
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS ,
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - MICROBIOLOGIA APLICADA**

**“AÇÃO DE ULTRA-SOM EM LEVEDURAS NO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA”**

CLÁUDIA RIBEIRO LEONE PEDRO

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Área de
Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2008**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS ,
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - MICROBIOLOGIA APLICADA**

**“AÇÃO DE ULTRA-SOM EM LEVEDURAS NO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA”**

CLÁUDIA RIBEIRO LEONE PEDRO

Orientador: Prof. Dr. Roberto Naves Domingos

Co-orientadora: Profa. Dra. Dejanira de F. de Angelis

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Área de
Microbiologia Aplicada)**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março - 2008**

547.29 Pedro, Cláudia Ribeiro Leone
P372a Ação de ultra-som em leveduras no processo de
fermentação etanólica / Cláudia Ribeiro Leone Pedro. – Rio
Claro : [s.n.], 2008
xiii, 51 f. : il., tabs, gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Roberto Naves Domingos
Co-orientador: Dejanira Francheschi de Angelis

1. Fermentação. 2. Irradiação. 3. Permeabilidade . 4.
Etanol. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

“À DEUS,

pela vida, pela saúde, pela sabedoria e
pela oportunidade de crescimento.

Ao meu querido marido Ricardo pela
paciência, compreensão e apoio.

À minha adorável filha Débora melhor
presente em vida.”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Naves Domingos pela oportunidade de realização deste sonho.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pela co-orientação, pelo incentivo, paciência, estímulo e crédito.

À UFSCAR na pessoa do Prof. Dr. Jorge José Correa Lopes, aos técnicos: Ernestina, Cláudia e Renato pela possibilidade de execução de análises.

A todos os amigos conquistados no Departamento: Dilza, Inês, Maria Luisa, Beto, Zito, Márcio, Letícia, Luciano, Ronaldo, Ângela, Nega, entre outros, que de diversas formas colaboraram.

Aos amigos: Ariane, Mariana, Danilla, Marcela, Ângela, Fabiana, Kate, Roberta, Adriana, César, Alex, pelo carinho que sempre me dedicaram, pela paciência, pelos “toques” que sempre precisei, pelas conversas, e principalmente pelos momentos de descontração e risadas que tivemos.

Aos meus pais Vicente e Ana Rosa, que embora não se encontrem mais presentes fisicamente, nunca deixaram de se fazer presentes em cada instante de minha vida, tanto nos momentos de alegria, satisfação por mais uma conquista, quanto nos momentos difíceis que se apresentaram durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha irmã Márcia, que a toda semana ligava me encorajando, juntamente ao Francisco que me ajudou com os textos e ao meu sobrinho Murilo.

Aos meus sogros pela grande colaboração junto à Débora, pelas orações da Tia Tereza e pela torcida do Tio Zaga.

A todos da imensa “família” a qual pertenço, pelo apoio e torcida.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.Ultra-som (US)	4
3.1.1 Utilização de US em microrganismos.....	10
3.2 Leveduras.....	13
3.3. Fermentação.....	15
3.3.1 Sistemas de Fermentação	18
4. MATERIAL E MÉTODO	19
4.1 - Material	19
4.1.1 - Microrganismo.....	19
4.1.2 - Meio de Cultivo	19
4.1.2.1 - Mel de fabricação de açúcar	19
4.1.2.2 - Meio de cultura para <i>S. cerevisiae</i>	20
4.1.3 - Soluções e Reagentes.....	20
4.1.3.1 - Solução de H ₂ SO ₄ – 0,1 N	20
4.1.3.2 - Solução de NaOH – 0,05N	20
4.1.3.3 - Solução de fenolftaleína	20
4.1.3.4 - Solução de eritrosina	20
4.1.3.5 - Reagente de ácido 3,5 dinitrosalicílico (ADNS).	20
4.1.4 - Vidraria e Equipamentos	20
4.2 - Métodos.....	21
4.2.1 – Método de preparo do meio de cultura	21
4.2.2 - Preparo de inóculo	21
4.2.3 Aplicação de Ultra-Som (US).....	21
4.2.3.1 Experimento I.....	22
4.2.3.2 Experimento II	23
4.2.3.3 Experimento III.....	23

4.2.3.4 Experimento IV	24
4.2.4 Fermentação	26
4.2.5 Acompanhamento do Processo Fermentativo	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 - Resultados do experimento I	29
5.1.1 - Acompanhamento das medidas de pH.....	29
5.1.2 - Determinação da acidez sulfúrica g/L	30
5.1.3 - Acompanhamento da viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i>	31
5.1.4 - Acompanhamento do número de células de <i>S. cerevisiae</i>	32
5.1.5 - Resultados da avaliação da fermentação de <i>S. cerevisiae</i> , sem e com tratamento de US com aplicação de 30 segundos após 9 horas de fermentação.	34
5.1.6 - Desempenho fermentativo de <i>S. cerevisiae</i> durante 9 horas à 30°C ± 2°C, contendo 10° Brix com 7,5g ART inicial, sem e com tratamento de US no tempo zero hora.. ...	36
5.2 - Resultados do experimento II, sem e com tratamento de ultra-som (US) no tempo zero hora	39
5.3 Resultados do experimento III, sem e com tratamento de ultra-som (US)	40
5.3.1 Resultados da avaliação da fermentação de <i>S. cerevisiae</i> , sem e com tratamento de US nos tempos 0 e 3 horas, com aplicação de 30 segundos em mosto com 7,5 g/100 mL de ART inicial	40
5.4 Resultados do experimento IV, sem e com tratamento de ultra-som (US).....	42
5.4.1 Quantificação da produção em g/100mL de etanol da fermentação de <i>S. cerevisiae</i> sem e com tratamento de US nos tempos 0; 3; 6 e 9 horas, com aplicação de 30 segundos em mosto com 7,5g/100 mL de ART, empregando recícos de células (amostras em duplicata)	42
5.5 Observações sobre a formação de espuma durante processo fermentativo	43
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de reações enzimáticas efetuada pela fermentação alcoólica, conduzida por <i>Saccharomyces</i> (LIMA, et al, 2001).....	17
Figura 2 -	Equipamento Gerador de Ultra-som	21
Figura 3 -	Esquema de procedimento do Experimento IV com 2 ciclos de células em processo de fermentação com ciclo de 9 horas cada.....	25
Figura 4 -	Médias das quantificações do pH do experimento I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	30
Figura 5 -	Médias das quantificações de acidez sulfúrica em g/L do experimento I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	31
Figura 6 -	Médias das quantificações da viabilidade celular do experimento I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	32
Figura 7 -	Médias das contagens microscópicas do número de células ($\times 10^8$) dos 5 ensaios do experimento I de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	33
Figura 8 -	Quantificação média de 5 repetições em quintuplicatas da produção de etanol em g/100 mL nos tempos: 3 ; 6 e 9 horas de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem tratamento de US	34
Figura 9 -	Quantificação média de 5 repetições em quintuplicatas da produção de etanol em g/100 mL nos tempos: 3 ; 6 e 9 horas de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com tratamento de US.....	35
Figura 10 -	Resultados médios comparativos de 5 repetições em quintuplicatas do rendimento real (RR) em porcentagem, do processo fermentativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem tratamento de US no tempo de 0 hora de fermentação	36
Figura 11 -	Resultados médios comparativos de 5 repetições em quintuplicatas do rendimento real (RR) em porcentagem, do processo fermentativo em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com tratamento de US no tempo de 0 hora de fermentação	37
Figura 12 -	Quantificação média comparativa de 5 repetições em triplicata da variabilidade da porcentagem de etanol durante processo fermentativo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , sem e com tratamento de US em 0 hora de fermentação nos tempos: 1,5 ; 3 e 4,5 horas	39

- Figura 13 - Quantificação da porcentagem das diferenças de produção de etanol, durante processo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas entre amostras controle e as amostras irradiadas com US em 0 hora de fermentação nos tempos: 1,5 ; 3 e 4,5 horas. 40
- Figura 14 - Produção de espuma durante fermentação em mosto com *Saccharomyces cerevisiae*, em amostras sem e com tratamento de US em 0 hora de fermentação. T₀ início, T₉ final..... 44
- Figura 15 - Mosto em etapa fermentativa com *Saccharomyces cerevisiae*, com 3 horas de fermentação, após homogeneização para amostragem, sem e com tratamento de US aplicado no início (0 hora). 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo de acompanhamento de análises no processo fermentativo do Experimento I.....	22
Tabela 2 -	Protocolo da programação de tempo de amostragem	27
Tabela 3 -	Resultados médios comparativos obtidos da variação do pH, nos tempos de 0 ; 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US.....	29
Tabela 4 -	Resultados médios comparativos obtidos da determinação de acidez sulfúrica g/L, nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US.....	30
Tabela 5 -	Resultados médios percentuais obtidos da variação da viabilidade celular , nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US	31
Tabela 6 -	Média das contagens do número de células ($\times 10^8$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , avaliadas por contagem microscópica, nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US.....	33
Tabela 7 -	Quantificação comparativa média da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3; 6 e 9 horas de fermentação sem (controle) e com tratamento de US no tempo de 0 hora, com amostras mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,obtidos em 5 ensaios , sendo que cada valor inserido na tabela representa a média de 5 repetições.....	34
Tabela 8 -	Quantificação média dos parâmetros da fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> realizado em 5 repetições em quintuplicata sem tratamento de US	36
Tabela 9 -	Quantificação média dos parâmetros da fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> realizado em 5 repetições em quintuplicata com tratamento de US	37
Tabela 10 -	Quantificação comparativa média da produção em % de etanol, de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em mosto com 7,5 g/100 mL de ART, nos tempos de 1,5; 3 e 4,5 horas de fermentação sem e com tratamento de US no tempo 0 hora, mantidos à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	39
Tabela 11 -	Quantificação média de 5 repetições em quintuplicata da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem tratamento de US no tempo de 0 e 3 horas, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	41
Tabela 12 -	Quantificação média de 5 repetições em quintuplicata da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação com tratamento de US no tempo de 0 e 3 horas, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	41
Tabela 13 -	Quantificação média da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US nos tempos de 0 ; 3 ; 6 e 9 horas, mantidos à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, empregados 2 ciclos de células.....	42

Tabela 14 - Diferenças das médias da porcentagem de etanol dos tempos iniciais em relação aos tempos de 6 e 9 horas de fermentação	43
--	----

RESUMO

O crescente interesse mundial no aumento da produção do etanol como combustível alternativo bem como seu uso na indústria alcoolquímica através de processos de fermentação, tem proporcionado o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliem no aumento de sua produtividade e rendimento. Este estudo, portanto, relata a influência das ondas ultra-sônicas durante processo fermentativo quando aplicada radiação em mosto contendo *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma objetivou-se verificar se a aplicação do ultra-som no processo fermentativo induz alguma alteração quanto à produção de etanol. As ondas ultra-sônicas foram geradas com sonda vibratória de 19 KHz, a potência de 80 W com duração de 30 segundos a cada aplicação efetuada. Foram realizados quatro experimentos fermentativos empregando-se *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento fresco prensado Fleischmann Royal[®]. Celular Todos os experimentos foram elaborados com 5 repetições e as amostras para as análises dos experimentos I, III e IV, foram coletadas tempos 3; 6 e 9 horas de fermentação, exceto no experimento II que as amostragens foram nos tempos 1,5; 3 e 4,5 horas. As amostras para as análises destes, foram coletadas antes e após o procedimento de irradiação. Em todos os experimentos houve a coleta de amostras controle. Analisou-se nos mostos fermentados do experimento I: pH, acidez sulfúrica, número de células, viabilidade celular, produção de etanol, açúcar residual total e rendimentos fermentativos (prático, teórico, real e real do práctico). Nos experimentos II, III e IV analisou-se somente a produção de etanol. No experimento IV foi realizado reciclo de células onde as células foram submetidas a 3 fermentações sucessivas. Os dados comparativos indicaram que a irradiação com ultra-som, diminui o

pH e aumenta a acidez sulfúrica, quando comparado ao controle, supondo-se como causas: a maior liberação de CO₂ e ácidos orgânicos pela célula de *S. cerevisiae*. Quanto à viabilidade celular nas culturas irradiadas o índice manteve-se acima de 97,6%, não se mostrando significativo, o número de células contadas nas amostras irradiadas foi maior quando comparada ao controle provavelmente devido a melhor dispersão dessas células no meio. Segundo a rotina estabelecida para os experimentos I, II e III, as amostras irradiadas no tempo zero, evidenciaram que após 3 horas de fermentação, houve maior liberação percentual de etanol, quando comparada a um controle não irradiado. As amostras coletadas do processo de reciclo de células (experimento IV), mostraram-se com produção de etanol mais acentuada em relação à amostra controle, quando aplicado o ultra-som a cada 3 horas de fermentação.

ABSTRACT

The growing international interest in ethanol as an alternative to fossil fuels, as well as its industrial use by means of fermentative processes, has led to the development of new technologies aiming to increase ethanol productivity. This study therefore reports the influence of ultrasonic wave irradiation applied to sugar cane yeast containing *Saccharomyces cerevisiae*. Anyway the objective was to analyze the effects of ultrasound on the production of ethanol. The ultrasonic waves were generated with a vibratory frequency of 19 KHz, potency of 80 W, with 30 seconds duration during each treatment. A series of four fermentative experiments were performed using *Saccharomyces cerevisiae* contained in the fresh yeast Fleischmann Royal[®]. All experiments were performed with 5 repetitions. For experiments I, III, and IV, samples were analyzed at 3, 6, and 9 hours after starting the fermentation process; whereas in the experiment II sampling was performed at 1.5, 3, and 4.5 hours of fermentation. Sample collection was performed before and after the irradiation procedure. In all experiments control samples were collected. The pH, sulphuric acidity, cell viability, number of cells, ethanol production, total residual sugar, fermentative output (practical, theoretical, real, and practical of real) were determined in the yeast of experiment I. For experiments II, III, and IV, only ethanol production was determined. During experiment IV cells were recycled for 3 successive fermentations. The comparative data showed that ultrasound irradiation reduced the pH and increased sulphuric acidity when compared to the control; these effects were possibly caused by an increase in organic acids and in CO₂ production by the *S. cerevisiae* cells. Cell viability in the irradiated

cultures was above 97.6% (non significant from the control) and the number of cells in the irradiated samples was larger than in the control samples, probably due to a greater dispersion of the cells. On the basis of the methods used in the experiments I, II, and III, the ultrasound irradiation at time zero resulted in greater ethanol production after 3 hours of fermentation when compared to non-irradiated controls. The samples collected from the fermentation process with cell recycling (experiment IV) showed greater ethanol production than the controls when the ultrasound was applied every 3 hours of fermentation.

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de usar o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar como combustível automotivo é conhecida há mais de um século, mas até os anos 70 a disponibilidade de derivados de petróleo e o baixo custo desestimularam sua utilização como combustível.

Em 1973, o mundo viu-se ante o risco de desabastecimento energético. Foi o primeiro risco de escassez do petróleo que despertou o interesse mundial por fontes alternativas de energia e levou vários países a buscarem soluções mais adequadas. Na busca de alternativas para combustível líquido, o álcool adquiriu importância sem paralelo. No Brasil o estabelecimento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, possibilitou a intensificação na cadeia produtora de álcool, visando o atendimento do mercado interno e externo.

Trinta anos depois do início do Proálcool, o Brasil vive novo momento de euforia, movido por iniciativas de produção de álcool, pois o mesmo tem papel cada vez mais importante tanto como combustível alternativo, como também na forma de matéria prima para a indústria alcoolquímica.

A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros, dos quais presume-se que até 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. O Brasil responde por 15 bilhões de litros deste total. O álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, EUA, UE, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, no Japão. O uso exclusivo de álcool como combustível está concentrado no Brasil. Dos 700 milhões de litros por ano, em pouco tempo a indústria passou a produzir 15 bilhões de litros, para abastecer a frota de mais de 4 milhões de automóveis, que se movem com álcool hidratado e também, para misturar-se à toda a gasolina usada no país.

O Brasil é o país mais avançado, do ponto de vista tecnológico, na produção e no uso do etanol como combustível, seguido pelos EUA e, em menor escala, pela Argentina, Quênia, Malawi e outros.

O setor sucroalcooleiro brasileiro acredita que será um dos supridores mundiais de álcool combustível e de tecnologias modernas, para montagem de destilarias em outros países, pois as possibilidades de emprego do etanol produzido por fermentação como combustível de baixa emissão de particulados, substitutivo aos derivados de petróleo, além de aplicações na composição de bebidas e outros fins industriais, despertaram os interesses de outros países, por estas “comodities”. Tornou-se, portanto, condição fundamental, atingir altas eficiências de conversão do substrato, para se reduzir os custos de fabricação.

Visando esse aumento na produção, novas usinas estão sendo construídas e as já existentes sendo ampliadas e modernizadas.

A produção de etanol requer, portanto, novas tecnologias que auxiliem no aumento da produtividade e rendimento do produto, pois estes são fatores preponderantes para a competitividade em mercados mundiais. Por isso vários centros de pesquisa estão envolvidos em estudos que vão desde o plantio da cana-de-açúcar até a obtenção propriamente do álcool.

O álcool pode ser obtido de diversas formas de biomassa, sendo a cana-de-açúcar a realidade econômica atual.

A indústria sucroalcooleira, está em procura de tecnologias que contribuam para melhoria de seus processos produtivos, visando o aumento de eficiências. Pensando nisso, novos equipamentos estão sendo utilizados neste setor em pesquisa, como por exemplo, o ultra-som. Segundo MASON (2000), o ultra-som é reconhecido há muitos anos e tem grande potencial em ampla variedade de processos químicos aliados à indústria. Alguns desses processos são conhecidos há anos e continuam prosperando, principalmente em aplicações comerciais. Outros mecanismos do ultra-som mostram grande potencial e ainda não foram amplamente explorados. O potencial da utilização do ultra-som é grande, e ainda muitas indústrias apresentam alguma relutância em adotar novas e promissoras metodologias. Na verdade, muitos dos sistemas de ultra-som disponíveis e utilizados em processos, são pouco otimizados.

2. OBJETIVO

Buscando contribuir com a melhoria do processo de produção de etanol, o presente trabalho teve como objetivo verificar se a aplicação de ultra-som em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na etapa fermentativa, induz alterações na produção de etanol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.Ultra-som (US)

O som é resultado do movimento vibratório da matéria transmitido através de meios materiais e elásticos. Portanto, este fenômeno pode ser definido simplesmente como vibração. O nível de uma vibração determina o seu alcance. Níveis baixos de vibração, determinam alcances baixos e níveis altos de vibração, determinam alcances altos. O alcance está diretamente ligado à taxa de vibração. Quando esta taxa de vibração, ou ciclo, é expresso por unidade de tempo, é chamado de frequência que é expressa em Hertz ($\text{Hz} = \text{n}^\circ \text{ de ciclos / s}$).

As ondas sonoras constituem-se de ondas mecânicas ou acústicas, portanto não se propagam no vácuo e sim através de um meio. Estas surgem, quando as partículas, do qual um determinado meio é composto, são providas com energia e começam a vibrar. Estas partículas, nesta situação, transferem parte desta energia na forma de onda. Estas ondas mecânicas propagando-se em corpos sólidos dão origem ao fenômeno de vibração, que são propagadas nos líquidos, no ar, e são conhecidas como som (WILLIAMS, 1983).

O ultra-som é utilizado pela natureza, que dotou certos animais com a capacidade de emitir ondas ultra-sônicas. Os morcegos, golfinhos, mariposas se locomovem, encontram alimentos e afastam do perigo mediante ondas ultra-sônicas que eles próprios emitem.

Segundo Mason e Lorimer apud BARBOZA e SERRA (1992), as investigações sobre o ultra-som iniciaram em 1917 com Paul Langevin que estudou a propagação de ondas mecânicas

pelos sonares nos oceanos, ocasionado pela necessidade de se detectar “icebergs”, evitando desastres como o ocorrido ao Titanic em 1912.

A maior parte dos seres humanos pode detectar frequências da ordem de 20 KHz. Por este fato, frequências abaixo dessa faixa são chamadas de infra-som e as acima, de ultra-som .

A sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 20 Hz a 20 KHz, a frequência característica de ultra-som, em geral, está no intervalo de 20 KHz a 1 MHz. Sendo que frequências de 1 a 10 MHz correspondem à região de alta frequência (LORIMER e MASON, 1987; MASON 1990).

Enquanto frequências acima de 20 KHz não são usadas para comunicação oral entre seres humanos, estas são usadas em vasta aplicação que facilitam a vida cotidiana.

Após a Segunda Guerra houve aumento de aplicações do ultra-som nos mais diversos campos das atividades desenvolvidas pelo homem.

Como exemplo de aplicações pode-se citar: exames de diagnósticos, degradação de tumores, na terapia médica, empregados para solda e modelagem de peças, desbaste de superfícies de sólidos (metais e cristais, entre outros) e solda, homogeneização de materiais, fabricação de sonares, detetores de cardumes de peixe, máquinas para localização de fissuras em peças metálicas, equipamentos de solda em termoplásticos e metais, atomização de líquidos, limpeza por cavitação, ruptura de células biológicas, separadores de células , na homogeneização de misturas complexas e outras infinitas aplicações. Essas ondas propagam-se em meios materiais em fases consecutivas de rarefação e compressão.

A produção de ultra-som só foi possível devido à descoberta do efeito piezoelétrico nos cristais, os quais foram descobertos em 1880 pelos irmãos Curie (LORIMER e MASON, 1987).

As ondas ultra-sônicas são geradas por transdutores (qualquer dispositivo que converte um tipo de energia em outro tipo de energia) ultra-sônicos, também chamados simplesmente de transdutores. O exemplo clássico de transdutor é o alto falante que converte energia eletromagnética em som (onda mecânica).

Os efeitos das ondas ultra-sônicas em sistemas químicos e biológicos somente foi possível nas diferentes áreas do conhecimento a partir do desenvolvimento de transdutores piezoelétricos,

permitindo a sua utilização na área de ciências exatas, médicas, biológicas, além das aplicações industriais. (BARBOZA e SERRA,1992).

O transdutor piezoelétrico é o componente responsável em transformar a energia elétrica, mediante vibração, em energia mecânica e vice-versa. O transdutor tem como componente principal de sua montagem, a cerâmica piezoelétrica, que é um produto que apresenta variações em suas dimensões quando se aplica a ele um campo elétrico. Alguns materiais cristalizados como o quartzo, ao serem submetidos à diferença de potencial elétrico em suas faces, apresentam deformação que acaba por produzir uma perturbação, que propaga-se como onda sonora, este fato é conhecido como efeito piezoelétrico (RICHARDS e LOOMIS, 1927).

O cristal, para ser usado como transdutor, deve ser cortado de forma que um campo elétrico alternado, quando nele aplicado, produza variações em sua espessura. Dessa variação resulta determinado movimento nas faces do cristal, originando as ondas sonoras. Cada transdutor possui frequência de ressonância natural, tal que quanto menor a espessura do cristal, maior será a sua frequência de vibração.

O mesmo transdutor que emite o sinal ultra-sônico pode funcionar como detector, pois os ecos que voltam a ele produzem vibração no cristal, fazendo variar suas dimensões físicas que, por sua vez, acarretam o aparecimento de um campo elétrico. Esse campo gera sinais que podem ser amplificados e mostrados em osciloscópio ou registrador. Assim, tem-se neste caso de fonte ou detector em movimento, o chamado Efeito Doppler.

Segundo BARBOZA e SERRA, (1992) existem basicamente dois tipos de aparelhos geradores de ultra-som, para uso em irradiação de suspensões, o “Banho” utilizado para limpeza de material e a “Sonda” utilizada em laboratórios de biologia para rompimento de células. Nestes a fonte de energia ultra-sonora é a cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma as ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas ampliam estes sinais e o transdutor transmite os impulsos ultra-sonoros ao meio reacional.

Efeitos de interesse biológico:

- Efeito térmico: a energia intrínseca das ondas sonoras gera calor ao atravessar o tecido.

- Efeito mecânico-vibratório: é empregado para deslocar, distorcer e/ou reorientar partículas intercelulares, ou mesmo células com relação às suas configurações normais.
- Efeito químico: pela liberação de substâncias ionizantes, pode ocorrer que os gases dissolvidos ou capturados se juntem para formar bolhas. O colapso das bolhas libera energia que pode romper as ligações moleculares, aparecendo radicais livres H^+ e OH^- , causando alterações químicas.
- Efeito reflexivo: característica de atingir o objeto e retornar (como no ecograma).
- Fenômeno da cavitação: é produzido por alternância de ondas de pressões altas e baixas, geradas por ultra-som, têm formação rápida e causa colapso de milhões de bolhas minúsculas (ou cavidades) dentro de líquidos. Geralmente acompanhada de emissão de luz. Durante a fase de baixa pressão, as bolhas crescem (tamanho microscópico), até atingir fase de pressão alta, onde são comprimidas e implodem (colapsam). Estas cavidades acontecem no interior do líquido. Quando encontram-se associadas a ultra-som potente, são usadas para explicar a melhora da performance em sistemas sonoquímicos não biológicos.
- Efeito de sonoforese: usado para aumentar a absorção cutânea de fármacos aplicados topicamente.

A aplicação do ultra-som na indústria de alimentos pode ser dividida em duas categorias, de alta e baixa intensidade (McCLEMENTS,1995). O ultra-som de alta intensidade (energia) tem como características, baixa frequência com poder ultra-sônico em quilohertz (KHz) e escala de intensidade maior que $1W.cm^{-2}$, enquanto que o de baixa intensidade (energia) tem alta frequência com poder ultra-sônico na faixa de megahertz (MHz), com intensidade menor que $1W.cm^{-2}$ (McCLEMENTS,1995; MASON et al., 1996 ; McCLEMENTS,1997; KNORR et al., 2004).

O ultra-som de alta intensidade ($>1W/cm^{-2}$) é usado para alterar física ou quimicamente as propriedades dos alimentos, por exemplo: geração de emulsões; ruptura de células; promover reações químicas; inativar enzimas; amaciamento de carnes; modificação dos processos de cristalização e promoções de reações de oxidação. O de baixa intensidade é uma técnica não

destrutiva e não invasiva que supre as informações sobre as propriedades físico-químicas como: composição, estrutura, estado físico e taxa de fluxo (McCLEMENTS, 1995).

BERLINER (1999), refere-se à algumas das mais importantes aplicações do ultra-som:

- Sonoquímica: Produção de novas substâncias até agora impossíveis de obtenção por meios clássicos, como calor, eletricidade, luz e catálise;
- Aceleração de reações: A cavitação acelera reações químicas e físicas como as de surfactantes e detergentes, motivo, pelo qual o ultra-som é utilizado para limpeza de materiais, principalmente em laboratórios;
- Produção de partículas finas: Melhora a análise de distribuição de partículas, melhora as pastas de cerâmica, utilizadas para isolamento de capacitores eletrônicos e porcelanas; tornam mais resistentes ao desgaste as ferramentas sintetizadas de cerâmica;
- Homogeneização: Torna as misturas e suspensões mais uniformes para biotecnologia e processamento de polpa de papel;
- Emulsificação: Processamento de alimentos, remédios e cosméticos;
- Dissolução: Dissolve sólidos em solventes; acelera o controle de qualidade de remédios, sabores e fragrâncias, ruptura de bolhas em processos fermentativos;
- Desgaseificação: Remove gases de soluções sem aplicação de vácuo ou calor; controle de qualidade em vinhos e bebidas carbonatadas;
- Limpeza de superfícies e materiais porosos: Limpa a superfície de óxidos e outros filmes, emulsifica camadas de óleos, suspensões de particulados, melhora a ação de detergentes e remove gorduras sem aplicação de solventes à base de hidrocarbonetos.

- Aumento da permeabilidade: também conhecido como sonoforese ou fonoforese, onde ultra-som aumenta a eficácia de penetração de drogas através da pele. Usado em práticas fisioterapêuticas.

O ultra-som ainda pode ser utilizado em duas fases, de pulso (intermitente) e contínuo. O pulso é mais largamente aplicado, por sua facilidade de operação. As medições são rápidas e não invasivas, podendo ainda ser automatizado sem grandes dificuldades. O contínuo é usado quando medidas, altamente precisas são necessárias, e tende a ser encontrado em laboratórios de investigação (McCLEMENTS, 1997).

Pesquisas investigando o ultra-som, influenciando alguns parâmetros físicos como amplitude de onda, pressão estática externa, temperatura e viscosidade do meio têm indicado que o poder transferido pelo ultra-som ao meio é dependente de inúmeras variáveis. Estas pesquisas e estudos combinados de quantificação destas influências e suas conseqüências individuais permitiram demonstrar que o ultra-som constitui-se de equipamento útil na otimização e reprodução de resultados na preservação de alimentos, inativando microrganismos e enzimas, assim como na área de sonoquímica, (RASO et al,1999).

SINISTERRA (1992) em sua pesquisa destaca alguns fatores físicos do ultra-som nos processos biológicos e biotecnológicos, tais como: temperatura, cavitação e transferência de massa.

Temperatura: Devido as estreitas faixas de temperatura nas quais as reações bioquímicas acontecem, o seu aumento mediante aplicação do ultra-som não pode ser o principal efeito em biotecnologia, mas forma parte dele. Em biotecnologia, os processos são geralmente conduzidos em condições isotérmicas.

Transferência de Massa: O ultra-som em baixas intensidades nos sistemas biológicos promove o movimento do meio líquido favorecendo a transferência de massa. Existem três diferentes zonas em que este processo ocorre: camadas limítrofes, parede ou membrana celular e citosol.

Cavitação: O termo cavitação é utilizado para descrever a formação de cavidades ou bolhas no meio líquido, contendo quantidades variáveis de gás ou vapor. Quando a cavitação acontece nas

células e macromoléculas em suspensão aquosa, sua estrutura e funcionalidade podem ser alteradas, (OKUNO et al.,1986).

O fenômeno da cavitação envolve três estágios:

- Formação de núcleos de cavitação próximos às superfícies das partículas suspensas no líquido.
- Crescimento das microbolhas.
- Violenta implosão (KORNFELD e SUVOROV, 1944). A presença de gás dissolvido (que preencheram as bolhas) de partículas em suspensão (que diminuem a força de coesão molecular) são importantes para que aconteça a cavitação.

O ultra-som é reconhecido há muitos anos e tem grande potencial em ampla variedade de processos químicos industriais. Alguns desses processos são conhecidos a longo tempo e continuam prosperando, principalmente em aplicações comerciais. Outros mecanismos do ultra-som mostram grande potencial e ainda não foram amplamente explorados. Na verdade, existem muitos sistemas de ultra-som disponíveis e utilizados em processos, mas poucos são otimizados. Existem grupos de pesquisa multidisciplinares consolidados e envolvidos em projetos sonoquímicos, e no desenvolvimento de programas internacionais da sua aplicação na pesquisa e tecnologia (MASON, 2000).

3.1.1 Utilização de ultra-som em microrganismos

BUCALON e PALMA (1989), encontraram que células de *Saccharomyces cerevisiae* irradiadas a 20 KHz ($2,5 \text{ W.cm}^{-2}$) e depois cultivadas, apresentaram diminuição do volume celular (35%). Os pesquisadores verificaram que a irradiação induz lento desenvolvimento, embora não altere a sua reprodução. Isto sugere que os receptores para o crescimento celular foram afetados pela irradiação. Os mesmos autores no ano de 1987 descreveram que após sonicação de células de *Saccharomyces cerevisiae* a 20 KHz (10 W.cm^{-2}) estas apresentaram rompimento. Este rompimento e degradação foram mostrados cineticamente. Os autores encontraram dois grupos de células com diferentes graus de susceptibilidade à desintegração. Um grupo correspondia a células muito

resistentes a ruptura sônica (32 a 42% das células totais) e outro grupo mais susceptível a ruptura (58 a 68%). Por meio de análises químicas descobriram que o citosol influencia na susceptibilidade da parede celular, e que a manose é liberada, a partir da manoproteína, ao meio durante a sonicação. Os autores em 1989 descreveram modificações ao nível de membrana citoplasmática ativando as enzimas responsáveis pelo transporte ao serem irradiadas pelo ultra-som.

SINISTERRA (1992), mostrou que o ultra-som à alta intensidade pode romper células ou desnaturar enzimas, mas a baixa intensidade pode modificar o metabolismo celular ou aumentar a transferência de reagentes ou produtos (transferência de carga) através da parede ou membrana celular. Segundo o autor a utilização das radiações mais suaves tem maior interesse considerando-se as alterações provocadas em processos biotecnológicos.

S. cerevisiae possui parede celular espessa e membrana as quais desempenham pela constituição das enzimas, papel importante na transformação dos substratos e dos seus mecanismos de defesa. A irradiação de suspensões celulares de *S. cerevisiae* de 18 KHz por ultra-som causou ativação nas atividades enzimáticas, provocando efeito imediato. Provavelmente a irradiação promoveu a formação de “poros” na membrana, estimulando as atividades depois de irradiadas, embora o efeito desaparecesse após de 36 horas. A ativação pode ser resultado da ionização das enzimas e/ou mudanças conformacionais causadas pela sonicação, a recuperação das atividades originais sugerem que os efeitos são apenas superficiais e não afetam os componentes do citoplasma (PALMA e BUCALON, 1989).

TOMASIN (2001), estudou a bioresistência a ação de radiação ultra-sônica não ionizante de baixa intensidade e média potência em suspensões celulares. A autora verificou que *Saccharomyces cerevisiae* ao ser submetida aos tratamentos de ultra-som de 20 KHz teve sua viabilidade diminuída em 86% após 20 minutos de irradiação.

Estudos mostram que, para que ocorra liberação de produtos intracelulares tais como enzimas em leveduras, é necessário o uso de métodos capazes de promover poros ou romper a membrana celular sem causar inativação da enzima. O método mais conveniente e efetivo para preparação do extrato celular envolve trituração com esferas de vidro. A ação de rompimento das esferas de vidro durante agitação causa ruptura da célula. A espessura e rigidez da parede celular das leveduras fazem dos métodos como o ultra-som, lise osmótica e homogeneização, eficazes no rompimento de células de leveduras (BECKER et al., 1996).

O uso do ultra-som visando a ruptura de células e conseqüentemente sua letalidade tem sido relatada em diversos trabalhos. Porém, a resistência ao tratamento ultra-sônico varia amplamente entre as diferentes espécies (ALLIGER, 1975). GUERRERO et al. (2001) avaliaram o efeito combinado do ultra-som com pH, temperatura e amplitude na viabilidade celular de *S. cerevisiae*, e observaram diferentes alterações morfológicas como resultado das combinações de tratamento testadas. Os resultados obtidos por CICCOLINI et al. (1997) com relação à aplicação de ondas com potência de 50W, 100W e 180W em *S. cerevisiae* a temperatura de 45°C mostraram que o ultra-som não desativou as células da levedura, apenas modificaram a estrutura celular afetando assim, sua permeabilidade.

NICKERSON (1963), cita quebra mecânica por colisão ou impacto, quebra por ultra-som (20-30 Hz) e exposição à ação enzimática. Em qualquer dos casos, o material celular deve ser separado do meio para as análises subseqüentes. O autor salienta que as células da levedura *S. cerevisiae* são muito resistentes para serem quebradas por ultra-som. O tempo gasto para a quebra da levedura é muitas vezes maior do que para células de bactérias ou de outros gêneros de levedura.

Atualmente o ultra-som vem sendo estudado com ênfase, principalmente quanto a economia e eficiência em processos biotecnológicos, pois a aplicação de técnicas relacionadas ao ultra-som tem causado aumento significativo da produtividade metabólica de certos microorganismos, plantas e células animais (CHISTI, 2003).

As células podem diferir significativamente em sua sensibilidade ao ultra-som, como:

- O ultra-som contínuo e de pulsos (intermitente) com 200 KHz e 17,2 KW/m² de potência lesionou células de *Lactobacillus sp* causando extravazamento de beta-galactosidase intracelular (SAKAKIBARA, 1994; WANG, 1996).
- Sonicação em pulsos, afetou a produção de etanol por *S. cerevisiae*, pois o rendimento foi mais que o dobro com 300 W.m⁻³ e 25 KHz. Porém este efeito não ocorreu em culturas sonorizadas de forma contínua. O crescimento celular e a produção de etanol também continuaram quando sonicados com potência mais elevada (12 KW/m⁻³), quando comparado ao controle não sonificado (SCHLÄFER et al., 2000).

- O ultra-som contínuo de baixa potência (300W/m^2 , 43 KHz) diminuiu o tempo de fermentação em 50 a 64% durante a produção de vinho, cerveja e saquê, com o emprego de várias cepas de *S. cerevisiae*. O ultra-som aumentou o crescimento das leveduras e diminuiu a concentração do CO_2 dissolvido que atua como inibidor do desenvolvimento celular (MATSUURA, 1994).

3.2 Leveduras

Leveduras são fungos, predominantemente unicelulares, são eucarióticos e freqüentemente se reproduzem assexuadamente por brotamento ou fissão. Podem também apresentar reprodução sexuada acoplada com assexuada.

Nesse processo de reprodução a célula-mãe apresenta pequena saliência na parede celular que aumenta gradualmente quando entra em etapa de multiplicação. Os citoplasmas da célula-mãe e célula-filha permanecem unidos por algum tempo até que a abertura de passagem do material intracelular entre elas se fecha, e a partir desse momento existem duas células fisiologicamente distintas, que na maioria das vezes se separam em seguida.

PELCZAR et al.(1996) relatam que a forma e a estrutura das leveduras variam dependendo da espécie. A parede celular das leveduras é espessa. Os principais constituintes da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae* são dois polissacarídeos, a glicana composto de unidades D-glicose que corresponde a cerca de 30-34% da parede e a manana (30%), constituído por unidades de D-manose. A glicana está presente em todos os gêneros e a manana está ausente em alguns gêneros das leveduras.

Estes microrganismos estão amplamente disseminados na natureza como saprófitas, vivem sobre frutos, meios açucarados, dentro do tubo digestivo de animais e de insetos, outros são encontrados no solo e algumas poucas espécies são parasitas. Em meio de cultura apropriado, suas colônias variam em tamanho, textura, cor, brilho e bordos, e de modo geral, formam colônias cremosas branco-amareladas.

As leveduras estão intimamente associadas à evolução da humanidade, quando comparadas aos outros grupos de microrganismos. Elas são os microrganismos de maior interesse e utilização na

indústria para produção de biomassa, vitaminas, enzimas, produtos como pão, bebidas alcoólicas e álcool carburante. Portanto, são utilizadas na produção de álcool pelas indústrias sucroalcooleiras. A levedura mais estudada, devido a sua importância em estudos científicos e aplicações industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*.

No Brasil, as leveduras revolucionaram o sistema energético, pois, mediante sua capacidade de bioconversão produzem etanol a partir de sacarose e monossacarídeos, alternativa esta para propiciar a economia do petróleo. *S. cerevisiae* é unicelular, heterotrófica, e depende de carbono orgânico para seu desenvolvimento. Além disso, assume elevada preferência por carboidratos, tem capacidade de hidrolisar sacarose e fermentar e/ou assimilar especialmente monossacarídeos. Quanto ao ambiente, as leveduras resistem satisfatoriamente a grandes variações de pH, devido às células apresentarem grande resistência osmótica; ao contrário das bactérias são sensíveis à temperaturas acima de 45°C. São utilizadas na produção de biomassa, enzimas e são fermentadoras produtoras de etanol (ANGELIS et al., 1987).

VITOLO e MINAMI (1989) apresentaram os seguintes fatores abióticos que interferem no desenvolvimento da levedura.

- Temperatura: Sendo a mínima compreendida entre 0-5°C, a máxima entre 46-47°C e a ótima entre 28-32°C. A resistência térmica da levedura varia com o meio, a espécie, o estado fisiológico e seu estado vegetativo ou esporulado. Segundo LOZANO-HERNANDEZ (1995), a temperatura é fator físico que atua diretamente sobre o processo fermentativo. As leveduras por serem mesófilas, a altas temperaturas, sua viabilidade decresce podendo ocorrer problemas de reprodução, autólise e diminuição da capacidade de produção de etanol. Altas temperaturas propiciam condições de proliferação de contaminantes bacterianos.
- Radiação ultravioleta: Quando esta luz age sobre esporos em suspensão pode inativá-los após 30 minutos de aplicação, dependendo da intensidade da radiação.
- Luz solar: Pode produzir efeitos diferentes, a diferentes intensidades, dependendo da espécie, algumas são inativadas ou inibidas, outras não são alteradas e em outros casos a esporulação é estimulada.

- Oxigênio: A grande maioria das leveduras são facultativas.
- Dessecação: Suportam teor de umidade de 14-17% e podem morrer quando o teor de umidade é de 2 a 5%.
- Metais pesados: São sensíveis à ação de vários metais principalmente cádmio, cobre, prata, magnésio e paládio. DOMINGOS (1998) observou que diferentes níveis de cádmio no mosto de fermentação (0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg de Cd /Kg de mosto) foram acumulados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- pH: O pH ótimo de desenvolvimento está ao redor de 5,5 sendo o mínimo de 2,5 e o máximo de 8,0.

3.3. Fermentação

O etanol pode ser obtido basicamente por dois processos: sintético e fermentativo.

Por via sintética obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha. Nos países em que há grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada, trata-se de forma econômica de produzir álcool.

A via fermentativa é a maneira mais importante para obtenção do álcool etílico no Brasil. Mesmo que venha a haver disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool de síntese, a via fermentativa ainda será de grande importância para a produção de álcool para produção de bebidas para consumo humano.

O principal fator que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção no Brasil ou em outros países, é o grande número de matérias-primas naturais existentes.

Na obtenção do álcool por via fermentativa partindo de açúcar, distinguem-se três fases: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação (LIMA et al, 2001).

A habilidade de transformar o açúcar em etanol é atributo biológico das leveduras e de algumas bactérias como a *Zymomonas mobilis*. A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de obter energia química necessária para sua sobrevivência.

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂, envolve reações em seqüência ordenada (Figura 1), cada qual catalisada por enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular sendo portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras.

Saccharomyces cerevisiae é fungo facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto parte do açúcar é transformado em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, o restante é convertido em etanol e CO₂ em anaerobiose, processo denominado de fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA, et al, 2001).

A levedura realiza o metabolismo fermentativo assimilando o carboidrato na forma de monossacarídeo, este durante seu desdobramento produz energia que a célula requer para suas diferentes funções celulares. Do desdobramento dos açúcares, resultam também outros subprodutos que são excretados. Dentre estes, encontram-se o álcool e o dióxido de carbono, além de produtos em pequenas quantidades, como ácidos graxos e seus respectivos ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois superiores e ácidos orgânicos.

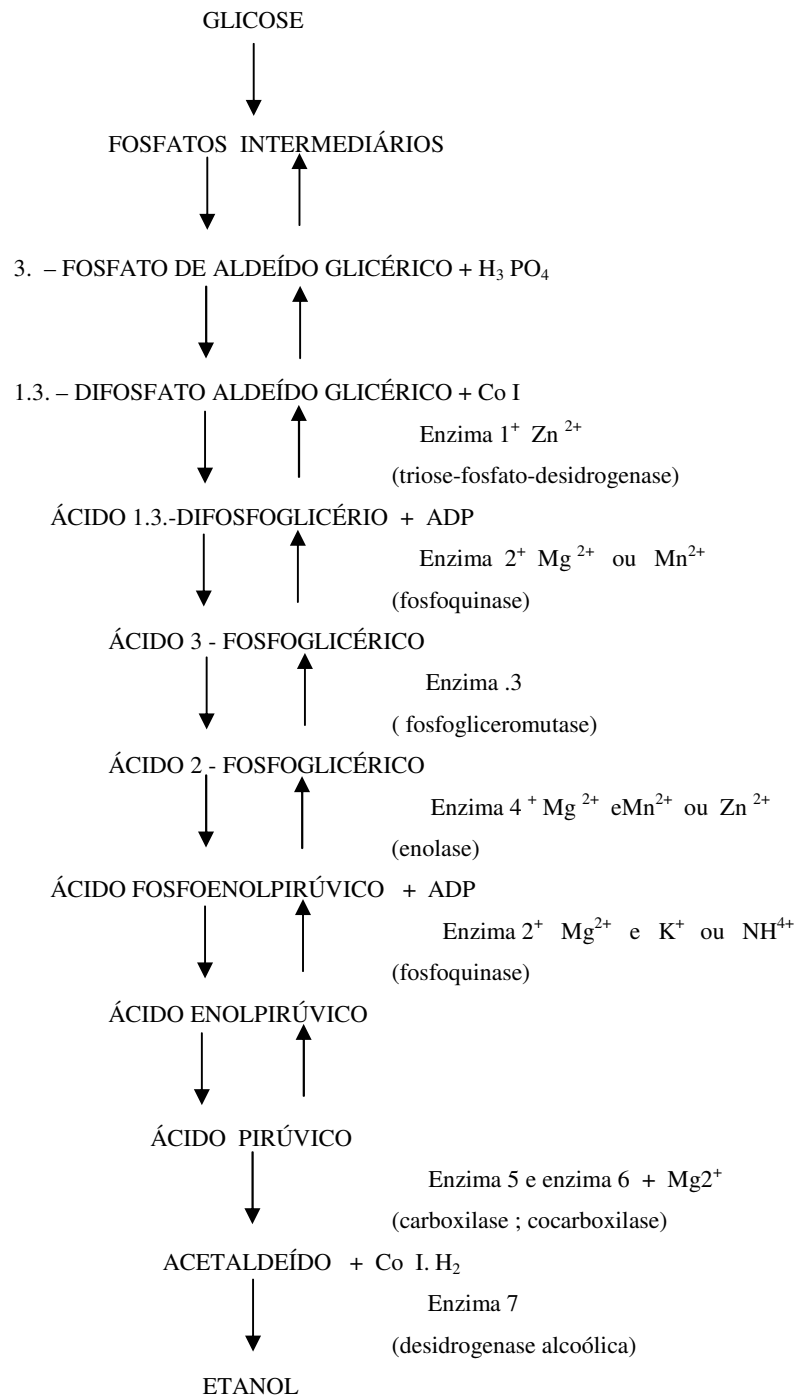


Figura 1: Esquema de reações enzimáticas efetuada pela fermentação alcoólica, conduzida por *Saccharomyces* (LIMA, et al, 2001).

O processo fermentativo realizado nas indústrias produtoras de álcool é um processo não asséptico. No Brasil usa-se os produtos derivados de cana-de-açúcar: caldo de cana, melaço ou mel final.

O microrganismo empregado normalmente é a *Saccharomyces cerevisiae* com linhagens selecionadas dentre as quais “Pedra II”, “Mauri”, entre outras.

A fermentação é feita a partir do mosto (melaço diluído pronto para fermentação) e divide-se em 3 etapas: pré-fermentação, fermentação principal e pós-fermentação.

A pré-fermentação inicia-se quando o fermento é adicionado ao mosto devidamente preparado, e caracteriza-se por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. A fermentação principal inicia-se após 5 a 6 horas, com pouca espuma. Esta etapa é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, diminuição da densidade do mosto que transforma-se em vinho por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando a espuma desaparece, isto ocorre em um tempo de 9 a 10 horas.

A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, bem como do desprendimento do gás carbônico e não ocorre mais formação de espuma. A partir desta fase, que deve durar o menor tempo possível o vinho pode ser centrifugado e a seguir a levedura é recuperada para a nova fermentação e o vinho é destilado (ANTONINI, 2004).

Durante a fermentação etanólica na produção de álcool combustível, surgem diferentes tipos de problemas, dentre os quais a floculação do fermento, a diminuição da sua viabilidade celular que podem estar associados com problemas de contaminantes bacterianos e de leveduras estranhas ao processo denominadas, leveduras selvagens.

3.3.1 Sistemas de Fermentação

Os sistemas de fermentação podem ser divididos em descontínuos e contínuos. Os processos contínuos são conhecidos desde 1940, embora sua aplicação mais intensiva aconteceu nas últimas décadas.

Nos processos descontínuos distinguem-se quatro tipos de fermentação industrial, que se denominam sistemas de bateladas ou de cortes, com sistema das leveduras no “pé de cuba”, sistema com culturas puras e sistemas de recuperação de leveduras (reciclagem ou reciclo de células) mediante centrifugação. Este último de maior interesse para o referido trabalho, reduz muito tempo de fermentação, porque diminui-se substancialmente a fase inicial (início da fermentação).

A fermentação contínua, processa-se, alimentando o sistema de forma contínua de meio em uma determinada concentração, retirando-se dela, também de forma contínua, o vinho que aí então é enviado para destilação (LIMA et al, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 - Material

Os experimentos foram realizados no Laboratório III do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Campus de Rio Claro e as análises de etanol por densimetria no Centro de Ciências Agrárias da UFSCAR Campus de Araras.

4.1.1 - Microrganismo

Para execução dos experimentos utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento fresco da marca comercial Fleischmann®.

4.1.2 - Meio de Cultivo

4.1.2.1 Mel de fabricação de açúcar

Caldo de cana-de-açúcar concentrado a 60° Brix.

4.1.2.2. Meio de cultura para *S. cerevisiae*

Mel de fabricação de açúcar.....	10° Brix
Peptona	0,5 %
Extrato de Levedura	0,5 %
Água Destilada	q.s.p.

4.1.3 - Soluções e Reagentes

4.1.3.1 – Solução de H_2SO_4 – 0,1 N

4.1.3.2 – Solução de NaOH – 0,05N

4.1.3.3 – Solução de fenolftaleína

4.1.3.4 – Solução de eritrosina (SHARF,1974).

4.1.3.5– Reagente de ácido 3,5 dinitrosalicílico (ADNS), segundo LEITE DE OLIVEIRA (1987).

4.1.4 - Vidraria e Equipamentos

- Autoclave vertical – Fabbe modelo 103
- Balança semi-analítica – Marte AS 2000
- Densímetro PAAR – modelo DMA45
- Ebuliômetro -“ Leonardo” modelo 3300
- Equipamento Gerador de Ultra-som – Marca Unique®
- Espectrofotômetro – BEL SP 1105
- Estufa incubadora - Fanem 002 CB
- Medidor de pH (desvio +/- 0,02) – Marconi PA 200
- Microdestilador Tecnal – modelo TE-012
- Microscópio – Carl Zeiss
- Refratômetro - Tokko 0 – 32%
- Vidraria convencional de uso de laboratório de microbiologia

4.2 - Métodos

4.2.1 – Método de preparo do meio de cultura

Ao mel da fabricação de açúcar adicionou-se água destilada até diluição a 10° Brix, acrescido de peptona (0,5%) e extrato de levedura (0,5%).

Ajustou-se o pH do meio de cultura para $4,5 \pm 0,2$ com ácido sulfúrico 0,1N e posteriormente foi esterilizado em autoclave a 121°C por 10 minutos.

4.2.2 - Preparo de inóculo

De maneira asséptica, pesou-se 12g da levedura *S. cerevisiae*, acondicionou-se em frasco esterilizado de 1000 mL contendo meio de cultura também esterilizado. Homogeneizou-se e manteve-se em estufa incubadora à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 minutos, para a adaptação do microrganismo e ativação do brotamento.

Após o período de adaptação transferiu-se o conteúdo do erlenmeyer com o pré-inóculo para béquer de maior capacidade, onde diluiu-se até concentração previamente estabelecida ($\times 10^8$) de células de *S. cerevisiae*. O material foi homogeneizado e distribuído em porções de 500 mL.

4.2.3 Aplicação de Ultra-Som (US)

Foram preparados para aplicação de ultra-som (US) quatro experimentos.



Escala : 1 x 10,76 cm

Figura 2. Equipamento Gerador de Ultra-som – Marca Unique®

4.2.3.1 Experimento I

Este experimento foi elaborado em quintuplicata, com frascos de 500 mL do mosto preparado como em 4.2.2. Foram elaboradas cinco repetições de cada tratamento, com fermentação de 9 horas cada, à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os tratamentos aplicados aos dois experimentos estão relacionados a seguir.

- Tratamento controle (sem US)
- Tratamento com ultra-som (com US)

No tratamento controle e no tratamento com US, os frascos continham 500 mL de meio já com inóculo preparado conforme item 4.2.2.

A irradiação com ultra-som (US) ocorreu no tempo 0 hora de fermentação, conforme tabela 2, com potência de 80 W, frequência de 19 KHz com duração de 30 segundos.

Das amostras coletadas analisou-se: pH, acidez sulfúrica, viabilidade celular, número de células do inóculo e produção de etanol g/100 mL, e calculou-se os rendimentos fermentativos (prático, teórico, real e real do teórico), conforme tabela 1.

Tabela 1: Protocolo de acompanhamento de análises no processo fermentativo do Experimento I							
	ANÁLISES EFETUADAS						
TEMPO (h)	pH	° Brix	Acidez	% Álcool	ART	% Viabilidade	Nº Células
T ₀	+	+	+	+	+	+	+
T ₃	+	+		+			
T ₆	+	+		+			
T ₉	+	+	+	+	+	+	+

Legenda : + análises efetuadas

4.2.3.2 Experimento II

O experimento II foi elaborado em triplicata, com frascos de 500 mL do inóculo, com cinco repetições de cada tratamento, com fermentação de 4 horas e meia cada à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os tratamentos aplicados aos dois experimentos estão relacionados a seguir.

- Tratamento controle (sem US)
- Tratamento com ultra-som (com US)

No tratamento controle e no tratamento com US, os frascos continham 500 mL de meio com inóculo preparado conforme item 4.2.2.

A irradiação com ultra-som (US) ocorreu no tempo 0 hora de fermentação, conforme tabela 2, com potência de 80 W, frequência de 19 KHz com duração de 30 segundos.

Das amostras coletadas analisou-se: produção de etanol em g/100 mL.

4.2.3.3 Experimento III

O experimento III foi elaborado em quintuplicata, com frascos de 500 mL do inóculo, com cinco repetições de cada tratamento com fermentação de 9 horas cada à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os tratamentos aplicados aos dois experimentos estão relacionados a seguir.

- Tratamento controle (sem US)
- Tratamento com ultra-som (com US)

No tratamento controle e no tratamento com US, os frascos continham 500 mL de meio com inóculo preparado conforme item 4.2.2.

A irradiação com ultra-som (US) ocorreu no tempo 0 e 3 horas de fermentação, com conforme tabela 2, potência de 80 W, frequência de 19 KHz com duração de 30 segundos.

Das amostras coletadas analisou-se: produção de etanol em g/100 mL.

4.2.3.4 Experimento IV

O experimento IV foi elaborado em quintuplicata, com 2 repetições, em frascos de 500 mL do inóculo, com fermentação de 9 horas cada à temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com 2 ciclos de células.

Para realização da parte experimental que envolve o item 4.2.3.4 acompanhou-se o protocolo experimental da figura 3.

As aplicações de radiação ultra-sônica foram em cada ciclo de 9 horas nos tempos 0; 3; 6 e 9 horas, conforme tabela 2, com amostragens antes e após a irradiação.

As mesmas células foram reaproveitadas na fermentação subsequente por mais dois ciclos com idênticas condições de aplicações e amostragem.

Todos os tratamentos onde houve irradiação de ultra-som (US), o mesmo foi aplicado com potência de 80 W e empregando-se sonda vibratória de frequência de 19 KHz com duração de 30 segundos.

Após a irradiação todas as amostras do tratamento com US, e do tratamento controle, foram incubadas à $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Das amostras coletadas analisou-se: produção de etanol em g/100 mL.

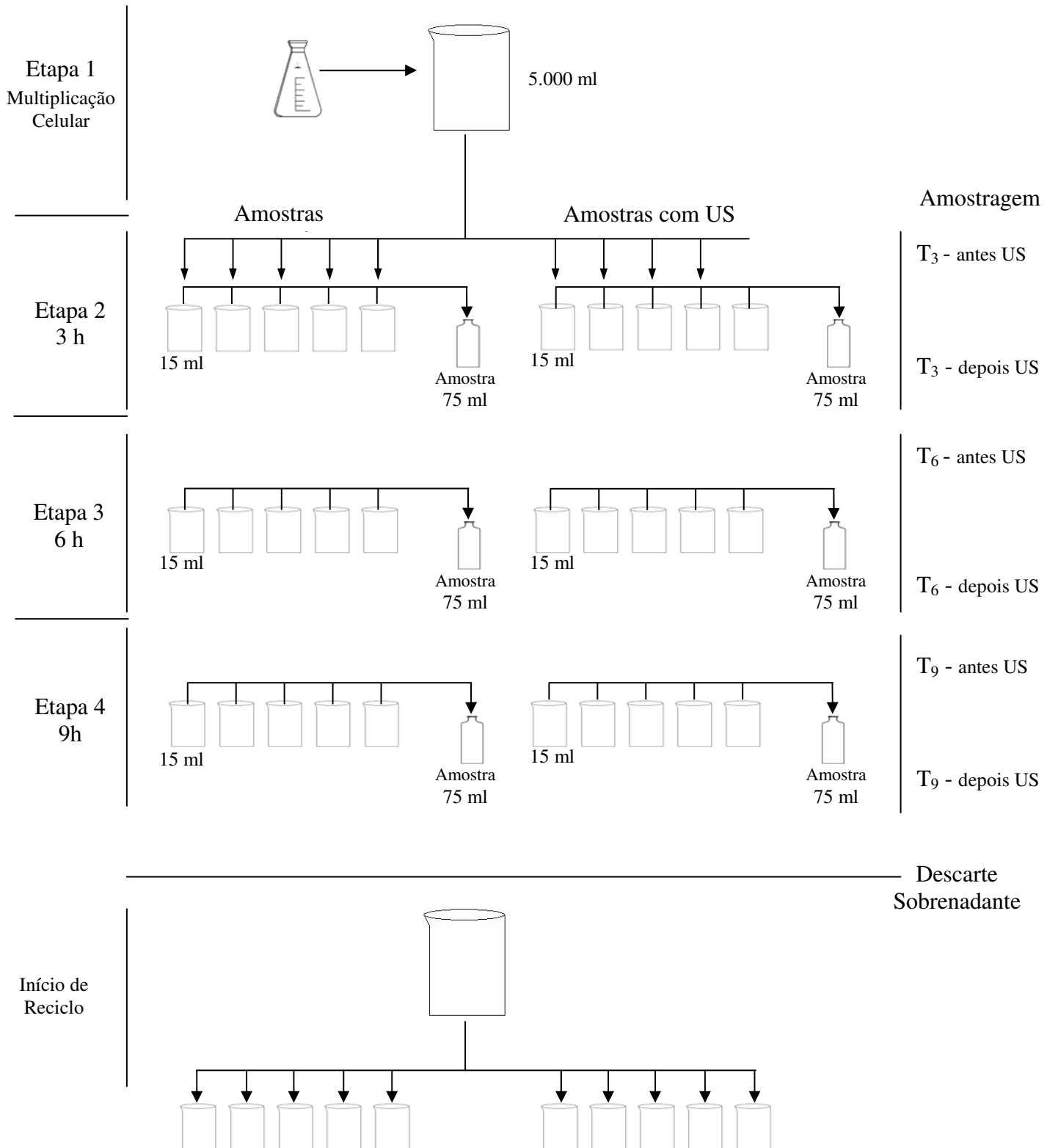


Figura 3. Esquema de procedimento do Experimento IV com 2 reciclos de células em processo de fermentação com ciclo de 9 horas cada.

4.2.4 Fermentação

Utilizou-se o processo de fermentação por batelada com amostras com tratamento de US e o controle.

Determinou-se previamente ao início do **experimento I** os tempos para amostragens. Estabeleceu-se que seriam coletadas alíquotas (100 mL) do referido material para amostra, com ciclo fermentativo de 9 horas, sendo as amostras coletadas a cada de 3 horas .

Para a realização do **experimento II** buscou-se avaliar a partir do experimento I, quais seriam os intervalos de tempo mais adequados para realização das coletas de amostras. A condição selecionada foi o parâmetro produção de etanol no intervalo de tempo no qual obteve-se melhor resposta em relação a sua produção que pudesse assim ser usado como referência.

No **experimento II**, estabeleceu-se que seriam também coletadas alíquotas (100 mL) do referido material para amostra, com ciclo fermentativo de 4,5 horas, sendo as amostras coletadas a cada de 1,5 horas .

No **experimento III**, estabeleceu-se que seriam também coletadas alíquotas (100 mL) do referido material para amostra, com ciclo fermentativo de 9 horas com tratamento com US sendo efetuado no tempo 0 hora de fermentação e após 3 horas de fermentação. As amostras foram coletadas nos tempos: 0, 3, 6 e 9 horas de fermentação.

O **experimento IV**, o qual teve-se como intenção principal, tentar simular fermentação com reciclo de células, como ocorre em processos industriais. Para tanto a alíquota do material coletado a cada amostragem foi de 15 mL de cada frasco totalizando para cada tratamento (controle e com US) 75 mL. A cada intervalo de tempo de 3 horas coletou-se amostra sem tratamento de US (controle), uma antes da aplicação e outra depois da aplicação de US durante ciclo de 9 horas de fermentação.

Após o término do ciclo de 9 horas, da coleta de amostras, descartou-se o sobrenadante, colocou-se meio “novo” e iniciou-se novo ciclo de 9 horas de fermentação, nas mesmas condições.

Tabela 2: Protocolo da programação de tempo de amostragem

Tempo de Amostragem (horas)	EXPERIMENTOS			
	I	II	III	IV
T ₀	+		+	
T _{1,5}		+		
Antes T ₃				+
T ₃	+	+	+	+
Depois T ₃				+
T _{4,5}		+		
Antes T ₆				+
T ₆	+		+	+
Depois T ₆				+
Antes T ₉				+
T ₉	+		+	+
Depois T ₉				+

4.2.5 Acompanhamento do Processo Fermentativo

O acompanhamento de análises durante o processo de fermentação no experimento I, foi efetuado de acordo com as seguintes análises: pH, acidez sulfúrica, viabilidade celular, número de células do inoculo, teor alcoólico g/100 mL, e determinou-se os rendimentos fermentativos (prático, teórico, real e real do teórico), tanto para amostras controle como para as tratadas com US.

Para os experimentos II, III e IV foram efetuadas somente análises para determinação de teor alcoólico g/100 ml.

A verificação de sólidos totais (decaimento de graus Brix) referenciado como açúcares totais, foi elaborada mediante medições, com auxílio de refratômetro.

- A acidez sulfúrica foi realizada conforme COPERSUCAR (1995).
- A qualidade microbiológica da cultura de levedura foi confirmada pela técnica de análise de viabilidade celular, mediante de Câmara de Neubauer, segundo a coloração de SHARF (1974) e a técnica de contagem pela técnica recomendada por SUSSMAN (1974).

Foram quantificadas quanto:

- viabilidade celular
- taxa de brotamento

- A quantificação da produção de etanol durante o processo fermentativo foi efetuada mediante técnica de ebulliometria e posteriormente foi confirmada por meio de densimetria.
- Os cálculos para determinação do rendimento da fermentação etanólica seguiram a orientação de STUPIELLO et al.(1983).

Cálculos do Rendimento

RP = Rendimento Prático (%)

$$RP = \frac{\text{g etanol} \times 100}{\text{ART inicial}}$$

RT = Rendimento Teórico (%)

$$RT = \frac{RP \times 100}{53,8 \text{ g sacarose}}$$

53,8 g sacarose – segundo equação de Gay Lussac.

RR = Rendimento Real (%)

$$RR = \frac{\text{g etanol} \times 100}{\text{ART r}}$$

onde ART r = ART residual (ART inicial – ART final)

RRT = Rendimento Real do Teórico (%)

$$RRT = \frac{RR \times 100}{53,8 \text{ g sacarose}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Resultados do experimento I

5.1.1 - Acompanhamento das medidas de pH

A tabela 3 e a figura 4 mostram os dados referentes a resultados de pH obtidos no experimento I realizado sem e com tratamento de US num ciclo total de 9 horas de fermentação.

Tabela 3: Resultados médios comparativos obtidos da variação do pH, nos tempos de 0 ; 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US

Tempo (h)	T ₀		T ₃		T ₆		T ₉	
Amostras	controle	US	controle	US	controle	US	controle	US
	4,48	4,46	4,49	4,50	4,46	4,44	4,41	4,36
	4,43	4,41	4,28	4,25	4,23	4,23	4,29	4,27
	4,46	4,46	4,54	4,52	4,44	4,45	4,44	4,43
	4,65	4,62	4,52	4,53	4,51	4,51	4,52	4,52
	4,52	4,52	4,51	4,51	4,52	4,47	4,47	4,48
Médias	4,51	4,49	4,47	4,46	4,43	4,42	4,43	4,41

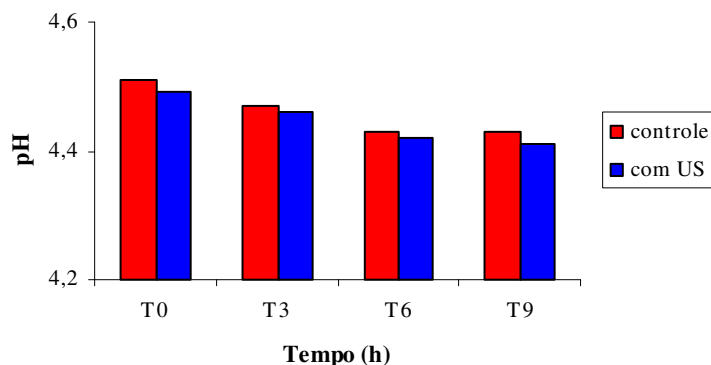


Figura 4: Médias das quantificações do pH do experimento I de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Embora tenha sido encontrada pequena diferença nos resultados obtidos de pH, conforme observado na tabela 3 e figura 4, o pH normal de fermentação em ciclo de 9 horas, sofreu decaimento que pode ser em função da produção de CO_2 e de ácidos orgânicos. Contudo, quando se observou as amostras com tratamento de US, pode-se notar que houve diminuição maior do pH em relação as amostras não tratadas com US. Este fato pode refletir em alguma alteração da membrana, como: a bomba de prótons ter sido afetada, a produção de CO_2 ter sido estimulada ou mesmo a excreção de ácidos orgânicos.

5.1.2 – Determinação da acidez sulfúrica g/L

A tabela 4 e figura 5 registram os dados referentes a resultados de acidez sulfúrica quantificada em g/L obtidos no experimento I realizado sem e com tratamento de US num ciclo de 9 horas de fermentação.

Tabela 4: Resultados médios comparativos obtidos da determinação de acidez sulfúrica g/L, nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US

Tempo (horas)	T ₀		T ₉	
Amostras	controle	US	controle	US
	3,01	3,06	2,42	2,81
	3,62	3,55	3,25	3,47
	3,42	3,64	3,19	3,35
	3,69	3,62	2,72	2,77
	3,43	3,50	3,01	3,60
Médias	3,43	3,47	2,92	3,20

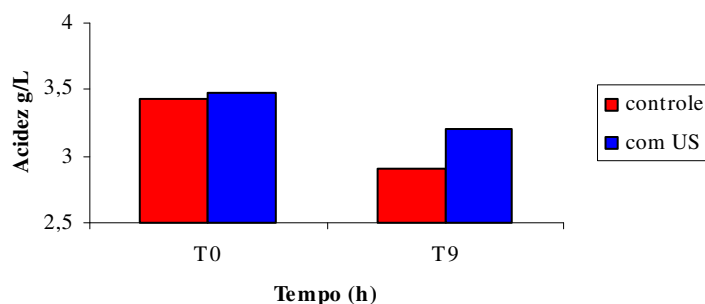


Figura 5: Médias das quantificações de acidez sulfúrica em g/L do experimento I de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A acidez quantificada em acidez sulfúrica g/L conforme demonstrado na tabela 4 e figura 5, mostrou que a acidez é maior quando aplicou-se o US no acompanhamento de 9 horas de fermentação.

Este fato reporta a análise anterior quando se relacionou a excreção de ácidos orgânicos e CO_2 . Quando aplicado US, verificou-se que tanto o pH quanto a acidez sulfúrica foram minimamente alterados e pode estar ligado aos fatores de excreção de CO_2 , e de ácidos orgânicos intracelulares.

5.1.3 - Acompanhamento da viabilidade celular de *S. cerevisiae*.

A tabela 5 e figura 6 indicam os dados referentes a resultados percentuais da viabilidade celular obtidos no experimento I realizado sem e com tratamento de US num ciclo total de 9 horas de fermentação.

Tabela 5: Resultados médios percentuais obtidos da variação da viabilidade celular, nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US

Tempo (horas)		T ₀		T ₉	
Amostras		controle	US	controle	US
Viabilidade %		98,30	98,60	97,90	99,00
		99,26	98,24	97,84	97,68
		96,80	97,94	97,00	96,18
		97,26	97,36	98,80	98,20
		97,20	98,60	97,54	97,00
Médias		97,76	98,15	97,82	97,61

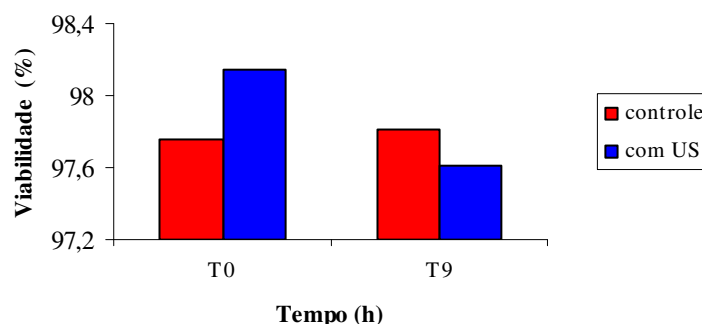


Figura 6: Médias das quantificações da viabilidade celular do experimento I de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Quanto a viabilidade celular da cultura irradiada a tabela 5 e a figura 6 mostram os percentuais obtidos na variação da viabilidade celular de 0 a 9 horas. A levedura empregada nos experimentos já apresentava residual de células mortas. A aplicação de US manteve a viabilidade acima de 97,6%, portanto as diferenças não são significativas.

Considerando-se que a fermentação ocorreu em etapa de baixa contaminação e a presença do US não afetou significativamente este parâmetro da *S. cerevisiae*, visto que a contaminação bacteriana induz a morte celular como relatam BAYROCK e INGLEDEW (2001), CHERUBIN (2003).

5.1.4 - Acompanhamento do número de células de *S. cerevisiae*.

A tabela 6 e figura 7 mostram os dados referentes a resultados do número de células ($\times 10^8$) de *S. cerevisiae* obtidos no experimento I realizado sem e com tratamento de US num ciclo total de 9 horas de fermentação.

Tabela 6: Média das contagens do número de células ($\times 10^8$) de *Saccharomyces cerevisiae*, avaliadas por contagem microscópica, nos tempos de 0 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US

Tempo (horas)	T ₀		T ₉	
Amostras	controle	US	controle	US
	2,06	1,86	2,68	4,10
	1,76	1,64	3,22	3,16
	2,04	2,48	3,12	2,85
	1,86	1,95	3,53	3,89
	2,00	2,40	3,20	2,70
Médias	1,94	2,07	3,15	3,34

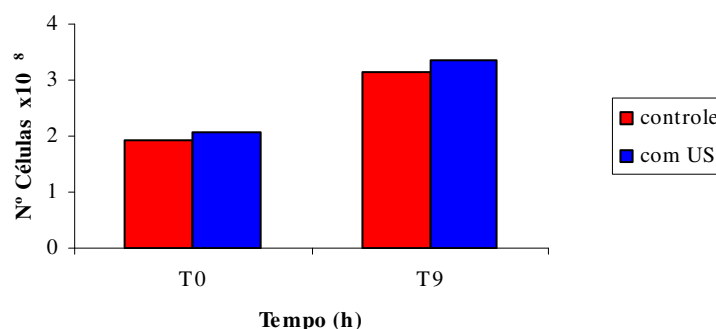


Figura 7: Médias das contagens microscópicas do número de células ($\times 10^8$) dos 5 ensaios do experimento I de *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhadas durante 9 horas de fermentação, sem e com tratamento de US, mantidas à $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

A variação do número de células em amostras conforme tabela 6 e figura 7, ocorre após irradiação com US. Esta variação pode ser comprovada em microscópio, mediante a contagem de células que revelam número acima daquele do controle. Isto provavelmente ocorre devido a melhor dispersão dessas células no meio. Essa diferença é maior e depende da aderência entre as células do material. OKI (2003) ao produzir cultivo de algas verificou que após irradiação ultra-sônica havia sempre maior número de células presentes.

Também SILVA (2006), trabalhando com *Aspergillus niger* verificou que a contagem do número de esporos quando o material era submetido a irradiação de US era superior a amostras provenientes de uma mesma suspensão que não eram irradiadas.

5.1.5 –Resultados da avaliação da fermentação de *S. cerevisiae*, sem e com tratamento de US com aplicação de 30 segundos após 9 horas de fermentação.

A tabela 7 mostra os dados referentes a resultados da produção em g/100 mL de etanol obtidos no experimento I realizado sem (controle) figura 8 e com tratamento de US figura 9, com aplicação de 30 segundos, num ciclo total de 9 horas de fermentação.

Tabela 7: Quantificação comparativa média da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem (controle) e com tratamento de US no tempo de 0 hora, com amostras mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, obtidos em 5 ensaios, sendo que cada valor inserido na tabela representa a média de 5 repetições

Repetições													
Tempo (h)	1		2		3		4		5		Média		
Amostras	controle	US	controle	US	controle	US	controle	US	controle	US	controle	US	
3	1,73	1,73	2,65	2,93	1,20	1,60	1,73	1,73	2,13	2,40	1,88	2,07	
6	3,08	3,20	3,08	3,20	3,48	2,93	3,48	2,93	3,08	3,08	3,24	3,06	
9	3,08	3,20	3,08	3,08	3,48	3,08	2,93	3,60	3,48	3,08	3,21	3,20	
Média	2,63	2,71	2,93	3,07	2,72	2,53	2,71	2,75	2,89	2,85			
Diferença (média – 3 h)	0,90	0,98	0,28	0,14	1,52	0,93	0,98	1,02	0,76	0,45			

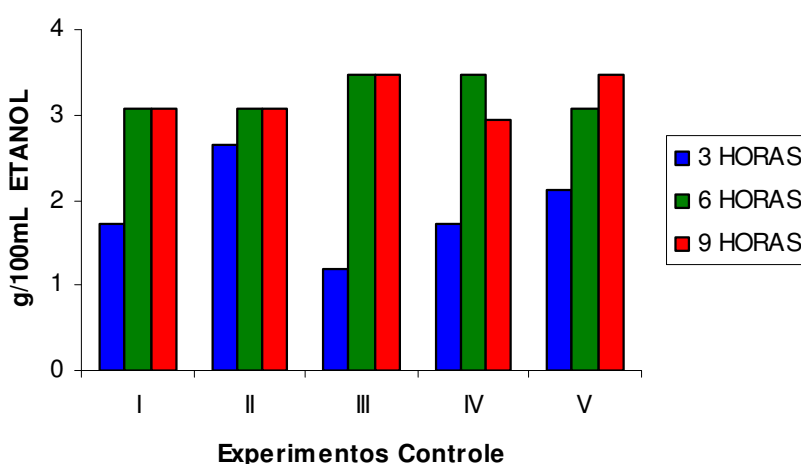


Figura 8: Quantificação média de 5 repetições em quintuplicatas da produção de etanol em g/100 mL nos tempos: 3 ; 6 e 9 horas de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, do controle.

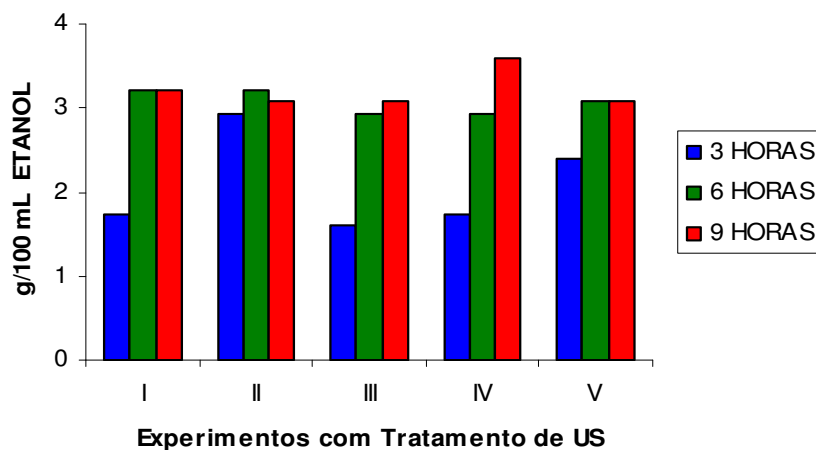


Figura 9: Quantificação média de 5 repetições em quintuplicatas da produção de etanol em g/100 mL nos tempos: 3 ; 6 e 9 horas de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, com tratamento de US.

Nas condições que foram realizados esses experimentos as diferenças manifestaram-se favoravelmente à aplicação do US nos experimentos I, II e IV dos cinco realizados, embora nessas condições o US não tenha produzido grandes diferenças, elas existem e foram também abordadas em outros trabalhos como demonstrou SCHLÄFER et al (2000) durante a produção de etanol com *S. cerevisiae* com aplicação de US com pulso intermitente e também com MATSUURA (1994) onde verificou aumento no crescimento de *S. cerevisiae* e diminuição na concentração de CO₂.

5.1.6 –Desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* durante 9 horas à 30°C ± 2°C, contendo 10° Brix com 7,5g ART inicial, sem e com tratamento de US no tempo zero hora.

Tabela 8: Quantificação média dos parâmetros da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* realizado em 5 repetições em quintuplicata sem tratamento de US

Repetição	Tempo (horas)	gEtanol/100mL	ART Residual	Rendimento %			
				Prático	Teórico	Real	Real do Teórico
1	3	1,73	0,4398	23,06	42,86	24,50	45,53
	6	3,08	0,4398	41,06	76,31	43,62	81,07
	9	3,08	0,4398	41,06	76,31	43,62	81,07
2	3	2,65	0,5269	35,33	65,66	38,00	70,63
	6	3,08	0,5269	41,06	76,31	44,16	82,08
	9	3,08	0,5269	41,06	76,31	44,16	82,08
3	3	1,20	0,5193	16,00	29,73	17,19	31,95
	6	3,48	0,5193	46,40	86,24	49,85	92,65
	9	3,48	0,5193	46,40	86,24	49,85	92,65
4	3	1,73	0,5376	23,06	42,86	24,84	46,17
	6	3,48	0,5376	46,40	86,24	49,98	92,89
	9	2,93	0,5376	39,06	72,60	42,08	78,21
5	3	2,13	0,4658	28,40	52,78	30,28	56,28
	6	3,08	0,4658	41,06	76,31	43,78	81,37
	9	3,48	0,4658	46,40	86,24	49,47	91,95

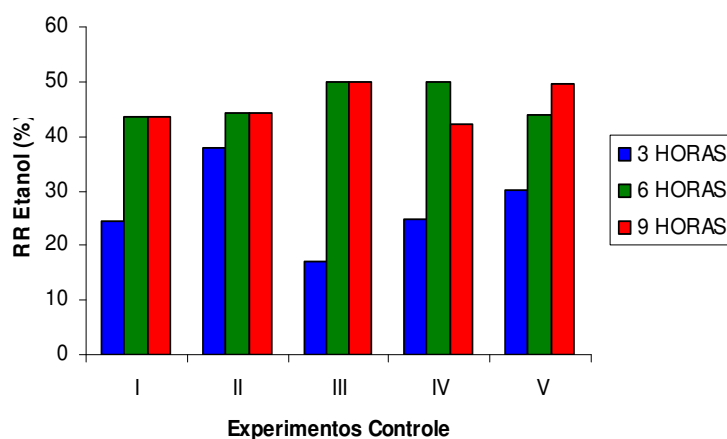


Figura 10: Resultados médios comparativos de 5 repetições em quintuplicatas do rendimento real (RR) em porcentagem, do processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*, sem tratamento de US no tempo de 0 hora de fermentação.

Tabela 9: Quantificação média dos parâmetros da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* realizado em 5 repetições em quintuplicata com tratamento de US

Repetição	Tempo (horas)	gEtanol/100mL	ART Residual	Rendimento %			
				Prático	Teórico	Real	Real do Teórico
1	3	1,73	0,4490	23,06	42,86	24,53	45,59
	6	3,20	0,4490	42,66	79,29	45,38	84,34
	9	3,20	0,4490	42,66	79,29	45,38	84,34
2	3	2,93	0,5208	39,06	72,60	41,98	78,02
	6	3,20	0,5208	42,66	79,29	45,85	85,22
	9	3,08	0,5208	41,06	76,31	44,13	82,02
3	3	1,60	0,4872	21,33	39,64	22,81	42,39
	6	2,93	0,4872	39,06	72,60	41,78	77,65
	9	3,08	0,4872	441,06	76,31	43,91	81,61
4	3	1,73	0,4994	23,06	42,86	24,71	45,92
	6	3,48	0,4994	39,06	72,60	41,85	77,78
	9	3,60	0,4994	48,00	89,21	51,42	95,57
5	3	2,40	0,4826	32,00	59,47	34,20	63,56
	6	3,08	0,4826	41,06	76,31	43,89	81,57
	9	3,08	0,4826	41,06	76,31	43,89	81,57

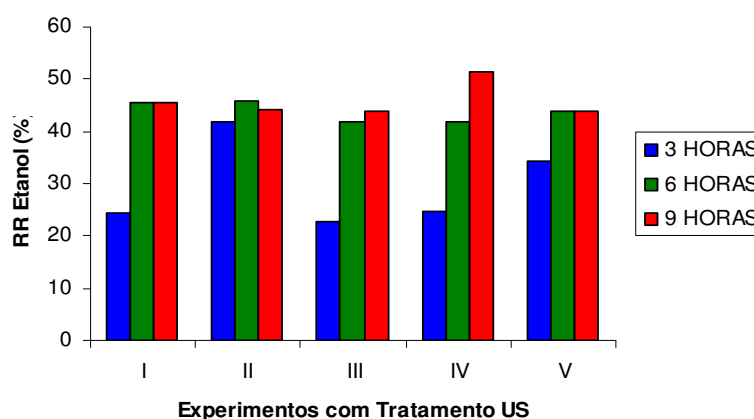


Figura 11: Resultados médios comparativos de 5 repetições em quintuplicatas do rendimento real (RR) em porcentagem, do processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*, com tratamento de US no tempo de 0 hora de fermentação.

Verificou-se comparativamente os resultados inserido na tabela 8 e 9 , bem como as figuras 10 e 11 e pôde-se verificar que, quando o tratamento com US é realizado após 3 horas de avaliação, o rendimento real da fermentação mostra diferenças que se reproduzidas em processo de grande escala, tem significância.

Tomando-se como referência a soma das médias do rendimento real em porcentagem, na tabela 8 observou-se no tempo de 3 horas , o valor de 26.96 % dos cinco ensaios e 29.64 % observado na tabela 9. A partir disso pôde-se inferir que a irradiação de US tem capacidade de alterar as células de *S. cerevisiae*, provavelmente interferindo na permeação celular, facilitando a entrada de açúcar e a saída de etanol.

Considerando-se o tempo de multiplicação das leveduras de 90 minutos, quando estas células sofrem irradiação decorridos cerca de 180 minutos, tais células teriam condição de se reabilitarem de algum possível efeito de US que teriam propiciado alteração no metabolismo glicolítico. Tais dados vem reforçar os resultados inseridos na tabelas 7.

A irradiação ultra-sônica aplicada em tempo de 30 segundos não afetou a viabilidade celular, embora TOMASIN (2001), PALMA e BUCALON (1989), tenham mostrado que células de *S. cerevisiae* irradiadas por um longo período sofrem a morte celular. Também CHISTI (2003) realizou estudos mostrando a eficiência do ultra-som em processos biotecnológicos.

Os estudos realizados com apenas uma aplicação de 19 KHz a 80 W por 30 segundos na fermentação em batelada mostraram dados que embora menores estão de acordo com dados de SCHLÄFER et al (2000) que trabalhou com irradiação de US em pulsos , em batelada trabalhando com frequência maior de 25 KHz. Por limitação do equipamento disponível para o presente trabalho não houve condição de aumento das condições de frequência.

As tabelas 8 e 9 não indicam alterações significativas do rendimento real após acompanhamento durante 6 e 9 horas de fermentação, visto que as células já tivera se restabelecido do choque ultra-sônico. Para maiores comparações dos rendimentos finais, aplicações ultra-sônicas intermitentes deveriam ser aplicadas.

5.2 - Resultados do experimento II, sem e com tratamento de ultra-som (US) no tempo zero hora.

A tabela 10 mostra os dados referentes a resultados médios de 5 repetições em triplicata, da produção em % (vol) de etanol obtidos no experimento II realizado sem e com tratamento de US num ciclo total de 4,5 horas de fermentação em 5 repetições.

Tabela 10: Quantificação comparativa média da produção em % de etanol, de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com 7,5 g/100 mL de ART, nos tempos de 1,5; 3 e 4,5 horas de fermentação sem e com tratamento de US no tempo 0 hora, mantidos à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tempo (horas)	T _{1,5}		T ₃		T _{4,5}	
Amostras	controle	US	controle	US	controle	US
	1,91	2,00	2,38	2,71	2,86	2,93
	1,52	1,52	2,72	3,10	3,30	3,56
	0,90	0,93	2,30	2,27	3,33	3,62
	1,00	1,03	2,30	2,55	3,53	3,50
	0,97	1,12	2,65	2,85	3,78	3,75
Médias	1,26	1,32	2,47	2,70	3,36	3,47
Diferenças	0,06		0,23		0,11	
% Diferenças	4,76		9,31		3,27	

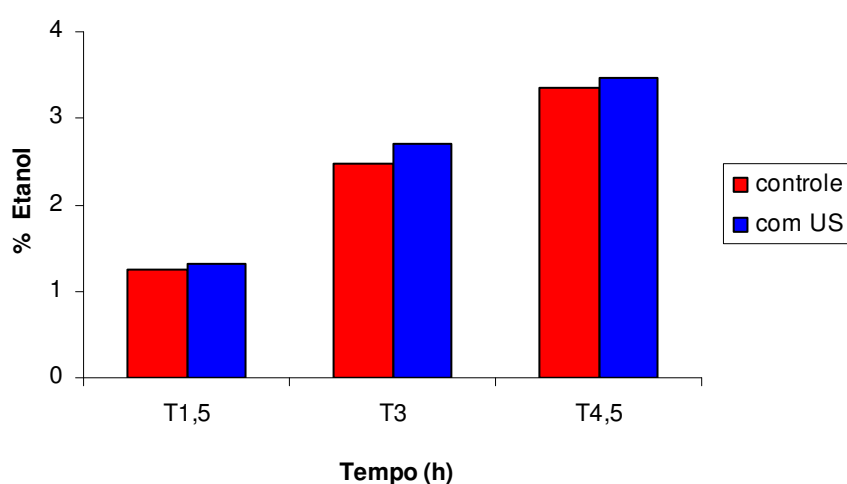


Figura 12: Quantificação média comparativa de 5 repetições em triplicata da variabilidade da porcentagem de etanol durante processo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*, sem e com tratamento de US em 0 hora de fermentação nos tempos: 1,5 ; 3 e 4,5 horas.

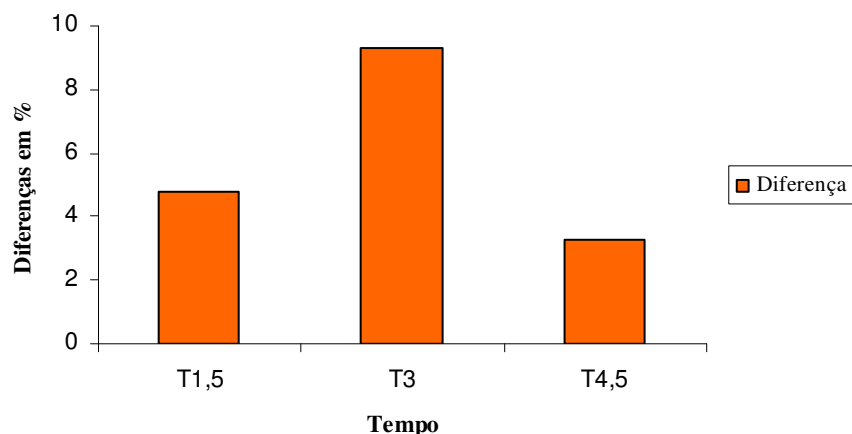


Figura 13: Quantificação da porcentagem das diferenças de produção de etanol, durante processo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidas entre amostras controle e as amostras irradiadas com US em 0 hora de fermentação nos tempos: 1,5 ; 3 e 4,5 horas.

Os experimentos com aplicações em tempo 0 e amostras colhidas 1,5; 3 e 4,5 hora, mostraram que o US uma vez aplicado no início da fermentação induz maior diferença na porcentagem em volume de etanol. A maior porcentagem verificada em ciclo de 4,5 horas, foi detectado após 3 horas e como se supõe as células já estão se recondicionando, tanto que ao se coletar amostras com 4,5 horas, houve diminuição na diferença em porcentagem, de acordo com o que indica a tabela 11 e figura 12 e de maneira mais acentuada, na figura 13.

5.3 - Resultados do experimento III, sem e com tratamento de ultra-som (US).

5.3.1 Resultados da avaliação da fermentação de *S. cerevisiae*, sem e com tratamento de US nos tempos 0 e 3 horas, com aplicação de 30 segundos em mosto com 7,5 g/100 mL de ART inicial.

Tabela 11: Quantificação média de 5 repetições em quintuplicata da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem tratamento de US no tempo de 0 e 3 horas, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tempo (horas)	Aplicação US (horas)	Repetições					Média
		1	2	3	4	5	
0	0	-	-	-	-	-	-
3	3	2,53	3,33	2,13	2,13	1,45	2,31
6	-	3,75	3,48	3,08	3,33	2,53	3,23
9	-	3,48	3,60	3,08	3,20	3,20	3,31
Média		3,25	3,47	2,76	2,88	2,39	

Tabela 12: Quantificação média de 5 repetições em quintuplicata da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação com tratamento de US no tempo de 0 e 3 horas, mantidas à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tempo (horas)	Aplicação US (horas)	Repetições					Média
		1	2	3	4	5	
0	0	-	-	-	-	-	-
3	3	3,08	2,93	2,00	2,53	1,60	2,42
6	-	3,60	3,60	3,08	3,33	3,48	3,41
9	-	3,08	3,90	3,08	3,33	3,08	3,29
Média		3,25	3,47	2,72	3,06	2,72	

Este experimento foi realizado com intuito de verificar se também com aplicação nos tempos de zero e 3 horas, o mesmo teria resultados mais eficientes em relação a produção de etanol, quando comparado ao experimento I, onde a aplicação de US foi somente efetuada no tempo de 0 hora de fermentação.

Conforme observado em tabela 12 e 13 os resultados médios das amostras controle e sem tratamento de US nos 5 ensaios com 5 repetições mostram-se favoráveis a produção de etanol quando comparados entre si.

5.4 - Resultados do experimento IV, sem e com tratamento de ultra-som (US).

5.4.1 Quantificação da produção em g/100 mL de etanol da fermentação de *S. cerevisiae* sem e com tratamento de US nos tempos 0 ; 3 ; 6 e 9 horas, com aplicação de 30 segundos em mosto com 7,5 g/100 mL de ART inicial, empregando ciclos de células (amostras em duplicata).

Tabela 13: Quantificação média da produção em g/100 mL de etanol, nos tempos de 3 ; 6 e 9 horas de fermentação sem e com tratamento de US nos tempos de 0 ; 3 ; 6 e 9 horas, mantidos à 30°C $\pm$ 2°C , empregados 2 ciclos de células

Aplicação US (horas)	Amostras	% Etanol / 100mL			
		Células	1°	2°	Média
		Iniciais	Reciclo	Reciclo	
0	-	-	-	-	
3	Controle	1,45	1,45	2,40	1,76
	Antes US	1,20	1,60	1,85	1,55
	Depois US	1,32	1,20	2,00	1,50
6	Controle	3,07	3,20	2,80	3,02
	Antes US	3,07	2,40	3,47	2,98
	Depois US	2,80	3,32	3,20	3,10
9	Controle	2,65	3,20	3,47	3,10
	Antes US	2,80	3,60	3,32	3,24
	Depois US	2,92	3,75	3,07	3,24

A média da amostra controle com 3 horas de fermentação, quando comparada as suas respectivas amostras controle médias, dos tempos de 6 e 9 horas de fermentação mostram que as diferenças foram respectivamente 1,26 e 1,34 % de etanol /100 mL.

Considerando-se a média da amostra irradiada coletada antes da aplicação do US no tempo de 3 horas de fermentação, quando comparada à mesma amostra nos tempos de 6 e 9 horas de fermentação, encontramos 1,43 e 1,69% de etanol/100mL.

E por final, a média da amostra irradiada coletada após aplicação do US no tempo de 3 horas de fermentação, quando comparada à mesma amostra nos tempos de 6 e 9 horas de fermentação, encontramos 1,60 e 1,74% de etanol/100mL, conforme pode-se observar na tabela 15.

Tabela 14: Diferenças das médias da porcentagem de etanol dos tempos iniciais em relação aos tempos de 6 e 9 horas de fermentação

Tempo (h)	Controle	Diferença	Antes US	Diferença	Depois US	Diferença
3	1,76	-	1,55	-	1,50	-
6	3,02	1,26	2,98	1,43	3,10	1,60
9	3,10	1,34	3,24	1,69	3,24	1,74

Considerando-se pois, esta aplicação de radiação em intervalos de 3 horas, em 3 fermentações (início, 1º e 2º reciclo), verifica-se comparando os resultados em porcentagem de etanol produzido das células não irradiadas com as células que passam por irradiação, as diferenças foram de 1,69 e 1,74% respectivamente após período de dois ciclos fermentativos.

O experimento 5.4 mostra mais uma vez que o US deve ser explorado com grande ênfase, para melhorar os rendimentos fermentativos.

As aplicações de US sequenciais devem favorecer a melhoria dos rendimentos fermentativos possivelmente devido a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática e também da parede celular da *S. cerevisiae*, facilitando desta forma a transferência do etanol produzido intracelularmente para o meio externo.

5.5 – Observações sobre a formação de espuma durante processo fermentativo

As amostras para as análises ao serem retiradas nos tempos pré-estabelecidos, eram homogeneizadas. Nesse momento observou-se que havia grande formação de espumas, quando comparado com as amostras não irradiadas com US conforme figura 14.

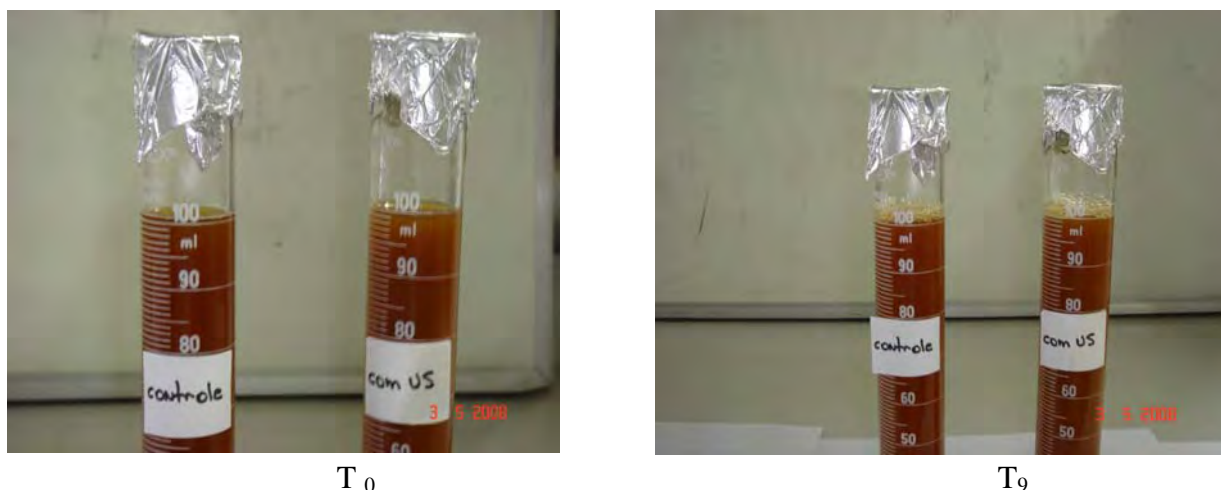


Figura 14: Produção de espuma durante fermentação em mosto com *Saccharomyces cerevisiae*, em amostras sem e com tratamento de US em 0 hora de fermentação. T₀ início, T₉ final.

As amostras irradiadas com US, apresentaram grande quantidade de espuma, com bolhas grandes principalmente na superfície e estas se desfaziam rapidamente conforme figura 15. Na suspensão as bolhas eram de menor tamanho e muito concentradas, alterando o visual do meio que adquiria aspecto leitoso. Tais bolhas depois de pouco tempo se desfaziam.

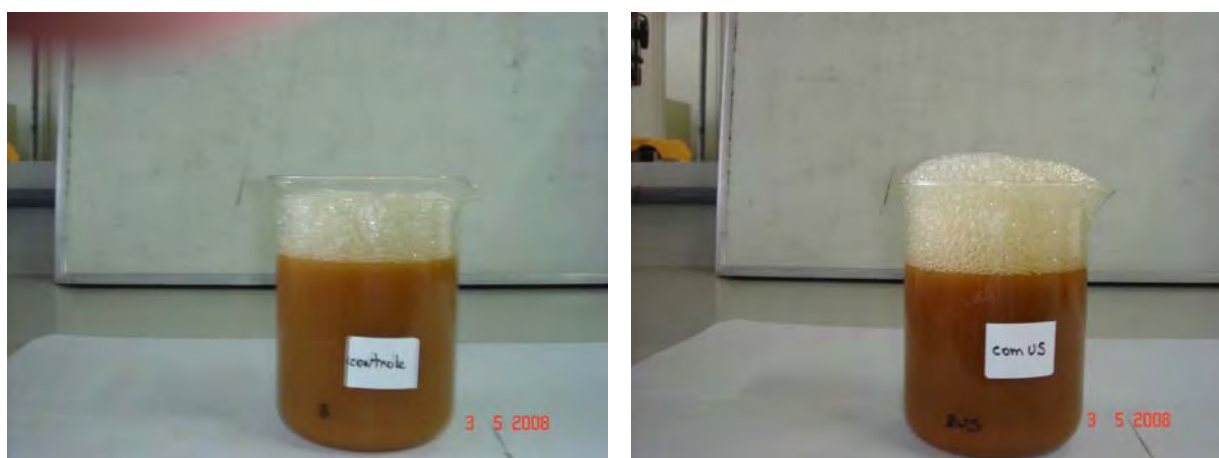


Figura 15: Mosto em etapa fermentativa com *Saccharomyces cerevisiae*, com 3 horas de fermentação, após homogeneização para amostragem, sem e com tratamento de US aplicado no início (0 hora).

Quando comparou-se operacionalmente a coleta de amostras do material irradiado e não irradiado, pôde-se constatar que o material irradiado apresentava maior fluxo para eliminação do CO₂, visto que ao coletar as amostras, ocorria grande eliminação de CO₂ verificado na forma de microbolhas quando comparado com amostras não irradiadas. Este fato está de acordo com

informações de MATSUURA (1994), onde relata que o US elimina com fluxo mais acelerado o CO₂ dissolvido, eliminando um dos fatores de stress da levedura, propiciando um melhor desempenho fisiológico, resultando dessa forma em melhor rendimento etanólico.

6. CONCLUSÕES

No referido trabalho, utilizou-se ultra-som de 19 KHz com potência de 80 W com tempo de aplicação de 30 segundos durante processo fermentativo, com objetivo de verificar se a aplicação do mesmo induz a alguma alteração quanto a produção de etanol.

Os parâmetros analisados mostraram diferenças.

Segundo a rotina estabelecida, amostras irradiadas, evidenciaram que após 3 horas houve maior liberação percentual de etanol, quando comparada a um controle não irradiado.

A irradiação levou a diminuição do pH e aumento da acidez sulfúrica, supondo-se como causas: a maior liberação de CO₂ e ácidos orgânicos pela célula.

Não foram observados no sistema irradiado, variação significativa da viabilidade e número de células totais, o que evidencia que as ondas ultra-sônicas nas condições aplicadas não comprometeram a *S. cerevisiae*.

No procedimento de reciclo de células, a irradiação nos períodos estabelecidos (intervalos de 3 horas) propiciou maior produção percentual de etanol.

Como contribuição, essa dissertação deixa o importante indicativo que futuros estudos, com essa metodologia devam ser propostos para a definição de procedimentos que possam solidificar a implantação da eficácia quanto à aplicação do ultra-som em processo de produção de etanol pela *S. cerevisiae*.

Essa pesquisa é de grande interesse para a indústria sucroalcooleira merecendo investimentos mais intensos dos órgãos governamentais.

7. REFERÊNCIAS

ALLIGER, H. Ultrasonic disruption. **American Laboratory**, v.10, p.75-85, 1975.

ANGELIS, D. F. “**Leveduras**” . Primeiro Seminário sobre Microbiologia – Fermentação Etanólica, Rio Claro, 1987, p. 41-62.

ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Apostila de treinamento: Usina Santa Terezinha. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2004.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. - **Ultra-som (I): Influência do ultra-som na Química**. São Paulo, Química Nova, v.15, nº4, p.302 – 316, 1992.

BAYROCK D.; INGLEDEW, W.M. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.27, nº1, p.39-45, 2001.

BECKER, J. M.; CALDWELL, G.A.; ZACHGO, E.A. **Biotechnology: A laboratory course**, Academic Press, San Diego, 2. ed., 261p., 1996.

BERLINER,S.(1999). **Berliner, III's Ultrasonics homepage** URL <http://home.att.net/~Berliner-Ultrasonics/uson-3.html>. Acesso em 20 de abril de 2007.

BUCALON, J.; PALMA, M.S. **“Ultrasound source of modification of physiochemical parameters in cell suspension”**. Ultrasonic International Conference, p. 1214-17, 1989.

CHERUBIN, R.A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003, 124 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

CHISTI, Y. Sonobioreactors : using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, New Zealand, v.21, nº 72, February, p.89-93, 2003.

CICCOLINI, L.; TAILLANDIER, P.; WILHEM A. M.; DELMAS, H.; STREHAIANO, P. Low frequency thermo-ultrasonication of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions: effect of temperature and ultrasonic power. **Chemical Engineering Journal**, v.65, p. 145 - 149, 1997.

COPERSUCAR, **Manual de Métodos Analíticos: controle químico da fermentação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar CTC. Divisão Central de Laboratório de Análise e Controle de Qualidade, 1995, p.83.

DOMINGOS, R.N. **Contribuições e usos do ultra-som de média intensidade no preparo de catalizadores e produção ativada de etanol**. 1998. Tese (Livre-Docente em Termodinâmica), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

GUERRERO, S.; LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M., Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.2, p.31-39, 2001.

KNORR, D.; HEINZ, M.Z.V.; LEE, D. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Applied Science & Technology**. London, v.15, nº 5, May , p. 261 – 266, 2004.

KORNFELD, M.; SUVOROV, L. On the destructive action of cavitation. **Journal of Applied Physics**. New York, v. 15, p. 195-197, 1944.

LEITE DE OLIVEIRA, M.C.F. **Aspectos do metabolismo glicídico em *Saccharomyces diastaticus***. 1987. f.227, Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1987.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo. Ed. Edgard Blücher v.3, p. 1 – 43, 2001.

LORIMER, J.P.; MASON, T. Sonochemistry Part 1 – The physical aspects. **Chemical Society Reviews**. London, v.16, nº 2, Apr/June, p. 239 – 274, 1987.

LOZANO-HERNÁNDEZ, A. **Viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae* en etapa fermentativa com diferentes concentraciones de cloruro de colina**. 1995. 78f. Tesis de pregrado, Universidad Del Valle, Cali, Colômbia, 1995.

MASON, T.J. Sonochemistry. The uses of ultrasound in chemistry, Royal Society of Chemistry, 1990.

_____. Large Scale Sonochemical processing: aspiration and actuality. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, nº 7, p. 145 – 149, 2000.

MASON, T.J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**. Amsterdam, v.3, nº 3, Nov., p. S 253 – S 260, 1996.

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

McCLEMENTS, J.A. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science e Technology**. Oxford, UK, v.6, nº 9, Sept., p. 293-299, 1995.

_____. Ultrasonic characterization of food and drinks : principles, methods, and applications. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.37, nº 1, p.1 – 46, 1997.

NICKERSON, W. J., Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi. IV. Molecular bases of form in yeasts. **Bacteriological Revision**, v. 27, p. 305-324, 1963.

OKI, C.S. **Efeito da Irradiação Ultrasônica em Microalgas**. 2003. 47f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

OKUNO, E.; CALDAS, I.L.; CHOW, C. **Física para Ciências Biológicas e Biomédicas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1986.

PALMA, M.S.; BUCALON, A.J. “ **Sonochemical aspects of yeast cell disruption by ultrasound**”. Ultrasonic International Conference, p.1186-88, 1989.

PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia : Conceitos e Aplicações**. São Paulo. Makron Books, v.1, 1996.

RASO, J.; MAÑAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the out put power transfered into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**. Oxford, nº.5, p. 157-162, 1999.

RICHARDS, W. T.; LOOMIS, A.L. The chemical effects of high frequency sound waves. **Journal of American Chemical Society** .Washington.D.C., v.49, nº 12, p. 3086-3100, Dec.1927.

SAKAKIBARA, M. Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*. **Ultrasonics Sonochemistry**. V. 1, p.107-110, 1994.

SCHLÄFER, O.; ONYECHE, T.; BORMANN, H.; SCHRÖDER, C.; SIEVERS, M. Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors. **Ultrasonics**, v. 38, p. 711-716, 2000.

SHARF, J.M. “**Exame Microbiológico de Alimentos**”. São Paulo. Editora Polígono, 1974.

SILVA, E.R. **Aplicação de Ultrasom em Suspensão de Esporos de *Aspergillus niger***. 2006. 47f. Trabalho de conclusão de curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**. Oxford, v. 30, nº 7 3, p.180 – 185, 1992.

STUPIELLO, J.P.; MARINO, E.A.; CELINSKI, R. Fermentação. Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, 1983. p.79.

SUSSMAN, A. S. Microrganismo, crescimento, nutrição e interação. São Paulo, Edart, 1974, p. 56-60.

TOMASIN, A.C. **Bioresistência e Efeitos Causados pela Ação Acoplada da Irradiação Ultra Sônica e Processo Eletrolítico no Aproveitamento da Levedura.** 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

VITOLO, M.; MINAMI, P. S. **Leveduras em Biotecnologia**, São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, p. 97, 1989.

WANG, D. Ultrasound- enhanced lactose hydrolysis um milk fermentation with *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 21, p.86-92, 1996.

WILLIAMS, A.R., **Ultrasound: Biological effects and potential hazards.** 1 ed., Orlando, Academic Press, p.321, 1983.