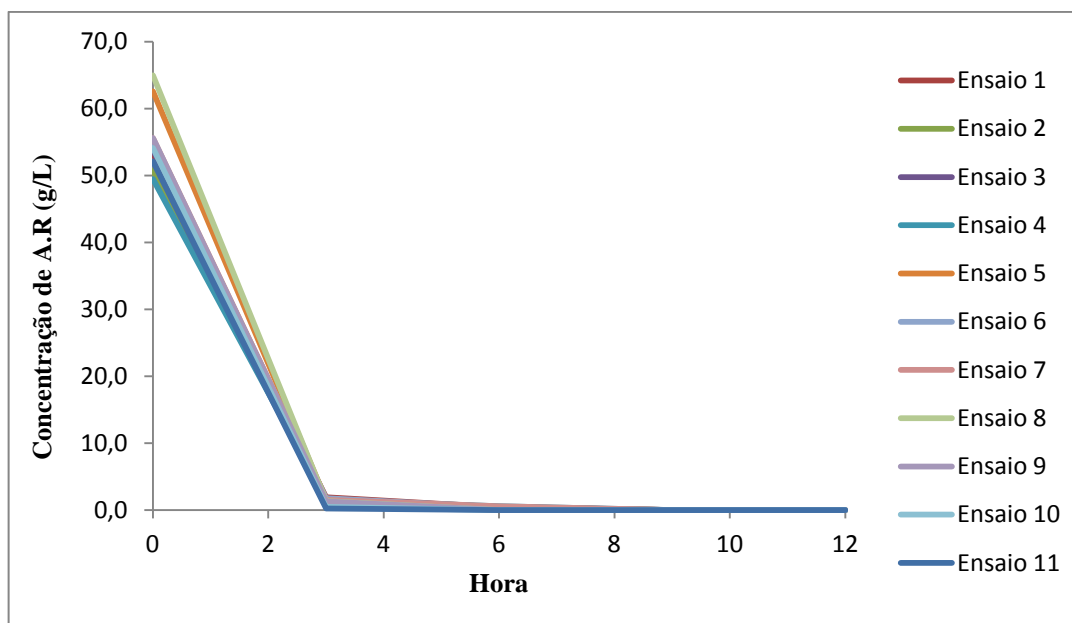


Figura 12 – Acompanhamento da concentração de açúcares redutores ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante a fermentação alcoólica

Costa (2010) obteve um perfil de consumo de substrato parecido com o apresentado na Figura 12 durante a fermentação alcoólica de hidrolisados de matérias primas amiláceas, sendo as concentrações finais próximas de $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O autor afirma que o consumo de glicose foi rápido devido à concentração inicial de glicose ser mais baixa, não ocasionando inibição do metabolismo inicial da levedura devido ao excesso de açúcar. Este fato justifica o substrato ter sido praticamente todo consumido em 6 horas de fermentação no presente trabalho.

Pacheco (2010) analisando o processo de obtenção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar e melaço, com cepas floculantes, observou que em sete horas de fermentação todo substrato havia sido consumido para uma concentração inicial de substrato de $204,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O autor explica que a fermentação ocorreu de forma rápida devido ao fato do experimento ter sido realizado com concentração inicial de inóculo alta não sendo possível, portanto observar a fase lag na curva de crescimento microbiano.

Ortiz (2010) avaliando a produção de bioetanol por fermentação em estado sólido com *S. cerevisiae* a partir da mistura de resíduos agroindustriais (bagaço de malte e bagaço de mandioca) encontrou valores máximos de $3,36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares redutores sendo esta concentração diminuída para $1,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ após 24 h de fermentação alcoólica.

6.4.2 Determinação de biomassa celular

As concentrações de biomassa celular, expressas em gramas de células por litro de meio hidrolisados, estão apresentados na Tabela 11 para os 11 ensaios do DCCR.

Tabela 11 – Acompanhamento da concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada ensaio em função do tempo de fermentação.

Ensaio/Tempo	X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h
1	20,57±0,01	20,62±0,01	20,92±0,01	21,23±0,02	23,71±0,05	24,41±0,00
2	20,37±0,00	20,55±0,02	21,97±0,00	21,70±0,01	22,91±0,60	22,98±0,00
3	26,79±0,00	26,60±0,00	26,81±0,01	31,49±0,07	31,02±0,00	31,88±0,01
4	23,38±0,00	23,00±0,01	23,25±0,02	23,82±0,03	22,61±0,00	22,68±0,01
5	16,53±0,03	20,26±0,00	23,00±0,00	23,57±0,01	20,68±0,00	19,66±0,01
6	24,96±0,00	24,98±0,00	24,60±0,01	24,82±0,04	23,61±0,00	23,88±0,05
7	26,79±0,00	27,00±0,00	28,63±0,00	28,87±0,01	28,65±0,00	28,94±0,00
8	20,77±0,02	21,78±0,00	22,42±0,01	28,48±0,01	28,61±0,00	28,61±0,01
9	21,09±0,00	23,18±0,00	25,62±0,00	25,82±0,00	26,22±0,00	26,22±0,00
10	22,59±0,00	26,83±0,00	26,65±0,01	27,21±0,01	31,26±0,01	31,26±0,01
11	26,66±0,01	26,67±0,00	26,62±0,00	27,68±0,02	25,03±0,00	25,03±0,00

^a Concentração celular ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

Verificou-se que em todos os ensaios houve crescimento celular e que para a maioria dos ensaios, as concentrações de biomassa se estabilizaram em aproximadamente 9 horas de fermentação, exceto no ensaio 10 (Tabela 11). As diferenças encontradas entre os ensaios podem ser explicadas por possíveis erros experimentais, principalmente para o tempo zero, já que as proporções de inóculo adicionado em todos os ensaios foram iguais. Portanto, pode ter ocorrido má homogeneização do meio no momento da retirada de amostra para a leitura da densidade ótica. Ainda, deve-se considerar que o tratamento com alcalase libera aminoácidos, que são utilizados como nutrientes pela levedura alcoólica, assim, nos ensaios com maiores concentrações de alcalase, houve maior crescimento microbiano.

Para todos os ensaios, foi possível constatar o crescimento celular em relação ao tempo de fermentação (Figura 13). Assim, foi possível construir a curva de crescimento microbiano, que não se apresentou muito detalhada devido à leitura da densidade ótica ter sido realizada em tempos muito espaçados, sendo necessária a obtenção de mais pontos para maior detalhamento gráfico.

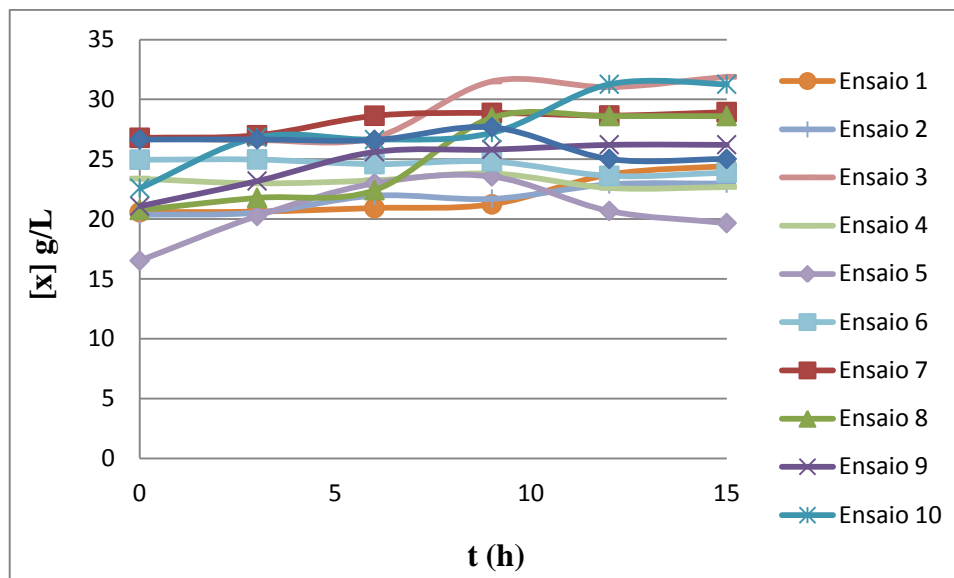


Figura 13 – Acompanhamento da concentração celular durante a fermentação alcoólica

Logo, constatou-se que a fermentação alcoólica ocorreu num período de aproximadamente 9 horas, tempo que correspondeu à estabilização da concentração de A.R., devido ao fato dos substratos estarem disponíveis à levedura alcoólica, às baixas concentrações iniciais de substrato, não ocasionando, portanto, repressão ao metabolismo da levedura e devido à alta concentração de inóculo utilizada (5%) para uma cultura ativa.

Daré (2008) afirma que o tempo de fermentação é influenciado pela redução da taxa de crescimento celular, que quanto menor, maior o tempo de fermentação.

6.4.3 Determinação de Etanol

Na Tabela 12 estão apresentados os valores para o rendimento em etanol dos 11 ensaios do DCCR, nos tempos de 6 e 12 h de fermentação.

Tabela 12 – Porcentagem de etanol em 12h de fermentação.

Ensaio	6 h	12 h
	Etanol (%) ^a	
1	2,00 ± 0,04	2,02 ± 0,07
2	2,03 ± 0,03	2,11 ± 0,01
3	2,00 ± 0,01	2,35 ± 0,01
4	2,03 ± 0,02	2,35 ± 0,01
5	2,16 ± 0,01	2,33 ± 0,02
6	1,98 ± 0,04	2,00 ± 0,03
7	2,10 ± 0,06	2,15 ± 0,01
8	2,11 ± 0,02	2,40 ± 0,01
9	2,01 ± 0,03	2,07 ± 0,02
10	2,29 ± 0,01	2,92 ± 0,05
11	2,00 ± 0,04	2,32 ± 0,00

^a Resposta porcentagem de etanol nos tempos 6 e 12 h de \pm erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

Depois de transcorridas 6 horas de fermentação, o percentual de etanol apresentou pequena alteração, confirmando que o processo de fermentação durou em torno de 9 horas, tempo que correspondeu à estabilização da concentração de biomassa e ao consumo do substrato. Exceto para o ensaio 10, no qual a fermentação prolongou-se por mais tempo, observando-se um pequeno aumento na concentração de etanol depois de 6 h (em torno de 0,63%) e também na concentração celular ($4,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), após 9 h de fermentação.

Watanabe et al. (2009) avaliando a produção de bioetanol a partir da fermentação alcoólica do farelo de arroz e da água de lavagem do arroz, obtiveram um rendimento em etanol de 1,2% quando a hidrólise enzimática foi conduzida sem o tratamento ultrassônico e a adição de protease e lipase, previamente às enzimas amilolíticas.

Os autores Jieun et al. (2009) avaliaram a produção de etanol e butanol a partir de polissacarídeos do farelo de arroz integral e desengordurado na proporção de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, verificando como resultados $0,19$ e $0,29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol produzido a partir do farelo de arroz integral e do desengordurado, respectivamente.

Visando a otimização da produção de bioetanol a partir de sub-resíduos industriais, Ruiz et al. (2012) avaliaram a fermentação alcoólica da palha de trigo, determinando concentrações de etanol de 1,3% após 24 h de fermentação.

Esses resultados indicam o potencial do farelo de arroz para a utilização em processos fermentativos, visto que os resultados encontrados neste trabalho foram superiores aos observados pelos autores acima citados.

Avaliando o percentual de etanol produzido após 6 e 12 h de fermentação para o DCCR (Tabela 13), verificou-se que quando as variáveis encontravam-se nos níveis superiores e inferiores (+1 e -1) e nos pontos centrais, os percentuais de etanol praticamente não diferiram entre si. Ainda, quando a variável concentração de alcalase passou do nível inferior ($-\alpha = 0 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$) para o superior ($+\alpha$), com a variável tempo de exposição ao ultrassom fixa no ponto central, ocorreu diminuição na resposta percentual de etanol para 6 e 12 horas de fermentação, o que comprovou, novamente, o efeito negativo desta variável sobre a resposta. Quando a variável tempo de exposição ao banho ultrassônico passou do nível inferior ($-\alpha = 0 \text{ min}$) para o superior ($+\alpha$), mantendo a concentração de alcalase fixa no ponto central, ocorreu acréscimo na resposta. Estas foram às mesmas constatações verificadas para a resposta concentração de A.R.

Tabela 13 – Matriz de ensaio do DCCR com os níveis reais entre parênteses e codificados das variáveis sobre a resposta % de etanol, nos tempos 6 e 12 horas de fermentação.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Etanol 6 h (%) ^c	Etanol 12 h (%) ^d
1	-1 (3,6)	-1 (3)	2,00 ± 0,04	2,02 ± 0,07
2	+1 (21,4)	-1 (3)	2,03 ± 0,03	2,11 ± 0,01
3	-1 (3,6)	+1 (17)	2,00 ± 0,01	2,35 ± 0,01
4	+1 (21,4)	+1 (17)	2,03 ± 0,02	2,35 ± 0,01
5	-1,41 (0,0)	0 (10)	2,16 ± 0,01	2,33 ± 0,02
6	+1,41 (25,0)	0 (10)	1,98 ± 0,04	2,00 ± 0,03
7	0 (12,5)	-1,41 (0)	2,10 ± 0,06	2,15 ± 0,01
8	0 (12,5)	+1,41 (20)	2,11 ± 0,02	2,40 ± 0,01
9	0 (12,5)	0 (10)	2,01 ± 0,03	2,07 ± 0,02
10	0 (12,5)	0 (10)	2,29 ± 0,01	2,92 ± 0,05
11	0 (12,5)	0 (10)	2,00 ± 0,04	2,32 ± 0,00

^a Concentração de protease ($\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$); ^b Tempo de exposição ao ultrassom (min);

^{c, d} Resposta porcentagem de etanol nos tempos 6 e 12 h de fermentação (%) ± erro padrão - os resultados representam a média de 3 determinações;

Analisando os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão do modelo quadrático apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para a resposta percentual de etanol após 6 h de fermentação.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	2,10	0,07	29,30	0,000*
x ₁ (L)	-0,02	0,04	-0,55	0,6042
x ₁ (Q)	-0,03	0,05	-0,63	0,5516
x ₂ (L)	0,00	0,04	0,04	0,9694
x ₂ (Q)	-0,01	0,05	-0,30	0,7747
x ₁ x x ₂	0,00	0,06	0,00	1,0000

*p≤0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Tabela 15 - Coeficientes de regressão para a resposta percentual de etanol após 12 h de fermentação.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t (5)	p-valor
Média	2,10	0,07	29,30	0,0000*
x ₁ (L)	-0,02	0,04	-0,55	0,6042
x ₁ (Q)	-0,03	0,05	-0,63	0,5516
x ₂ (L)	0,00	0,04	0,04	0,9694
x ₂ (Q)	-0,01	0,05	-0,30	0,7747
x ₁ x x ₂	0,00	0,06	0,00	1,0000

*p≤0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Por meio das Tabelas 14 e 15, verificou-se que os tratamentos não diferiram significativamente entre si a 95% de significância, ou seja, constatou-se que qualquer valor utilizado para as variáveis, dentro da faixa estudada, não ocasionou diferença significativa na resposta obtida. Estas considerações foram às mesmas evidenciadas para a resposta concentração de açúcares redutores, confirmando novamente que os tratamentos não diferiram entre si.

6.5 TESTES REALIZADOS PARALELAMENTE AOS PLANEJAMENTOS

Visando a máxima liberação de açúcares redutores e a condição ideal para que o processo de hidrólise enzimática ocorresse, selecionaram-se as condições do ensaio que resultou em maior concentração de açúcar redutor (Ensaio 8 = $12,5 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ de enzima alcalase e 20 min de exposição ao banho ultrassônico, do DCCR na frequência de 80 kHz) e repetiu-se o experimento em condições diferentes das realizadas anteriormente (agitação em banho termostático a 100 RPM, Figura 15). As seguintes condições foram utilizadas: chapa de aquecimento com agitação magnética (Figura 14a), banho termostático com agitação mecânica (Figura 14b) e em *shaker* com agitação orbital (Figura 14c) a fim de comparar os ensaios e determinar a melhor condição para o processo de hidrólise enzimática, ou seja, verificar se as variáveis agitação e forma de transferência de calor (condução ou convecção) interfeririam no processo de sacarificação.

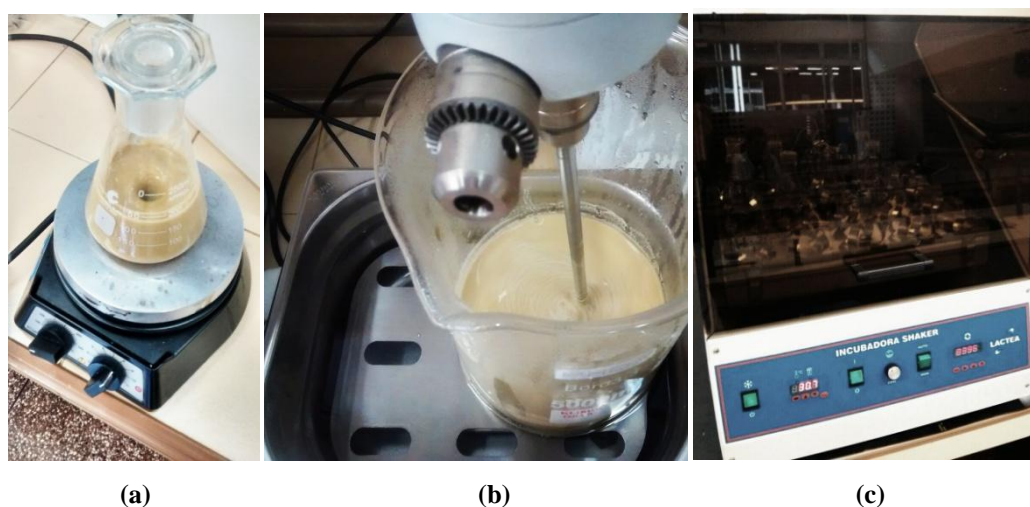


Figura 14 – Chapa de aquecimento com agitação magnética (a) Teste no banho termostático com agitação mecânica (b) *shaker* com agitação orbital (c)



Figura 15 – Banho termostático com agitação de 100 RPM

Após a realização dos testes quantificaram-se os açúcares redutores proveniente das diferentes condições de agitação durante a hidrólise enzimática, os quais estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Comparação das condições de realização da etapa de hidrólise enzimática para o ensaio 8 do DCCR na frequência de 80 kHz.

Ensaio 8	
Condição	Concentração de A.R. ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Chapa de aquecimento	$52,05 \pm 0,54$
Banho com agitação mecânica	$77,10 \pm 0,54$
<i>Shaker</i> agitação orbital	$53,01 \pm 0,40$
Banho agitação 100 RPM	$65,54 \pm 0,53$

Verificou-se na Tabela 16 que as condições em que a hidrólise enzimática foi realizada interferiram na concentração de açúcares redutores obtidos. A realização da hidrólise em *shaker* com agitação orbital e na chapa de aquecimento apresentaram resultados semelhantes. Foi constatado que na chapa de aquecimento a transferência de calor não foi homogênea (maior aquecimento no fundo do recipiente) e que ocorreram grandes perdas de calor para o ambiente. Além disso, transferência de calor por condução é menos eficiente em relação à por convecção. No *shaker* averiguou-se que condições melhores poderiam ter sido alcançadas, porém a máxima temperatura alcançada neste equipamento era de 60 °C, sendo que a atuação da α -amilase ocorre a 90 °C, como no banho termostático com agitação de 100 RPM (como feito nos ensaios do planejamento). Esta etapa é crítica na obtenção de maiores concentrações de A.R., pois se não for realizada adequadamente dificulta a atuação da enzima amiloglicosidase. Ressalta-se que a transferência de calor no *shaker*, convecção, é mais eficiente em relação à chapa de aquecimento, condução.

A condição ideal, portanto, foi verificada quando a hidrólise enzimática foi realizada em banho termostático com um agitador mecânico (100 RPM), sendo a transferência de calor do sistema por convecção e a agitação do mosto realizada de forma homogênea e contínua. Por conseguinte, constatou-se que a agitação interferiu diretamente no processo de quebra das moléculas complexas.

Carvalho (2011) e Ribeiro (2010) afirmam que para uma hidrólise efetiva é necessário otimizar o processo, pois o rendimento da hidrólise é governado por vários fatores, como pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e, principalmente, a

velocidade de agitação. Assim, a agitação do mosto no momento da hidrólise interfere no rendimento do processo.

Este fato está relacionado à relação entre a velocidade de difusão da enzima no filme líquido em torno do substrato e a velocidade intrínseca de reação, que ocorre quando a enzima alcança a superfície sólida do substrato. Para esta reação intrínseca ocorrer, além do transporte para a superfície do substrato, é preciso que, a enzima seja adsorvida fisicamente a ele. Assim, a taxa de reação global é determinada por três eventos em sequência: velocidade de transferência de massa de enzima, velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e velocidade de catálise. Quanto maior a velocidade do fluido, menor a espessura do filme estagnado, portanto maior o coeficiente de transferência de massa no filme e conseqüentemente maior a velocidade de difusão, justificando a importância da agitação neste processo (CARVALHO, 2011). Porém a influência da velocidade de agitação depende do substrato estudado e possivelmente do esquema experimental utilizado, pois estas características alteraram a resistência ao transporte de massa no filme externo ao substrato sólido em cada caso.

Ortiz (2012) afirma que o aumento da velocidade de agitação possui maior influência na extração de glicose do que o aumento da temperatura, pois mesmo na temperatura ambiente, é possível obter maiores concentrações de glicose, desde que a velocidade de agitação seja alta. Ainda, o autor afirma que com o aumento da velocidade de agitação, há diminuição da relação sólido/líquido, e conseqüentemente, são obtidas maiores concentrações de glicose na extração a partir do meio sólido hidrolisado.

Tendo em visto estas considerações, objetivou-se repetir os ensaios dos DCCRs nestas condições para avaliar quais seriam os resultados obtidos, porém não foi possível realizá-los, já que a universidade possui apenas um agitador compartilhado por todos os alunos, sendo também o tempo curto para tal, o que dificultou, portanto, a realização dos 22 ensaios dos planejamentos. Portanto recomenda-se para futuros trabalhos a avaliação da hidrólise enzimática nestas condições constatadas, investigando-se a mesma por meio do DCCR aplicado neste trabalho.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando como resposta do DCCR a concentração de açúcares redutores, para a otimização da hidrólise enzimática, concluiu-se que:

- As diferentes frequências utilizadas no banho de ultrassom anterior à ação das enzimas amilolíticas influenciaram na resposta de concentração de açúcares redutores, sendo as maiores respostas verificadas nos ensaios realizados na frequência de 80 kHz;
- O uso da frequência de 37 kHz não foi apropriado ao processo, visto as baixas concentrações de açúcares obtidas. Além do que, nesta frequência, observou-se, através da superfície de resposta, que as variáveis do DCCR nos ensaios de $0 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ de enzima alcalase e 0 min de exposição ao banho de ultrassom foram os ensaios ajustados;
- Portanto a frequência de 80 kHz foi a mais adequada ao processo. Neste DCCR constatou-se que quaisquer valores utilizados para as variáveis concentração de alcalase e tempo de exposição ao banho de ultrassom, dentro das faixas estudadas, resultariam estatisticamente semelhantes, visto que os efeitos das variáveis não foram significativos a 95% de significância.

Considerando como resposta do DCCR o rendimento em etanol da fermentação alcoólica, concluiu-se que:

- As mesmas considerações obtidas dos ensaios para a resposta de concentração de açúcares redutores foram constatadas para a resposta de percentual de etanol. Assim, foi possível confirmar que quaisquer valores assumidos para as variáveis concentração de enzima alcalase e tempo de exposição ao banho de ultrassom, dentro das faixas estudadas, resultaram em respostas semelhantes para o percentual de etanol;
- Na etapa da fermentação alcoólica, as baixas concentrações iniciais de substrato e a alta concentração inicial de inóculo juntamente com a utilização de uma cultura ativa, justificaram o rápido tempo em que foi transcorrida a fermentação alcoólica, avaliada pela concentração de biomassa, concentração de açúcares redutores e porcentual de etanol. Por este motivo, não foi possível avaliar todos os pontos da curva de crescimento microbiano, devido ao fato do acompanhamento da concentração de biomassa ter sido realizado num período de tempo muito espaçado;
- Comprovou-se a importância da agitação e da transferência de calor através dos testes realizados para se determinar a melhor condição da hidrólise enzimática, visto as

maiores concentrações de açúcares redutores obtidas, $77,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, quando comparada à concentração obtida nos ensaios em *shaker* ($65,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando $12,5 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$ de enzima alcalase e 20 min de exposição ao banho ultrassônico;

- Com estes resultados obtidos, constatou-se, portanto, que a agitação mecânica teve grande influência na hidrólise enzimática. Assim, uma sugestão para trabalhos futuros é a realização de estudos que comprovem a influência da agitação neste processo sem o tratamento com a enzima alcalase, já que a mesma apresentou efeito negativo nas respostas concentrações de açúcares redutores e percentual de etanol.

8 REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Volume 1. **Métodos Químicos e Físicos para Análise dos Alimentos**. 3º Edição. São Paulo, 1985.

ALMEIDA, R. R. **Estudo do bagaço de mandioca (*Manihot esculenta* C.), nativo e tratado com α -amilase e amiloglucosidase, por meio de técnicas termoanalíticas**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. 2009. 92 f. Dissertação (mestrado em ciências em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

BARTON, S.; BULLOCK, C.; WEIR, D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. **Enzyme and microbial technology** v. 18, p. 190-194, 1996.

BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M.; BLOS, A. L. F.; SILVA, T. N. Análise preliminar da produção de etanol a partir de celulose: caminhos e desafios para a produção de álcool no Rio Grande do sul. **Revista Engenharia Ambiental**, v.6, n.2, p. 272 - 284, mai/ago 2009.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

CARVALHO, M. L. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2011.

CARVALHO, S. P.; CARRIJO, E. L. O. A produção de álcool: do proálcool ao contexto atual. XLV CONGRESSO DA SOBER - "Conhecimentos para Agricultura do Futuro", 22 a 25 de julho de 2007 – UEL – Londrina- Pr. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/6/685.pdf>>. Acesso em 20 out. 2014.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Revista Nucleus**, v.6, n.2, out. 2009.

COLLARES, R. M. **Otimização do processo de hidrólise da mandioca “in natura”, com o uso de enzimas amilolíticas e pectinolítica**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento. **Brasília**, p. 30, mar. 2014.

CONDON, B.; EASSON, M.; YACHMENEV, V.; LAMBERT, A.; DELHOM, C.; SMITH, J. Application of a low-level, uniform ultrasound field for the acceleration of enzymatic bio-processing of cotton. **Cellulose chemistry and Technology**, v.43, p. 443-453, 2009.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S. de; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando à obtenção de etanol**. 2010. 48f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Alagoas, 2010.

DARÉ, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2008.

DEVI, E.S.; VIJAYENDRA, S.V.N.; SHAMALA, T.R. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra- and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p.80-84, 2012.

DIETERICH, F. **Desenvolvimento, avaliação físico-química e biológica de hidrolisado proteico de resíduos agroindustriais para surubim**. 2014. 74 f. Tese (Doutorado em Aquicultura). Programa de pós-graduação em Aquicultura – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal – SP, 2014.

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; FURLONG, E. B. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 219-224, jan.-mar. 2009.

FRADE, V. M. F. Estudo do aumento de escala do processo enzimático de hidrólise da celulose obtida a partir de resíduos lignocelulósicos do bagaço de cana (*Saccharum officinarum* L.). Projeto de Iniciação Científica, Relatório Final – Centro Universitário da FEI, 2011.

FERREIRA, L. C. C. **Caracterização do potencial energético entre a produção de etanol celulósico e a cogeração a partir do bagaço de cana**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia mecânica) – Departamento de Engenharia mecânica, Universidade Federal de Brasília, 2010.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Aplicação do ultra-som em sistemas eletroquímicos: considerações teóricas e experimentais. **Quím. Nova** v.31, n. 1, São Paulo, 2008.

HERNANDEZ, C. C.; CARRILLO, E. P.; SERNA-SALDIVA, S. O. Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize. **Journal of Cereal Science** v. 50, n. 1, p. 131–137, July 2009.

JIEUN, L.; SEO, E.; KWEON, D.; PARK, K.; JIN, Y. Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n.5, p. 482–490, Fev.2009.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The Rice Grain And Its Gross Compos. **Rice: chemi. and tec.** Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985.

KORN, M.; SANTANA, M. V. A.; BORGES, S. S. Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som. Revista **Analytica**, n. 3, p. 34-39, fev. 2003.

KÜSTER, M. Arroz. Disponível em:< <http://maquel.com.br/blog/2013/12/04/alimentacao-e-nutricao-arroz/>>. Acesso em 08 out. de 2014.

LACERDA, D. B. C. L.; SOARES JÚNIOR, M.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, M. V. L. C.; LOBO, V. L. S.; CAMPOS, M. R. H.; SIQUEIRA, B. S. Qualidade de farelos de arroz cru, extrusado e parboilizado. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 521-530, out./dez. 2010.

LEÃES, E. X. **Efeito do ultra-som na atividade de enzimas amilolíticas e sobre a eficiência de hidrólise de amido de mandioca**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos) – Programa de Pós-Graduação em engenharia de Processos, Santa Maria – RS, 2012.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. Revista **Ano XV**, n. 3, Jul./Ago./Set. 2006.

MOTA, B. O.; PILETTI, R. **Elaboração de biscoito sem glúten a partir de subprodutos do Arroz**. 2012. 15 f. Trabalho de conclusão de estágio (Curso superior de Tecnologia de alimentos) - Universidade do extremo sul catarinense, 2012.

NASCIMENTO, J. R. A. **Monitoramento em tempo real de processos fermentativos por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)**. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

NUNES, R. M.; GUARDA, M. A.; MONTEL, A. L. B.; SOUZA, D. A.; GUARDA, P. M. Hidrólise enzimática do efluente gerado na produção de papel via farelo de arroz. X CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 2009. Disponível em:<www.meioambientepocos.com.br/portal/anais>. Acesso em: 21 jan. 2014.

OKAMOTO, K.; NITTAA, Y.; MAEKAWAB, N.; YANASEA, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 48, n. 3, p. 273–277, march 2011.

OMORI, W. P.; PIRES, R. T.; OGASSAVARA, F. O.; FRIGIERI, M. C. Emprego de cepas de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 28-49, 2011.

ORTIZ, S. **Produção de Bioetanol a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química -Universidade Regional de Blumenau, 2010.

ÖZBEK, B. e ÜLGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

PAGNONCELLI, M. G. B. **Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividades nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1º ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p. 760, 2005.

PARENTE, G. D. L. **Cinética da fermentação e da destilação na produção de aguardente de abacaxi**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

PESTANA, R. V.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: Características, benefícios à saúde e aplicações. **B. CEPPA**, Curitiba v. 26, n. 1, p. 29-40 jan./jun. 2008.

POLIDORO, T. A. **Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, 2009.

PRETORIUS, I. Tailoring Wine Yeast for The New Millennium: Novel Approaches To The Ancient Art Of Winemaking. **Yeast**. v.16, n.8, p.675-729, Jun. 2000.

RIBEIRO, J. A. B. **Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos utilizando extrato enzimático produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

RUIZ, A. H.; SILVA, P. D.; LIMA, F. L.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, A. J. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. **Fuel**, v.95, p.528-536, May, 2012.

SAKAKIBARA, M.; WANG, D.; TAKAHASHI, R.; MORI, S. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. **Enzyme and microbial technology** v. 18, p. 444-448, mai. 1996.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.

Schmidt, C. G.; Mellado, M. S. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Quím. Nova** vol.32 n.º 5 - São Paulo, 2009.

SIEPMANN, F. B.; PAZUCH, C. M.; ZOCHÉ, E. P.; ZABOTTI, C.; COLLA, E. Farelo de arroz desengordurado como substrato para produção de bioetanol. VI SIMTEA - VI Simpósio de Tecnologia e Engenharia de Alimentos - UTFPR, Campo Mourão, PR, Brasil set/out de 2014.

SILVA, C. C. F.; CALIARI, M.; SOARES, M. S. J. Caracterização química de farelo de arroz in natura e extrusado. SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 2012. Disponível em: <<http://www.sbcnet.org.br/>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

SILVA, C. C. S. **Qualidade de rapaduras enriquecidas com farelo de arroz extrusado e amêndoas de baru/amendoim torrados**. 2012. 123 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, 2012.

SILVA, C. M. P. **Tratamento alcalino e enzimático de fibras sintéticas**. 2002. 104 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de fabricação). Departamento de Engenharia têxtil – Universidade do Minho, Largo Paço – Portugal, 2002.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 89 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso superior em Tecnologia de biocombustíveis. Faculdade de tecnologia de Araçatuba, 2010.

SILVEIRA, C.; FURLONG, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p.805-811, 2007.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2005.

TELEBNA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, July 2010.

VANZELLA, E.; BARICCATTI, R. A.; NOGUEIRA, C. E. C.; MICUANSKI, V. C.; COSTA, M. A. Processo fermentativo na indústria sucroalcooleira. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.3, n.1, p. 50-58, 2014.

WATANABE, M.; TAKAHASHI, M.; SASANO, K.; KASHIWAMURA, T.; OZAKI, Y.; TSUIKI, T.; HIDAKA, H.; KANEMOTO, S. Bioethanol production from rice washing drainage and rice bran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 524–526, dec. 2009.

WERLE, L. B.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A.; MAYER, F. D. Avaliação de duas rotas tecnológicas para a produção de etanol a partir de resíduos do processamento de arroz, milho e mandioca. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCMBUSTÍVEIS, 2012, Canoas-RS. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/biocom/2012/trabalhos/>>. Acesso em: 21 jan. 2014.

ZAMOR, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation in Wine Chemistry and Biochemistry. **Moreno-Arribas**, Spain, p. 437, 2009.