



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM
MICROAMPERAGEM DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR
*Saccharomyces cerevisiae***

RODRIGO MIRANDA PIRES SANTOS

Salvador – BA

2022

RODRIGO MIRANDA PIRES SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM
MICROAMPERAGEM DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da Universidade Federal da Bahia - UFBA como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando
de Almeida

Co-Orientador: Gustavo Miranda Pires
Santos

Salvador – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

TERMO DE APROVAÇÃO

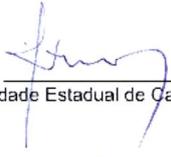
RODRIGO MIRANDA PIRES SANTOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE CORRENTE ELÉTRICA EM MICROAMPERAGEM DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR *Saccharomyces cerevisiae*

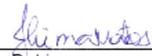
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 19 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Paulo Fernando de Almeida – Orientador 
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,
UNICAMP, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Jailton de Azevedo Silva Júnior 
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelo Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz
FIOCRUZ, CPQGM, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Josilene Borges Torres Lima Matos 
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Edgard Bacic de Carvalho 
Doutor em Engenharia Química pela The Pennsylvania State University,
PSU, Estados Unidos.
Instituto Federal da Bahia.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

A toda minha família. Minhas avós Dona Carmem e Dona Maria (*in memoriam*), meus Pais e meu Irmão.

A todos da O₂, em especial à Rodrigo, Natalia e Sr. Luiz (*in memoriam*).

Aos professores Prof. Paulo Almeida, Prof^a. Josilene Matos, Prof, Fábio Chinalia que cederam o espaço dos laboratórios e o tempo para encaminharem nessa jornada.

A Jacson que ajudou a montar equipamentos e elaborar os protótipos.

A Luís Widmer que ajudou a fazer as análises cromatográficas.

Aos colegas e as amizades feitas no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos - LABEM e Moura Costa, que me motivaram e mostraram novos pontos de vista.

A Henrique e Carol, que ajudaram nas avaliações dos produtos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo apoio da bolsa.

Resumo

Introdução: O bioetanol é um composto produzido tradicionalmente a partir da fermentação de açúcares fermentescíveis. Diferentes substratos podem ser utilizados para este fim. Na produção de bioetanol produzido a partir de substratos lignocelulósicos são gerados etanol de segunda e terceira gerações. Na produção de deste bioproduto podem ser utilizados microrganismos como *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Este último, por sua vez, é o organismo mais utilizado para este fim. A produção de etanol pode ter diferentes aplicações, tais como produção de bebidas, sejam fermentadas e/ou destiladas, ou mesmo na produção de biocombustíveis. Neste sentido, métodos que otimizam a produção de bioetanol tornam-se relevantes. Ensaio distintos de estímulos vem sendo testados a fim de alcançar este objetivo, tal como a aplicação de luz. **Objetivos:** Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de correntes elétricas em microamperagens sobre *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. **Material e Métodos:** Para tanto, foram construídos biorreatores adaptados a correntes elétricas no meio de cultura e submetidos à fermentação alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae*. As correntes utilizadas foram de 1Hz e 50Hz, com intensidades de 250 μ A, 500 μ A, 750 μ A e 990 μ A, sobre 8 grupos experimentais e um grupo controle onde não havia aplicação de correntes elétricas. **Resultados:** As correntes elétricas com a modulação de 50Hz apresentaram aumento na produção de etanol, em 10% aproximadamente, enquanto em corrente de 1Hz houve uma redução na produção de etanol. Na frequência de 50Hz à intensidade de 990 μ A ocorreu a maior diferença em relação ao grupo controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa em relação ao controle, razão pela qual a corrente de 50Hz e 990 μ A foi selecionada e testada em biorreatores de 20L e mesmo neste caso a significância foi mantida. Análises cromatográficas confirmaram que os testes de determinação de etanol e de glicose além de apresentar uma zona com picos que podem alterações organolépticas nas bebidas entre o controle e o eletroestimulado. Portanto, conferindo ao grupo eletrofermentado, as características de uma bebida mais

equilibrada. **Conclusão:** Concluiu-se com este trabalho que o uso de correntes elétricas pode aumentar a produção de bioetanol.

Palavras-chave: *Eletromodulação; Bioetanol; Leveduras*

Abstract

Introduction: Bioethanol is a compound traditionally produced from the fermentation of fermentable sugars. Different substrates can be used for this purpose. In the production of bioethanol produced from lignocellulosic substrates, second and third generation ethanol are generated. In the production of this bioproduct, microorganisms such as *Zymomonas mobilis*, *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae* can be used. The latter, in turn, is the organism most used for this purpose. The production of ethanol can have different applications, such as the production of beverages, whether fermented and/or distilled, or even in the production of biofuels. In this sense, methods that optimize the production of bioethanol become relevant. Different stimulus tests have been tested in order to achieve this objective, such as the application of light. **Objectives:** Thus, the objective of the present work was to evaluate the effect of the application of electric currents in microamperages on *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Material and Methods:** For this purpose, bioreactors adapted to electric currents in the culture medium and patented for alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* were built. The currents used were 1Hz and 50Hz, with intensities of 250 μ A, 500 μ A, 750 μ A and 990 μ A, on 8 experimental groups and a control group where there was no application of electrical currents. **Results:** Electric currents with 50Hz modulation showed an increase in ethanol production by approximately 10%, while with 1Hz current there was a reduction in ethanol production. At the frequency of 50Hz at the intensity of 990 μ A, the greatest difference occurred in relation to the control group. This difference was statistically significant in relation to the control, which is why the current of 50Hz and 990 μ A was selected and tested in 20L bioreactors and even in this case the significance was maintained. Chromatographic analyzes confirm that the tests of ethanol and glucose competences, in addition to presenting a zone with peaks that can alter organoleptic in the drinks between the control and the electrostimulant. Therefore, giving the electrofermented group the characteristics of a more balanced drink. **Conclusion:** It was concluded with this work that the use of electric currents can increase the production of bioethanol.

Key-words: *Eletromodulation; Bioethanol; Yeast*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

® = Marca registrada

°C = graus Celsius

μ = micro

λ = comprimento de onda

n = nano

m = mili

A = Amperagem

Hz = Hertz

L = Litros

g = grama

L = Low

ORP = pEh = potencial de oxirredução

O₂ = oxigênio

CO₂ = dióxido de carbono

NAD = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ATP = Adenosina Trifosfato

pH = potencial de Hidrogênio iônico

D.O. = Densidade ótica

AÇO INOX = aço inoxidável

h = horas

TiO₂ = Dióxido de titânio

NaOH = hidróxido de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo da glicólise e fermentação.....	14
Figura 2: Fluxograma com etapas do estudo. Etapas I) Passo I: testes de correntes em biorreatores de 90mL; Passos II: avaliação de tendência das curvas; Passo III: Seleção da corrente; Etapa II) Passo IV: testes usando a melhor corrente em 20L.....	21
Figura 3: A) Projeto tridimensional do biorreator. B) Eletromodulação nos biorreatores de 90mL.....	27
Figura 4: Biorreator de polipropileno modificado.....	28
Figura 5: A) projeto tridimensional do biorreator. B) biorreator confeccionado em aço inox 316L com capacidade máxima de 100L.....	29
Figura 6: Produção de etanol nos diferentes grupos experimentais. A) produção de etanol utilizado correntes apresentavam 1Hz e amperagens que variaram de 50uA à 200uA e o grupo controle. B) produção de etanol utilizado correntes apresentavam 1Hz e amperagens que variaram de 250uA à 990uA e o grupo controle.	30
Figura 7: Determinação de etanol nos grupos experimentais, utilizando frequência de 1Hz e diferentes amperagens, e grupo controle. Revelando uma redução na produção de etanol. O grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos experimentais com $p \leq 0,0005$	30
Figura 8: Determinação de etanol nos grupos experimentais, com 50Hz e diferentes amperagens, e grupo controle. O grupo 990 μ A apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, 250 μ A e 500 μ A com $p \leq 0,0058$ e em relação ao grupo 750 μ A com $p = 0,007$	31
Figura 9: Cinética de produção de etanol do grupo controle e grupo eletrofermentado.	32
Figura 10: Concentração de células suspensas nos grupos controle e eletrofermentado.	32
Figura 11: Percentual de etanol produzido nos grupos controle e eletrofermentado...	33
Figura 12: Carboidratos residuais presentes nos grupos controle e eletrofermentado.	34
Figura 13: Concentração de glicose nos grupos controle e eletrofermentado.	34
Figura 14: Cinética de oxigênio consumido durante fermentação na presença ou ausência de eletromodulação nos mostos cervejeiros.....	35
Figura 15: Concentração do oxigênio dissolvido nos grupos controle e eletrofermentado.	35
Figura 16: Perfil cromatográfico do padrão de etanol.....	36
Figura 17: Perfil cromatográfico do padrão de glicose (pico da esquerda, 16 min.) e frutose (pico da direita, 22 min.).....	36
Figura 18: Perfil cromatográfico do padrão de sacarose.	37
Figura 19: Perfil cromatográfico da cerveja produzida tradicionalmente.....	37
Figura 20: Perfil cromatográfico da cerveja produzida eletrofermentado.....	38

SUMÁRIO

1.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
	1.1 Produtores de Bioetanol	13
	1.2 Fermentação	14
	1.3 Substratos	15
	1.4 Eletromodulação	16
	1.5 Cromatografia	17
2.	OBJETIVO.....	19
	2.1 Objetivo geral.....	19
	2.2 Objetivos específicos.....	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
	3.1 Etapa I	21
	3.2 Etapa Laboratorial	21
	3.2.1 Confeção dos biorreatores.....	21
	3.2.2 Sólidos Totais Dissolvidos (Brix).....	22
	3.2.3 Determinação de etanol.....	22
	3.2.4 Triagem e seleção das correntes elétricas.....	23
	3.3 Etapa II – modelo cervejeiro	23
	3.3.1 Esterilização e Sanitização dos Equipamentos.....	23
	3.3.2 Brassagem.....	23
	3.3.3 Inóculo inicial e fermentação.....	24
	3.3.4 Contagem de células.....	25
	3.3.5 Sólidos Totais Dissolvidos (Brix).....	25
	3.3.6 Dosagem de glicose.....	25
	3.3.7 Aferição de bioetanol.....	25
	3.3.8 Avaliação de oxigênio dissolvido.....	25
	3.3.9 Avaliação do mosto fermentado por HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector).....	25
	3.3.10 Avaliação estatística.....	26
4.	RESULTADOS.....	27
	4.1 Etapa I - Produtos obtidos no estudo	27
	4.1.1 Produtos obtidos no estudo	27
	4.1.1.2.1 Triagem das correntes.....	29
	4.2 Etapa II – Modelo cervejeiro	31
	4.2.1 Cinética de produção de etanol.....	31
	4.2.2 Contagem de células.....	32

4.2.3	Produção de etanol	33
4.2.4	Brix	33
4.2.5	Concentrações de glicose	34
4.2.6	Oxigênio dissolvido	34
4.2.7	Cromatografia HPAEC-PAD	35
4.2.8	<i>Produto III - Patente</i>	38
4.2.9	<i>Avaliação preliminar do protótipo III</i>	59
5.	DISCUSSÃO	60
6.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Produtores de Bioetanol

Os processos de produção de bioetanol podem utilizar diferentes microrganismos, dentre eles fungos e bactérias. Além deles ainda podem ser utilizadas apenas suas respectivas enzimas. Vale ressaltar que o bioetanol não é o único bioativo produzido por estes microrganismos que pode ser usado como combustível (Tse, Wiens & Reaney, 2021).

Dentre as bactérias produtoras de bioetanol podem ser citadas *Zymomonas mobilis* e *Clostridium thermocellum*, enquanto dentre os fungos pode mencionada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este último é o organismo mais utilizado no mundo para a produção de bioetanol (Joshi *et al.*, 2019).

Muitos dos estudos conduzidos sobre este tema derivam da necessidade de produção de combustíveis renováveis. Entretanto, o uso destes organismos para a produção de etanol pode ser encontrado em vários setores industriais além da indústria petrolífera (Muktham *et al.*, 2016).

Bactérias do gênero *Zymomonas* são mesófilas, portanto, a produção de etanol ocorre em temperatura ambiente. Sua produção é reduzida quando é utilizado substrato lignocelulósico. *Clostridium thermocellum*, por sua vez, apresenta um conjunto de enzimas que podem atuar nestes compostos e, portanto, formar bioetanol. Contudo estes organismos como o seu nome sugere são termofílicos, conseqüentemente precisam de temperaturas acima de 50°C para atuarem de modo satisfatório (Todhanakasem *et al.*, 2019).

Saccharomyces cerevisiae é um fungo considerado não-patogênico amplamente utilizado e que é capaz de fermentar em temperaturas que podem variar de 10 a 35°C. Este é um dos organismos mais estudados do mundo e já existem cepas engenheiradas capazes de fermentar substratos lignocelulósicos. Na indústria de alimentos e bebidas, diferentes cepas deste fungo são utilizadas para a produção de pães e bebidas fermentadas (Joshi *et al.*, 2019). Entretanto em indivíduos imunossuprimidos este fungo pode causar infecções oportunistas

quando utilizados como probióticos (Silva, Felipe Henriques Alves da et al., 2011).

1.2 Fermentação

A fermentação é um processo bioquímico em que um açúcar é metabolizado parcialmente. Existem dois tipos básicos de fermentação, eles se diferenciam a partir dos compostos produzidos, o etanol é um deles. Este processo é a base para a produção de bioetanol e bebidas alcoólicas (Huang *et al.*, 2015).

A fermentação depende de dois eventos para ocorrer: o primeiro deles é a glicólise e o segundo deriva da ação de duas enzimas, uma descarboxilase e uma desidrogenase. Assim o carboidrato é metabolizado em piruvato e após a ação destas duas enzimas é formado o etanol (Malakar, Paul & Pou, 2020).

Durante a ativação destas vias, a produção de ATP é restrita à primeira etapa, a glicólise. Nesta etapa o NAD^+ é convertido em $\text{NADH} + \text{H}^+$. Assim a regeneração de NAD^+ é importante para que o processo continue. Os processos fermentativos são efetuados na ausência do oxigênio (Krantz *et al.*, 2004) (Figura 1).

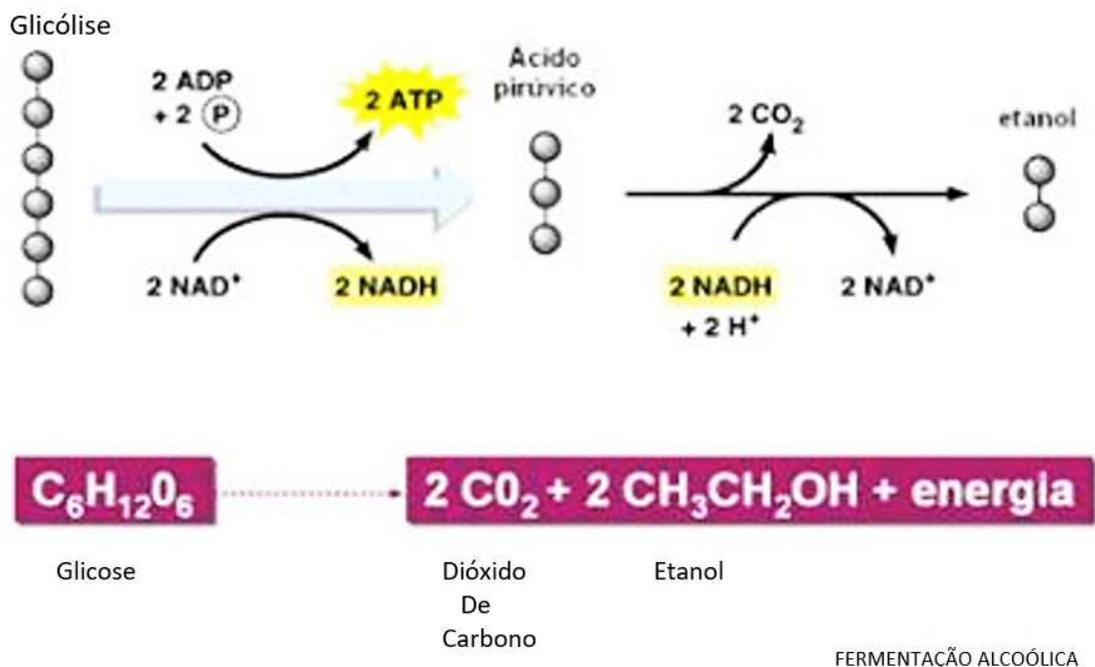


Figura 1: Resumo da glicólise e fermentação.

Fonte: Venturini Filho & Cereda, 2001.

Este processo é considerado como uma via metabólica anaeróbica, mas vale a pena ressaltar que a fermentação não é o único processo sem a presença de oxigênio. Alguns organismos podem usar moléculas inorgânicas como último acceptor de elétrons, tal como o sulfato. Nestes casos, tem-se a respiração celular anaeróbica, podendo ser realizada por algumas bactérias e arqueias (Li *et al.*, 2021).

Durante a síntese de etanol outros metabólitos e subprodutos podem ser liberados, tais como o dióxido de carbono e diacetil. A produção de alguns destes metabólitos pode ser controlada através da determinação de diferentes fatores, tais como a temperatura e a concentração do inóculo.

1.3 Substratos

Os substratos usados na produção de etanol podem ser de diferentes origens, entretanto estes substratos possuem carboidratos fermentescíveis. Vale ressaltar que o tipo de substrato pode definir a 'geração' do bioativo. Assim, no caso da glicose extraída da cana-de-açúcar, por exemplo, tem-se o bioetanol de primeira geração. Logo, quando subproduto de uma cadeia produtiva primária é utilizado como substrato em uma cadeia secundária tem-se bioetanol de maior geração (Tse *et al.*, 2021; Tse, Wiens & Reaney, 2021).

A síntese de bioetanol de segunda geração é utilizada para a produção de combustível, são utilizados substratos lignocelulósicos. Vale ressaltar que a presença de lignina nestes substratos dificulta o processo de síntese de etanol e necessita de etapas de acidificação, alcalinização ou exposição a altas temperaturas e pressão (Canada, 2020; Tse, Wiens & Reaney, 2021).

Os processos de primeira geração, tais como ocorrem nas indústrias de bebidas fermentadas, não requerem as etapas descritas acima. Neste caso específico, os produtos gerados ainda serão diferenciados a partir dos tipos de açúcares fermentescíveis presentes nos substratos. Assim o uso de frutas dará origem aos vinhos e espumantes, o uso de grãos dará origem a cervejas e saquê (Lopes *et al.*, 2016).

Existem ainda os produtos que podem ser obtidos utilizando soluções fermentadas como ingredientes, tal como a cachaça, o uísque, a tequila, dentre

outros. Nestes processos os ingredientes são destilados e depois maturados para a aquisição de sabores e odores característicos (Oliveira *et al.*, 2022).

1.4 Eletromodulação

A otimização de processos visa reduzir ou eliminar desperdício de tempo e recursos ou aumentar a eficiência de um procedimento. Deste modo, quando se tem processos biológicos definidos e com pouco/nenhum redutor de desempenho, sua respectiva otimização relaciona-se com a biomodulação dos componentes bióticos. Assim, a eletromodulação poderia ser alternativa para otimizar as fermentações industriais. Esse mecanismo é controlado e otimizado através de eletrodos resultando em produtos mais puros, tendo um aumento na densidade de células microbianas (Zeyoudi *et al.*, 2015; Rago; Pant; Schievano, 2019; Czerwińska-Główka; Krukiewicz, 2020).

O controle de processos biológicos tradicionalmente ocorre através da regulação de pH, temperatura, componentes do meio de cultura, dentre outros. Contudo, o controle do Potencial de oxidação-redução (ORP) extracelular também pode ser utilizado. Este tipo de modulação pode controlar secundariamente a expressão gênica através da alteração da relação NAD⁺/NADH+H (Moscoviz *et al.*, 2016; Arunasri *et al.*, 2020).

Na eletrofermentação, a ação de correntes elétricas e campos eletromagnéticos podem influenciar a velocidade das reações de redução ou oxidação das vias metabólicas. Neste sentido é possível alcançar aumentos de biomassa microbiana ou produção de ativos através do aumento de eficiência de uma determinada via metabólica. Além disso, reduz o uso de aditivos químicos no processo. Outra aplicação do controle de ORP seria na recuperação de ativos das diversas linhas produtivas (Rago; Pant; Schievano, 2019).

Durante o processo fermentativo, os eletrodos, o ânodo e o cátodo, têm a função exclusiva de transportar elétrons. A interação de elétrons do eletrodo e o sistema receptor pode ocorrer de diversas formas: contato direto entre suas superfícies, nanopartículas e eletrodos, substâncias poliméricas extracelulares produzidas por biofilmes microbianos, através de oxirredução de componentes do meio (Moscoviz *et al.*, 2016).

A eletromodulação pode disponibilizar elétrons diretamente aos microrganismos, como fonte de poder redutor, como integração ou mesmo substituição de carboidratos fermentescíveis. Além disso, as vias metabólicas estimuladas eletricamente induzem o crescimento celular, a biossíntese e um balanço redox. Conseqüentemente, o emprego de correntes elétricas pode ser um método alternativo e sustentável de biomodulador de processos metabólicos (Rago; Pant; Schievano, 2019).

As inovações obtidas através eletromodulação visam minimizar os limitadores nos processos em escala industrial e custo dos produtos. Os processos eletroquímicos agem junto com o metabolismo microbiano controlando o balanço redox, controle de pH, a pureza do substrato e seletividade do produto (Rago; Pant; Schievano, 2019).

Assim hipotetizamos que a eletromodulação, em função das alterações supracitadas, pode produzir produtos diferenciados devido a composição química do produto final. Este evento, portanto, impactaria, por exemplo, nas características organolépticas deste produto.

1.5 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica aplicada na análise, identificação e/ou separação de compostos orgânicos de uma solução. Portanto, sendo capaz de identificar a presença e determinar as concentrações de compostos, tais como aldeídos, ésteres, álcoois, carboidratos dentre outros (Bruce 2002).

Esta técnica, de modo geral, baseia-se na interação entre uma fase estacionária/fixa e uma fase móvel. Deste modo, existem diferentes tipos de cromatografia, tais como cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia de troca iônica (Cserhádi & Szogyi, 2013).

Bortoleto e Gomes, em 2020, demonstraram que a cromatografia pode ser uma ferramenta útil na identificação de compostos presentes na cerveja, além de servir como parte de um processo capaz de identificar diferenças entre cervejas artesanais. Contudo, a grande variedade de receitas é um fator complicador na avaliação de similaridade de cervejas diferentes. Mesmo assim,

é possível diferenciar receitas com grandes alterações nos ingredientes, tal como a alteração do grão maltado.

Portanto, a cromatografia, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, é um teste capaz de identificar e determinar alterações, ainda que sutis, nos perfis dos componentes químicos dos produtos sintetizados.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da eletroestimulação de leveduras na eficiência de obtenção do bioetanol durante processo fermentativo.

2.2 Objetivos específicos

Confeccionar de biorreatores para analisar o efeito de correntes elétricas alternadas na produção de etanol;

Determinar quantidade de etanol produzida e testar frequências distintas em correntes;

Quantificar oxigênio dissolvido;

Avaliar diferentes frequências na eletroestimulação de leveduras para estimular a produção de etanol por leveduras;

Provar um método inovador de eletromicrobiologia para estimular leveduras a produzir etanol em escala industrial;

Caracterizar o produto cervejeiro obtido para identificar a viabilidade do processo de eletrofermentação;

Estimar níveis açúcar na solução antes e depois a estimulação;

Calcular número de células;

Qualificar por cromatografia o produto fermentado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo realizado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos junto ao Laboratório Moura Costa e foi dividido em duas etapas. Na primeira fase foram desenhados e confeccionados os biorreatores que foram utilizados no estudo. Além disso, foram realizados os testes nos reatores de 90mL. Nesta etapa foram avaliadas correntes com 1 Hz e 50 Hz em diferentes amperagens, totalizando 9 grupos experimentais. Em seguida à obtenção de dados dos experimentos, a melhor corrente foi selecionada para a Etapa II (Figura 2).

Na segunda etapa foi utilizado o modelo cervejeiro para avaliar a aplicação das correntes elétricas na produção de bioetanol. Nesta etapa foram realizados testes pareados em biorreatores (fermentadores cervejeiros de polipropileno) de 20L (Figura 2), bem como análises físico-químicas e cromatográficas de amostras das cervejas tradicionais e eletrofermentadas.



Figura 2: Fluxograma com etapas do estudo. Etapas I) Passo I: testes de correntes em biorreatores de 90mL; Passos II: avaliação de tendência das curvas; Passo III: Seleção da corrente; Etapa II) Passo IV: testes usando a melhor corrente em 20L.

Fonte: Próprio autor, 2022.

3.1 Etapa I

3.1.1 Etapa Laboratorial

3.1.1.1 Confecção dos biorreatores

Para execução do projeto foi criado um planejamento estratégico para que fossem alcançados os objetivos específicos. Dessa forma, a pesquisa foi iniciada explorando as possibilidades de aplicação da eletromodulação. Os desenhos

teóricos dos reatores foram realizados com o auxílio do ‘software’ SOLIDWORKS® (Dassault Systèmes S.A, França).

Tabela 1: Produtos obtidos no estudo.

BIORREATOR		
PROTÓTIPOS	CARACTERÍSTICA	ADAPTAÇÃO REALIZADA
1	Reutilização de um pote de vidro de 200ml com tampas de alumínio.	A tampa foi perfurada para que fossem inseridos: eletrodos e permitissem a entrada e saída de ar, com volumes de 200ml.
2	Biorreator cônico, material de polipropileno, com capacidade de 20L, com 3 (três) entradas e saídas: de ar, retirada de amostra e retirada de resíduo.	Alteração de anel vedante para a conexão para eletrodos.
3	Protótipo desenvolvido com características industriais. Material aço inox 316 _L , entrada e saída de ar, engate rápido para entrada e saída de gás com alta pressão, retirada de amostra e resíduo, implantação de eletrodos e capacidade de 100L.	Não houve adaptação. Modelo elaborado pelo próprio autor.

Fonte: Próprio autor, 2022.

3.1.1.2 Sólidos Totais Dissolvidos (Brix)

A avaliação de Sólidos Totais Dissolvidos (Brix) foi determinada com o auxílio de um refratômetro (SIMONE *et al*, 2016). Para tanto, foram utilizados 700 µL das amostras dos meios fermentado e não fermentado, que foram aplicadas cuidadosamente sobre o prisma para evitar formação de bolhas. A água destilada foi utilizada como branco.

3.1.1.3 Determinação de etanol

A determinação de etanol foi realizada pelo método colorimétrico do dicromato de potássio (Oliveira, 2015). Na realização deste teste foi utilizado

espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 600nm. Para a calibração foi elaborada uma curva padrão com concentrações.

3.1.1.4 Triagem e seleção das correntes elétricas

Para a triagem das correntes, grupos experimentais foram criados. Primeiro fixou-se a frequência variando as amperagens, descrito no passo 1. Ao todo foram testados um controle, grupo sem estimulação, e oito grupos experimentais, eletroestimulados, sendo um subgrupo de quatro com 1 Hz e outro subgrupo de quatro com 50 Hz. No passo 2, a tendência da produção de etanol de cada curva foi avaliada. No passo 3, a corrente que apresentou melhor desempenho foi selecionada para os testes em 20L no passo 4 (Figura 2). A primeira frequência testada foi de 1Hz.

3.2 Etapa II – modelo cervejeiro

3.2.1 Esterilização e Sanitização dos Equipamentos

Na etapa I todos os reatores antes do uso eram lavados com detergente neutro (Extran MA02 Merck®) a 1% e enxaguados com água destilada, em seguida os biorreatores foram autoclavados. Após o uso os reatores eram lavados e enxaguados com o detergente supracitado.

Na etapa II os reatores de polipropileno antes do uso eram lavados com solução detergente, enxaguados com água mineral e sanitizados com solução iodada Biofor®. Em seguida os biorreatores foram enxaguados com água 95°C. Após o uso, os reatores eram lavados e enxaguados utilizando os mesmos métodos.

3.2.2 Brassagem

Primeira etapa para da fabricação de uma cerveja é a mostura ou brasagem, que consiste em misturar grãos triturados maltados em água. Inicialmente foram utilizados 20 litros de água aquecidos até atingir 70°C. Após atingir essa temperatura foram acrescentados 7kg de malte e diminuída a temperatura até atingir 65°C, mantendo-a por 1 hora para a obtenção do extrato de malte (CARVALHO, 2007).

Após esse período, separou-se o extrato de malte em outro recipiente e os grãos foram lavados através do acréscimo de 25 litros de água e á 65°C. Esta

etapa é conhecida como lavagem dos grãos e tem uma duração de 12 a 15 minutos. As enzimas do malte ativadas durante a sacarificação foram inativadas por aquecimento à 78°C.

Em seguida esse processo, adicionou-se ao extrato de malte o extrato de grãos lavados. Esta nova solução denomina-se mosto cervejeiro não fermentado. Deste modo, para manter o padrão previamente definido, em casos de densidade inicial inferior à 1,050 sacarose foi adicionada para a correção deste parâmetro.

Em seguida, o mosto foi aquecido até atingir a fervura, mantendo-se nessa condição por 1 hora. Nesse intervalo de tempo foi adicionado 14 gramas de lúpulo, 7g no tempo 0 e mais 7g no tempo 30 minutos de fervura dando início a lupulagem, além disso foram usadas 2 pastilhas de clarificante (Whirlfloc T Clarificante Cerveja Artesanal) após 20 minutos de fervura. (Perozzi e Beaune 2019).

O resfriamento do mosto não fermentado foi realizado com o auxílio de um chiller de aço inox, com uma duração aproximadamente 1 hora. Após esse período, o mosto reduziu a temperatura de 100°C para 30°C.

3.2.3 Inóculo inicial e fermentação

Para o inóculo inicial foram utilizadas leveduras comerciais, *Saccharomyces cerevisiae* (Nottingham, LalBrew® Premium series, Lallemand®, Austria), na concentração de 0,55g/L. Após o resfriamento do mosto até a temperatura ambiente, as leveduras liofilizadas foram inoculadas na concentração supracitada.

Após a inoculação das leveduras o mosto permaneceu à temperatura ambiente por todo o processo. A fermentação foi considerada concluída quando a concentração de álcool se manter constante durante 48h, medindo através de um Densímetro de Massa Específica de 1,000 a 1,100 (precisão de 0,001).

Nesta etapa procedeu-se à aplicação da corrente elétrica a cada 24 horas durante toda a fermentação começando após o inóculo das leveduras. Assim no tempo 0 foi adicionado o inóculo e fez a primeira aplicação da corrente elétrica.

3.2.4 Contagem de células

As contagens de células de leveduras foram realizadas através de microscopia ótica com o auxílio de câmara de Neubauer (Lucarini, Adriana C.; Silva, La Da; Bianchi, Reinaldo Ac., 2004)

3.2.5 Sólidos Totais Dissolvidos (Brix)

A avaliação de Sólidos Totais Dissolvidos, Brix, foi determinada com o auxílio de um refratômetro. Para tanto, foram utilizados 700µL das amostras, que foram aplicadas cuidadosamente sobre o prisma para evitar formação de bolhas. Foi utilizado como branco, a água destilada.

3.2.6 Dosagem de glicose

Para a avaliação de glicose foi utilizado um glicômetro eletrônico (G-tech free). As tiras de teste foram utilizadas uma vez por ciclo e foram aplicados 50µL de amostra sobre cada tira com o auxílio de um micropipetador.

3.2.7 Aferição de bioetanol

Para calcular a quantidade de álcool no final da fermentação do mosto usasse a Fórmula de Hall, onde o percentual alcóolico é obtido pela diferença inicial e final das densidades multiplicado por uma constante. A densidade foi aferida com o auxílio de um densímetro analógico, calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{bioetanol} = (\text{densidade inicial} - \text{densidade final}) * 131,25$$

3.2.8 Avaliação de oxigênio dissolvido

Medidas de oxigênio dissolvido foram realizadas utilizando um aparelho multiparamétrico (sympHony, VWR Internatinal Radnor, PA 19087) com um eletrodo de referência (89231-624).

3.2.9 Avaliação do mosto fermentado por HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector)

A cromatografia foi realizada no equipamento Dionex ICS-3000 (Thermofisher, USA), equipado com colunas CarboPAC PA1 analítica e guarda e o sistema pós-coluna Dionex PC10 (todas as colunas são da marca Thermofisher, USA). As amostras foram diluídas 100x e injetadas e o protocolo

de corrida seguiu com eluição isocrática 5mM NaOH a 1mL/min pré-coluna, pós coluna foi adicionado solução de NaOH a 50mM a 1mL/min totalizando 27,5mM de NaOH a 2mL/min no detector amperométrico.

3.2.10 Avaliação estatística

Para determinação de eventual significância estatística foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Tukey na fase de triagem e seleção das correntes. Na fase de testes foi utilizado o teste T-student pareado. Todos os testes foram realizados com o auxílio do 'software' 'GraphPad Prism', além disso todos testes que apresentaram valor de 'p' menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Etapa I - Produtos obtidos no estudo

4.1.1 Produtos obtidos no estudo

4.1.1.1 Produto I - Confeção de Biorreatores

Foi necessário idealizar e elaborar protótipos de biorreatores capazes de eletromodular sistemas microbiológicos. Estes biorreatores, diferentemente dos convencionais, possuem eletrodos de aço inox, instalados na mesma câmara. Além disso, os protótipos construídos contam com entrada e saída de ar e pontos de coletas de amostras. Vale ressaltar que os reatores iniciais, de escala laboratorial com máximo de 200mL de volume apresentavam um caráter de limpeza fácil e esterilização em autoclaves (Figura 3).

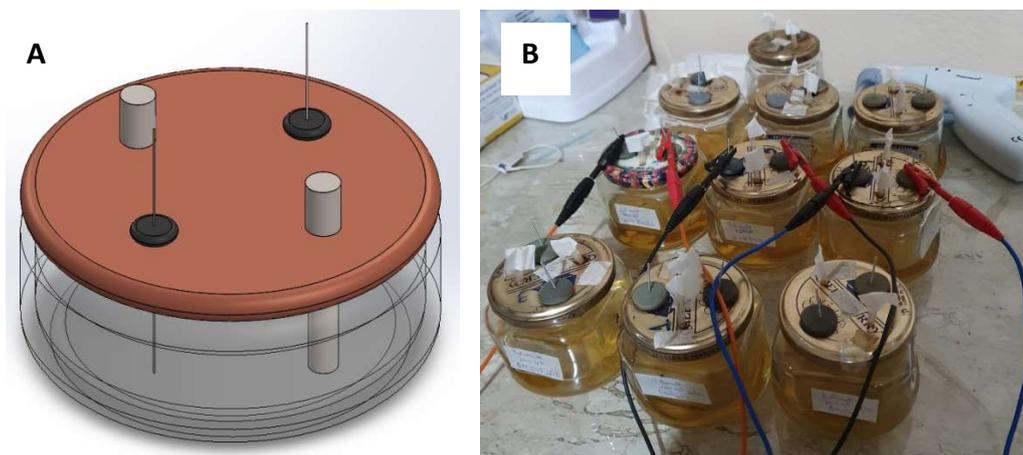


Figura 3: A) Projeto tridimensional do biorreator. B) Eletromodulação nos biorreatores de 90mL.

Fonte: Próprio autor, 2022.

A segunda versão dos protótipos, foram utilizados biorreatores encontrados no mercado cervejeiro, posteriormente adaptados para eletromodulação, com volumes máximos de 20L e própria para a produção de bebidas fermentadas, tal como a cerveja. Esta versão é capaz de produzir pequenas quantidades de bebidas, cerca de 80L/mês. O material foi o polipropileno, tornando assim os biorreatores compatíveis com produção de bebidas (Figura 4). Este biorreator, diferente do primeiro, não pode ser

autoclavado, por ser de polipropileno. Portanto, para sua sanitização são utilizados compostos iodados, como o Iodofor Biofor®.



Figura 4: Biorreator de polipropileno modificado.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Já na terceira versão, além do aumento de volume foi feita a outra mudança de material do biorreator, a fim de torná-lo mais próximo de um biorreator industrial. Deste modo, foi reformulando as dimensões para atender a capacidade de 100L e foi utilizado aço inox na estrutura (Figura 5).



Figura 5: A) projeto tridimensional do biorreator. B) biorreator confeccionado em aço inox 316L com capacidade máxima de 100L.

Fonte: Próprio autor, 2022.

4.1.1.2 Produto II – Protocolo de eletroestimulação

4.1.1.2.1 Triagem das correntes

Após a aplicação da corrente com 1Hz foi possível observar uma redução na produção de etanol pelas leveduras no tempo de 1 hora. O grupo experimental que apresentou a maior redução foi o grupo de 1Hz e 150 μ A (Figura 6). Por outro lado, as amperagens acima de 200 μ A não apresentaram diferenças em relação ao controle, o que não teve estímulo (Figura 6).

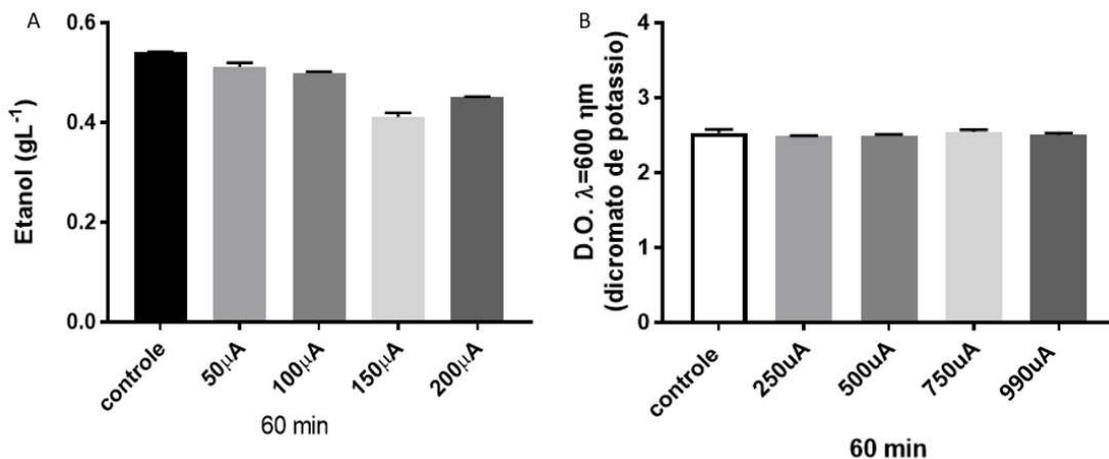


Figura 6: Produção de etanol nos diferentes grupos experimentais. A) produção de etanol utilizado correntes apresentavam 1Hz e amperagens que variaram de 50uA à 200uA e o grupo controle. B) produção de etanol utilizado correntes apresentavam 1Hz e amperagens que variaram de 250uA à 990uA e o grupo controle.

Após a aplicação da corrente com 1Hz, mesmo após 3 horas, foi possível observar uma redução na produção de etanol pelas leveduras. A diminuição na produção de etanol foi significativa, com $p \leq 0,0005$. O grupo experimental que apresentou a maior queda foi o grupo de 1Hz e 150μA (Figura 7).

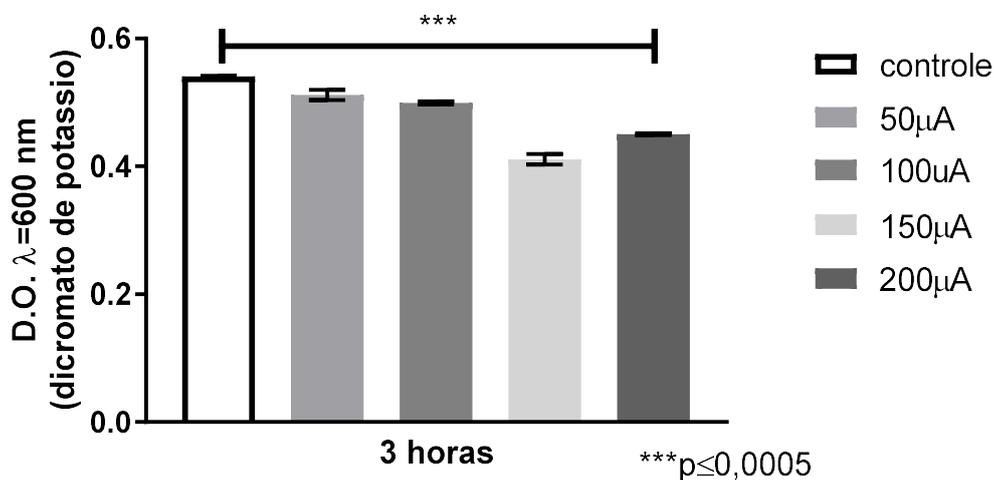


Figura 7: Determinação de etanol nos grupos experimentais, utilizando frequência de 1Hz e diferentes amperagens, e grupo controle. Revelando uma redução na produção de etanol. O grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos experimentais com $p \leq 0,0005$.

Por outro lado, quando utilizada a frequência de 50Hz foi observado um aumento na produção de etanol. Os grupos experimentais que apresentaram os maiores aumentos foram 750 μ A e 990 μ A. Sendo que o grupo de 990 μ A também foi maior que 750 μ A e estas diferenças foram significantes com $p \leq 0,0058$ e $p = 0,007$, respectivamente (Figura 8).

Assim esta corrente foi selecionada para a realização dos testes em biorreatores de 20L. É importante salientar que com este volume é possível produzir pequenas quantidades de bebidas fermentadas.

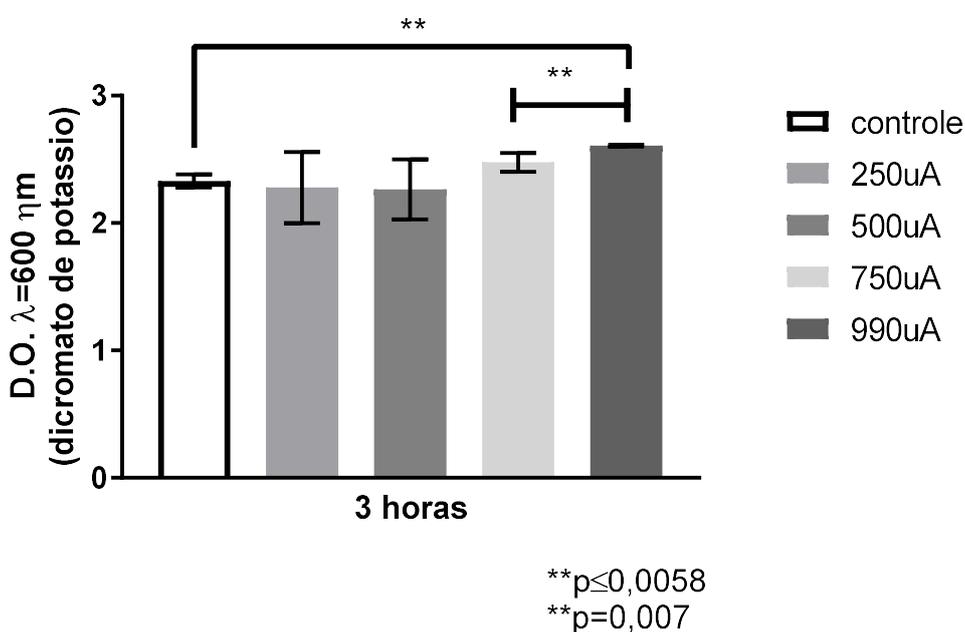


Figura 8: Determinação de etanol nos grupos experimentais, com 50Hz e diferentes amperagens, e grupo controle. O grupo 990 μ A apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, 250 μ A e 500 μ A com $p \leq 0,0058$ e em relação ao grupo 750 μ A com $p = 0,007$.

4.2 Etapa II – Modelo cervejeiro

4.2.1 Cinética de produção de etanol

Para a avaliação dos parâmetros durante os experimentos, inicialmente, foram realizadas cinéticas de produção de etanol até o fim da fermentação. Com estas cinéticas foi possível demonstrar que a maior diferença na produção de etanol e o menor tempo ocorre em 48 horas. Portanto, as coletas de pontos para

a avaliação de todos os parâmetros analisados foram realizadas neste período (Figura 9).

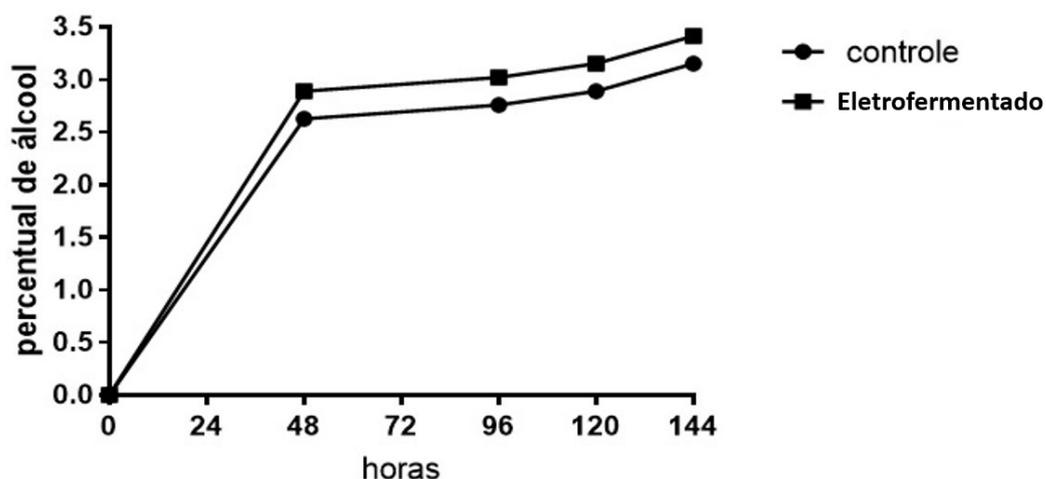


Figura 9: Cinética de produção de etanol do grupo controle e grupo eletrofermentado.

4.2.2 Contagem de células

Após 48 horas de fermentação as células em suspensão foram determinadas por microscopia ótica e o controle apresentou uma contagem 36% menor que o grupo eletrofermentado. Esta redução foi estatisticamente significativa e apresentou $p=0,0009$ (Figura 10).

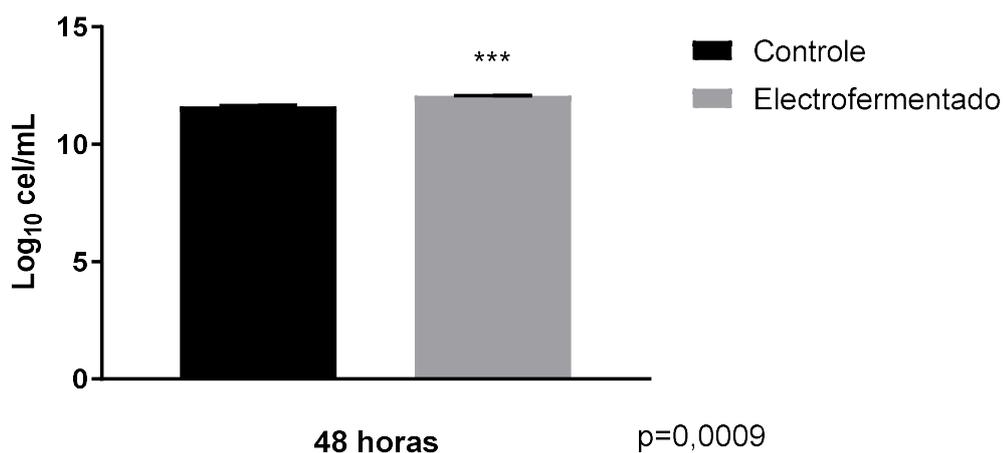


Figura 10: Concentração de células suspensas nos grupos controle e eletrofermentado.

4.2.3 Produção de etanol

A produção de etanol permaneceu dentro da faixa esperada para o estilo de cerveja produzido em ambos os grupos experimentais. Contudo o percentual alcoólico quantificado no grupo eletrofermentado foi cerca de 10% maior que no grupo controle. Esta diferença apresentou significância estatística com $p=0,0253$ (Figura 11).

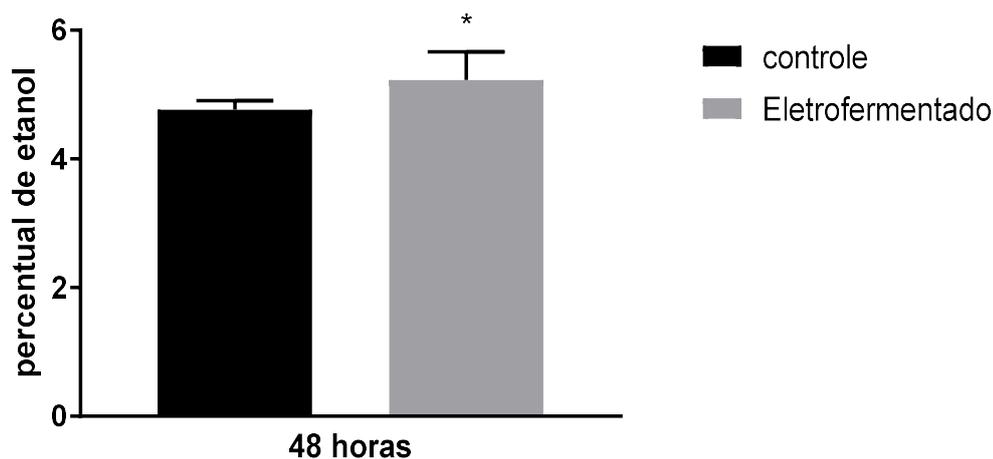


Figura 11: Percentual de etanol produzido nos grupos controle e eletrofermentado.

4.2.4 Brix

Os carboidratos totais presentes em cada grupo experimentais em 48 horas revelaram menor consumo no grupo eletrofermentado, entretanto esta diferença não apresentou relevância estatística. Além disso, este dado demonstra que aproximadamente metade de todos os carboidratos são consumidos nas primeiras 48 horas (Figura 12).

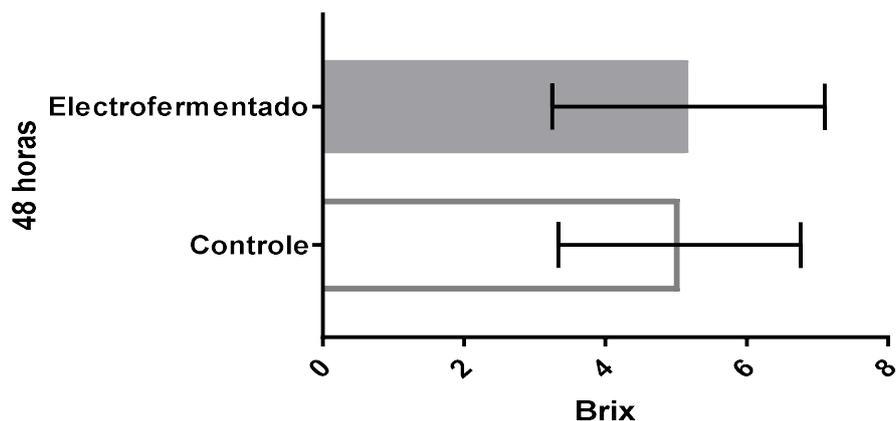


Figura 12: Carboidratos residuais presentes nos grupos controle e eletrofermentado.

4.2.5 Concentrações de glicose

A concentração de glicose diferente do perfil de carboidratos estava mais concentrada no grupo controle que no grupo eletroestimulado. Contudo, assim como no teste anterior não houve diferença estatisticamente significativa (Figura13). Vale ressaltar que os valores apresentados estão próximos ao *cut off* do aparelho usados nesta análise.

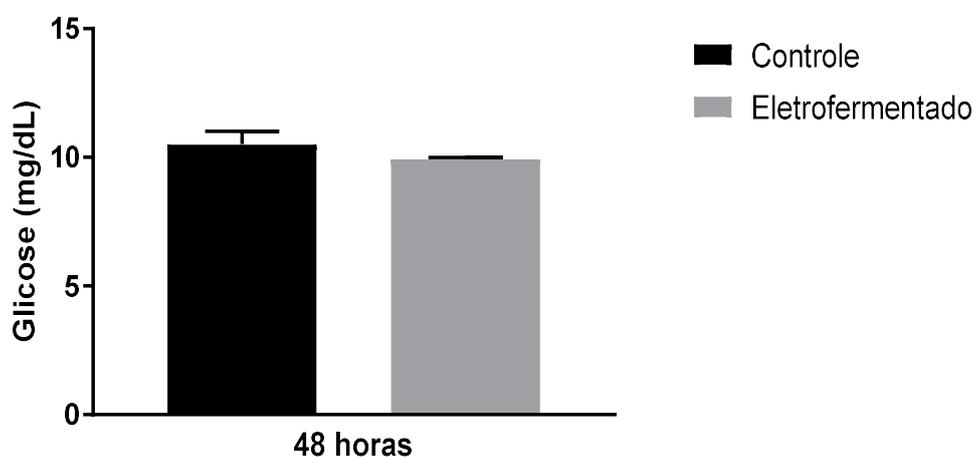


Figura 13: Concentração de glicose nos grupos controle e eletrofermentado.

4.2.6 Oxigênio dissolvido

A presença de oxigênio dissolvido é importante no tempo 0, contudo durante a fermentação esta concentração deve ser reduzida. Em 48 horas, demonstrou-se que a concentração de oxigênio reduziu em ambos os grupos. Contudo a concentração de O₂ no grupo eletrofermentado foi cerca de 30%

menor que no controle melhorando o meio suscetível para a fermentação (Figuras 14 e 15). Esta diferença apresentou significância estatística com $p=0,0007$.

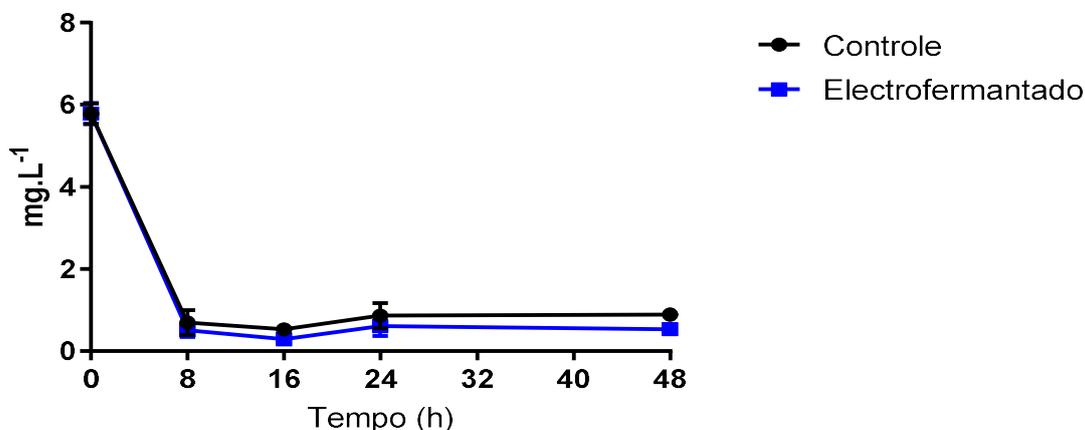


Figura 14: Cinética de oxigênio consumido durante fermentação na presença ou ausência de eletromodulação nos mostos cervejeiros

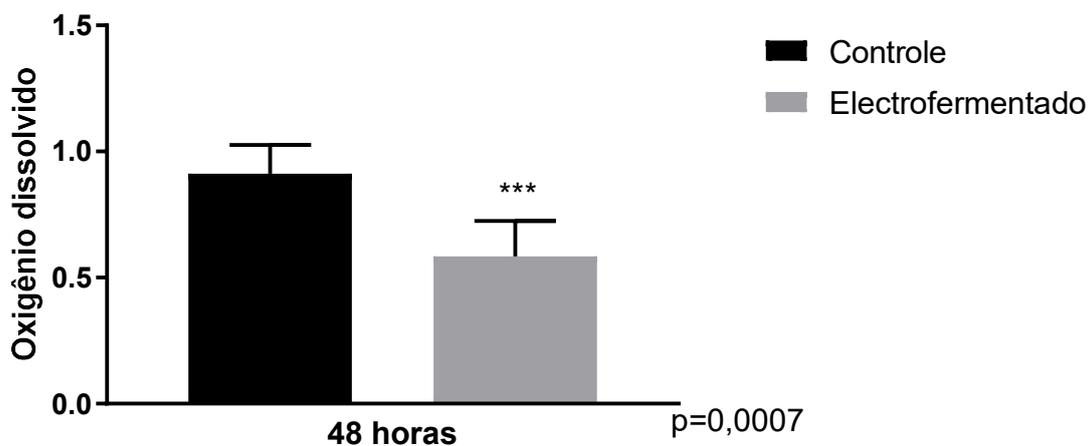


Figura 15: Concentração do oxigênio dissolvido nos grupos controle e eletrofermentado.

4.2.7 Cromatografia HPAEC-PAD

Para as avaliações cromatográficas foram usados quatro padrões: etanol (Figura 16), glicose e frutose (Figura 17), sacarose (Figura 18), cerveja produzida tradicionalmente (Figura 19) e cerveja produzida por eletroestimulação (Figura 20). No cromatograma é possível observar um pico mais intenso de etanol no grupo eletrofermentado que no grupo controle. Os picos de glicose mantiveram o padrão. Entretanto, na região entre o etanol e a glicose foram observados picos apenas no grupo controle.

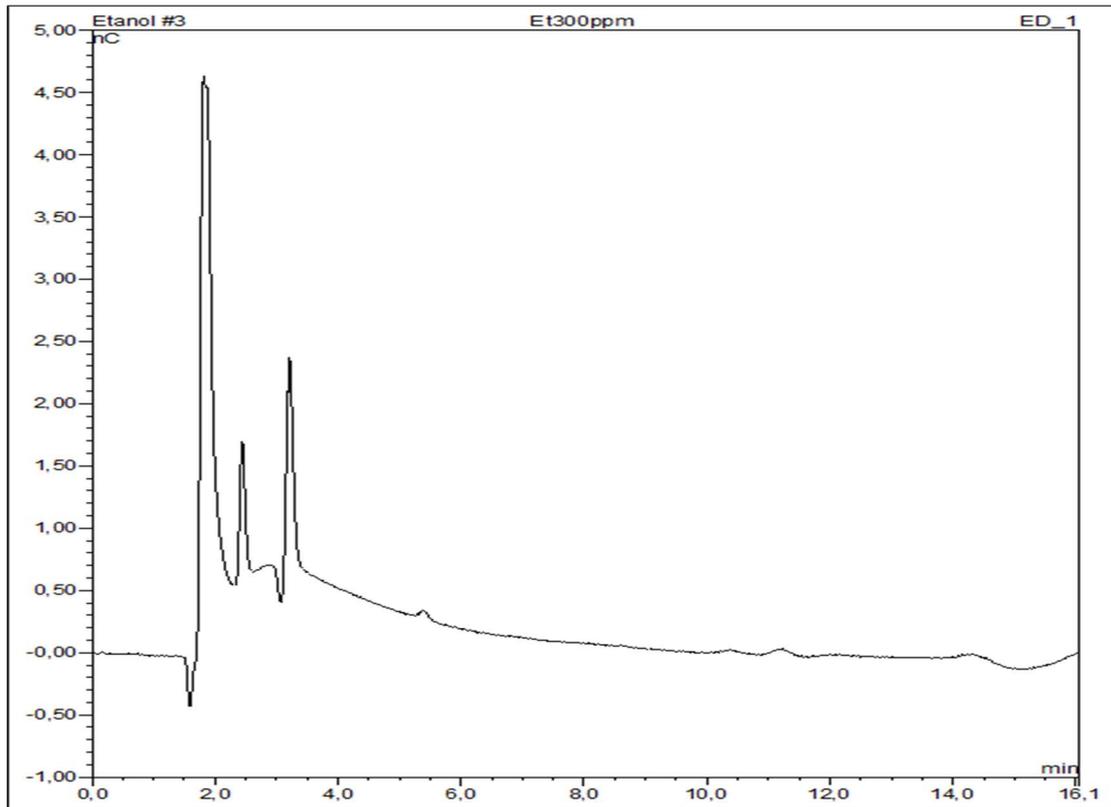


Figura 16: Perfil cromatográfico do padrão de etanol.

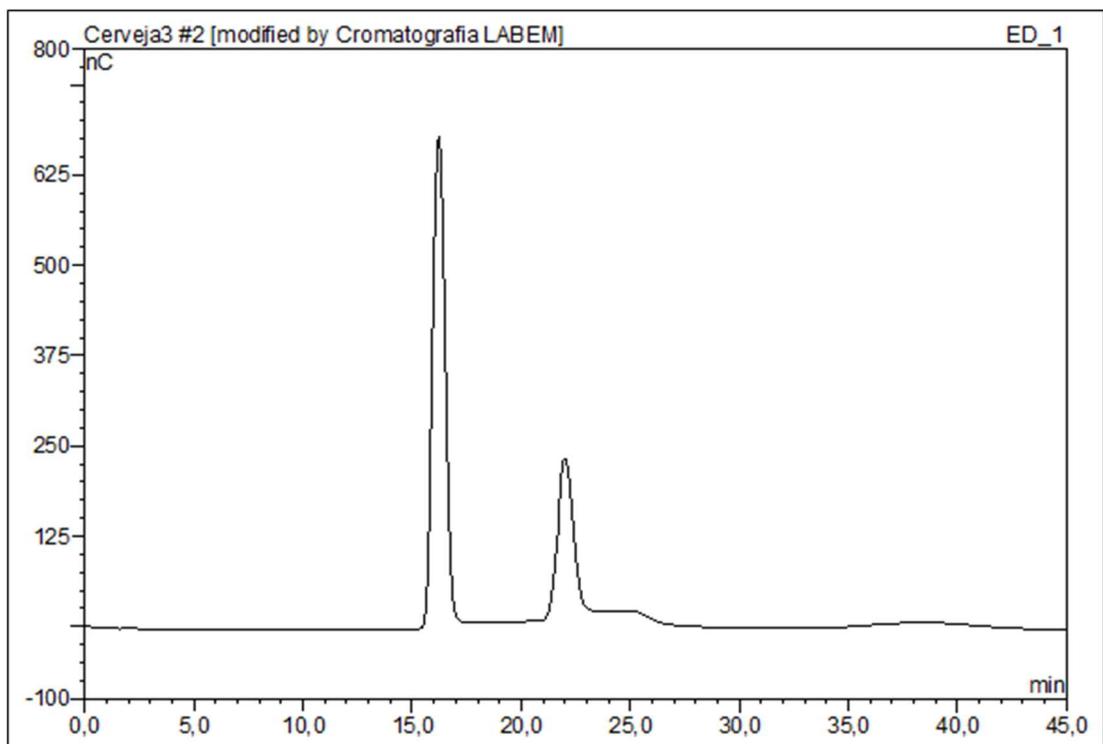


Figura 17: Perfil cromatográfico do padrão de glicose (pico da esquerda, 16 min.) e frutose (pico da direita, 22 min.).

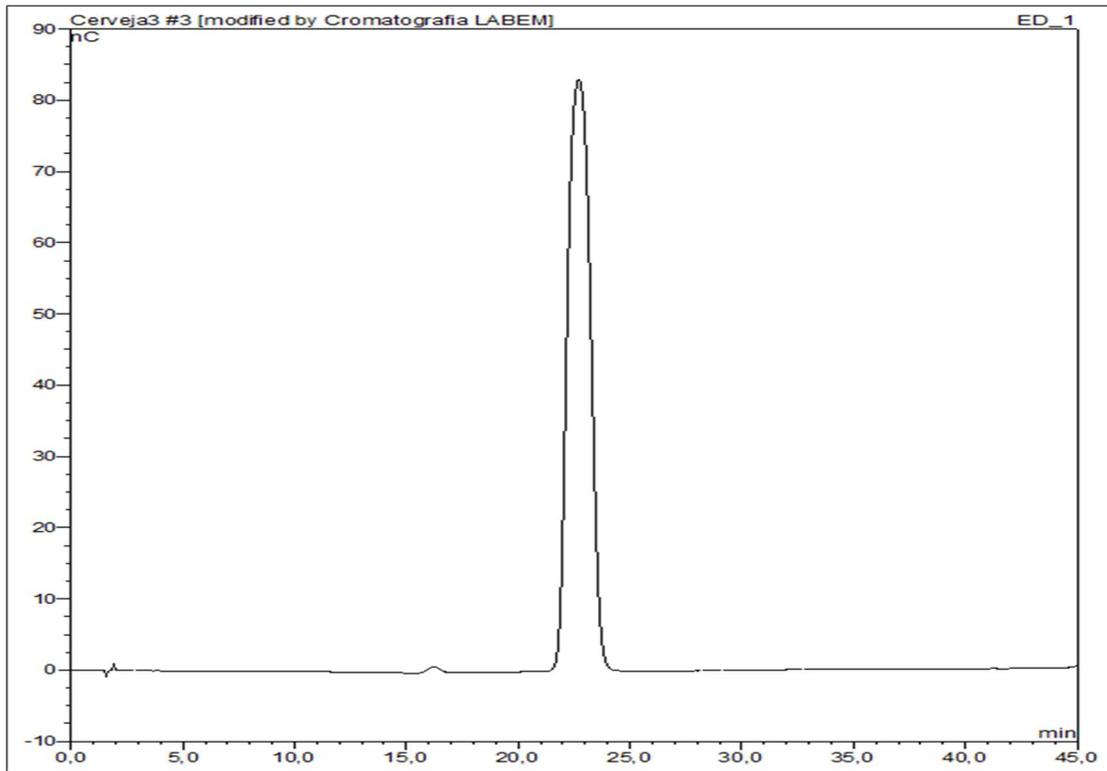


Figura 18: Perfil cromatográfico do padrão de sacarose.

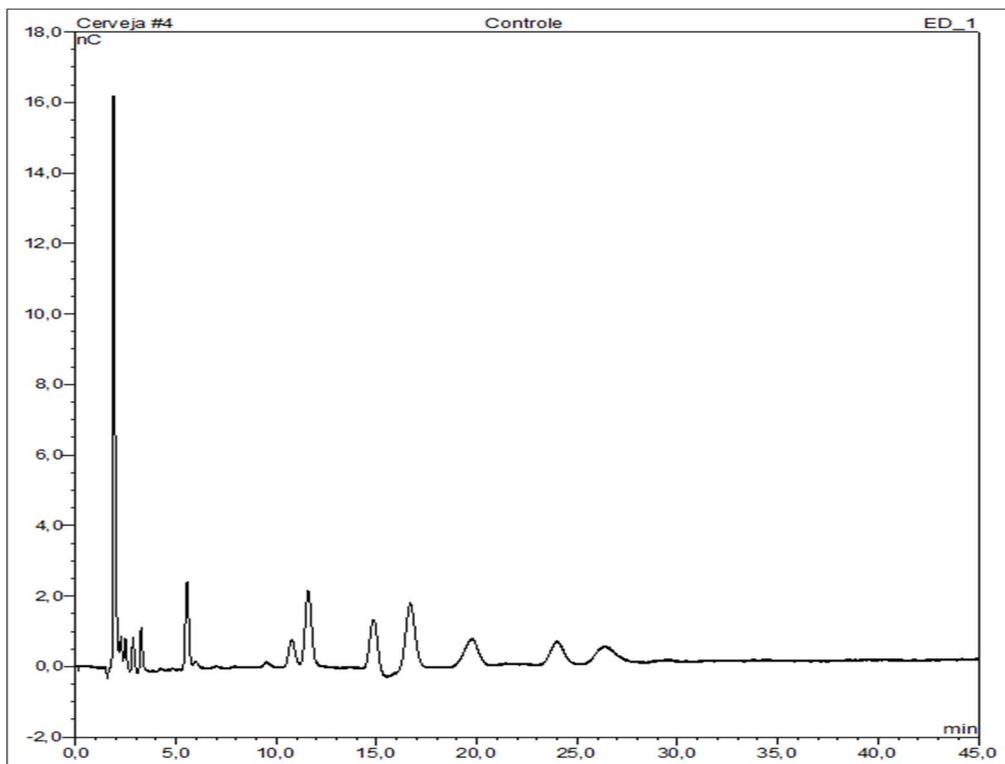


Figura 19: Perfil cromatográfico da cerveja produzida tradicionalmente.

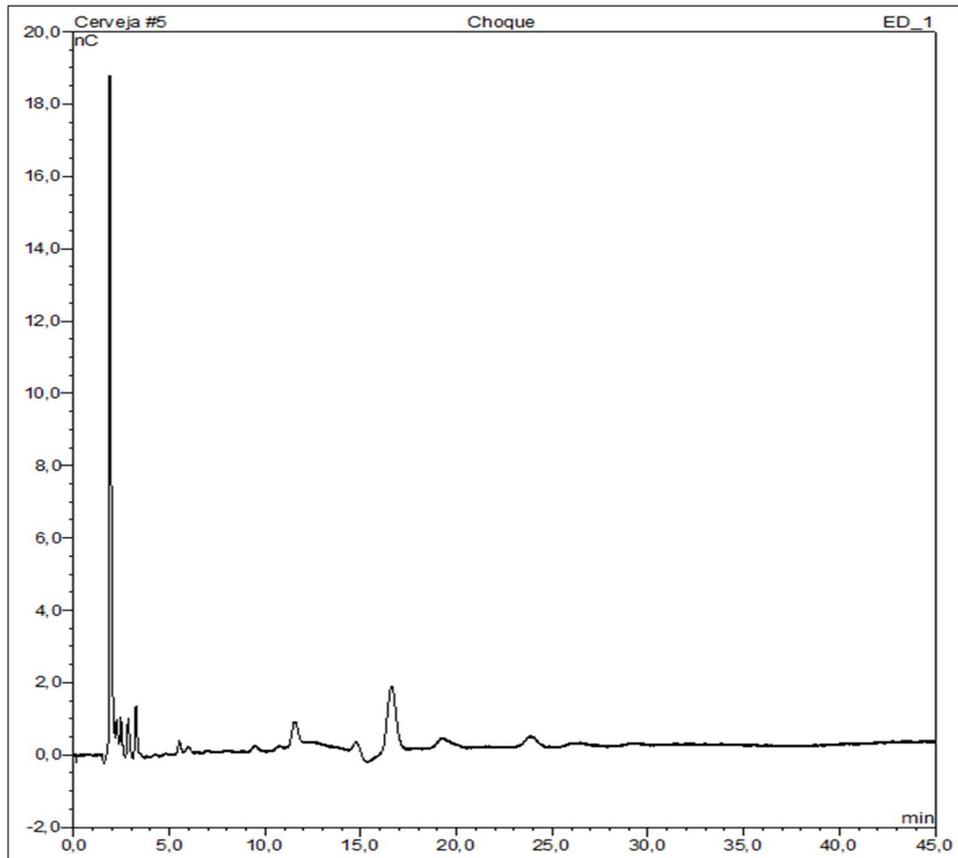


Figura 20: Perfil cromatográfico da cerveja produzida eletrofermentado.

Observa-se um comportamento cromatográfico similar nos dois tipos de cervejas, embora na Figura 19 do grupo controle notasse picos a mais do que na Figura 20 do grupo eletrofermentado.

4.2.8 Produto III - Patente

A patente foi elaborada com base nos resultados do estudo com colaboração do Laboratório Moura Costa (ICS/UFBA) e com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). O número do processo gerado foi pelo **INPI. BR 20 2021 013864 0 - Método de eletroestimulação por corrente alternada aplicado a bioprocessos para o aumento e melhoria das características funcionais da produção de bioativos, etanol e/ou bebidas.**

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 20 2021 013864 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 15180714000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110080

País: Brasil

Telefone: (71)32839097

Fax: (71)32839097

Email: inova@ufba.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 20 - Modelo de Utilidade (MU)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ALTERNADA APLICADO A BIOPROCESSOS PARA O AUMENTO E MELHORIA DAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS, ETANOL E/OU BEBIDAS

Resumo: A presente invenção trata de um método de produção de etanol e/ou obtenção de produto cervejeiro estimulado por corrente elétrica alternada, ou seja, formas de ondas individuais com características sinusoidais com retificação de meia onda e apresenta baixa intensidade, que invertem periodicamente a polaridade positiva e negativa, inversão a cada 3 segundos, na fermentação alcoólica por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, de forma a aumentar carga microbiana, a produção de etanol e fornecer características próprias ao produto cervejeiro.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: André Garcez Ghirardi

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 76670414820

Endereço: RUA BASÍLIO DA GAMA, Nº 6

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-040

Telefone: 713283-9095

Fax:

Email: inova@ufba.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/07/2021 às 14:07, Petição 870210063745

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: RODRIGO MIRANDA PIRES SANTOS

CPF: 03336992540

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua Cicero Simões, 119, apt 1201-Pituba

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 41830-475

País: BRASIL

Telefone: (71) 993 698045

Fax:

Email: mirandaps@hotmail.com

Inventor 2 de 7

Nome: GUSTAVO MIRANDA PIRES SANTOS

CPF: 02152779533

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: BA 099 km 7, Lauro de Freitas, condomínio Parque dos coqueiros Q1L9

Cidade: Lauro de Freitas

Estado: BA

CEP: 42710-120

País: BRASIL

Telefone: (71) 992 375315

Fax:

Email: gmpiresantos@hotmail.com

Inventor 3 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/07/2021 às 14:07, Petição 870210063745

Nome: JACSON NUNES DOS SANTOS

CPF: 00059143886

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua da Taquara, nº44, patamares

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 41680-044

País: BRASIL

Telefone:

Fax: (71) 987 993159

Email: Jacson.jns@gmail.com

Inventor 4 de 7

Nome: PEDRO JORGE LOURO CRUGEIRA

CPF: 74180991187

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Povoado do Barro Branco, Sítio Peter's Land S/N Imbassai Pequeno

Cidade: MATA DE SÃO JOÃO

Estado: BA

CEP: 48280-000

País: BRASIL

Telefone: (71) 992 203678

Fax:

Email: pedrocrugeira@yahoo.com.br

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/07/2021 às 14:07, Petição 870210063745

Nome: FABIO ALEXANDRE CHINALIA

CPF: 11622224841

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, nº 27 Vale do Canela,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-100

País: BRASIL

Telefone: (71) 991 786220

Fax:

Email: chinalia@hotmail.com

Inventor 6 de 7

Nome: JOSILENE BORGES TORRES LIMA MATOS

CPF: 93211317520

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, nº 27, Vale do Canela

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-100

País: BRASIL

Telefone: (71) 991 215451

Fax:

Email: josilenelimamatos@gmail.com

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/07/2021 às 14:07, Petição 870210063745

Nome: PAULO FERNANDO DE ALMEIDA

CPF: 13121502549

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, n° 27, Vale do Canela

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40110-100

País: BRASIL

Telefone: (71) 999 696939

Fax:

Email: pfatk@yahoo.com.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo Processo de Eletroestimulação.pdf
Reivindicação	Patente Reivindicacoes (1).pdf
Resumo	Patente resumo.pdf
Desenho	Patente Figuras (1).pdf
Procuração	Procuração (Ghirard).pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	page_012.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/07/2021 às 14:07, Petição 870210063745

RESUMO

**MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ALTERNADA
APLICADO A BIOPROCESSOS PARA O AUMENTO E MELHORIA DAS
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS, ETANOL
E/OU BEBIDAS**

A presente Invenção trata de um método de produção de etanol e/ou obtenção de produto cervejeiro estimulado por corrente elétrica alternada, ou seja, formas de ondas individuais com características sinusoidais com retificação de meia onda e apresenta baixa intensidade, que invertem periodicamente a polaridade positiva e negativa, inversão a cada 3 segundos, na fermentação alcoólica por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, de forma a aumentar carga microbiana, a produção de etanol e fornecer características próprias ao produto cervejeiro.

**MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO POR CORRENTE ALTERNADA APLICADO
A BIOPROCESSOS PARA O AUMENTO E MELHORIA DAS CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS DA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS, ETANOL E/OU BEBIDAS**

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de um processo de eletroestimulação do metabolismo microbiano, pela passagem de corrente alternada de baixa amperagem em meio líquido, durante a fermentação por levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[002] Mais particularmente a invenção refere-se ao processo de estimulação da *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ser utilizada qualquer cepa, no processo biofermentativo utilizando corrente elétrica alternada na faixa dos microamperes, de forma a otimizar a produção de etanol e produto cervejeiro.

[003] Mais especificamente o processo trata da utilização de formas de ondas individuais com características sinusoidais com retificação de meia onda e apresenta baixa intensidade, que invertem periodicamente a polaridade positiva e negativa, inversão a cada 3 segundos, na fermentação alcoólica por leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, de forma a aumentar carga microbiana, a produção de etanol e fornecer características próprias ao produto cervejeiro.

Fundamentos da invenção

[004] As células vivas desempenham uma ampla gama de processos de natureza eletroquímica, como na geração de ATP, a energia elétrica é armazenada sob a forma de energia química com os elétrons fluindo para o maior potencial. Naturalmente já existe uma relação íntima entre o comportamento eletrônico e as células.

[005] O estudo da interação de células microbianas com a corrente elétrica, eletromicrobiologia, abrange a otimização de bioprocessos catabólicos e fermentativos. Os fermentativos, no geral, são mantidos para a produção de bioativos de interesse para a indústria farmacêutica, petroquímica, de alimentos, entre outras (XIAO, Y., ZHAO, F., CHENG, H., eds. *Electrochemically Active Microorganisms*. Lausanne: Frontiers Media. 2018).

[006] A estimulação por corrente elétrica exógena provoca o aparecimento de um potencial elétrico através da membrana que depende da força do campo externo, forma e raio das células e propriedades específicas das membranas celulares. A modulação do potencial de membrana endógena por um campo externo influencia a estrutura e função das proteínas/bicamada lipídica e

vias metabólicas utilizadas (FOLOGEA, D.; VASSU-DIMOV, T.; STICA, I.; CSUTAK, O.; RADU, M. Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 46: 285- 287, 1998). Estudos realizados por Binnerger et al. (1997) demonstraram que o número de RNAs mensageiros específicos (mRNAs) se alterou em células da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, após exposição a um campo magnético (BINNINGER, D.M.; UNGVICHIAN, V. Effects of 60 Hz AC magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43: 83-89, 1997).

[007] Culturas de *S. cerevisiae* respondem a alterações das condições ambientais que estabelecem condições de estresse, como por exemplo: o limite nutricional, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, aeração, entre outras. A resposta normalmente se dá de forma sincronizada, em períodos simultâneos com as mudanças no meio, influenciando o tempo de divisão e a transição celular (SATROUTDINOV, A.D.; KURIYAMA, H.; KOBAYASHI, H. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 98: 261-268, 1992; HJORTSO, M.A.A.; NIELSEN, J. A conceptual model of autonomous oscillations in microbial cultures. *Chem. Engng. Sci.*, 49(8): 1083- 1095, 1994).

[008] O estresse promovido por um campo elétrico, também definido como estresse eletroquímico, apresenta vantagens industriais de não se adicionar produtos químicos e consequentemente eliminação das etapas de separação do produto e tratamento de resíduos. Apresenta a vantagem de uma dinâmica favorável visto não se estabelecerem fenômenos inerciais significativos (SRAVAN, J. S.; BUTTLIS, K.; SARKAR, O.; MOHANS, V. Electrofermentation: Chemicals and Fuels *In* Microbial electrochemical technology: Sustainable platform for fuels, chemicals and remediation. 2019. ed. MOHAN, S. V.; VARJANI, S.; PANDEY, A. Elsevier. United Kingdom.).

[009] Entre os processos que podem ser otimizados pela troca de elétrons, encontram-se os processos eletrofermentativos. Além destes podem ser citados processos de síntese tais como as sínteses de metano e ácidos graxos de cadeias curtas e médias, entre outras moléculas de caráter anfipático (KUMAR, R.; DAS, A. J. Rhamnolipid Biosurfactant: Recent Trends In Production And Application. Springer Nature Singapore Pte Ltd. Singapore, 2018).

[0010] Os microrganismos representam 85% das referências sobre produção de bioetanol, entre estes, destacam-se os fungos, principalmente quando refere-se a substratos lignocelulósicos. O

aumento do rendimento deste processo fermentativo é de suma importância, uma vez que a utilização deste combustível reduz os impactos ambientais, como a geração de resíduos e a diminuição da emissão de dióxido de carbono (MASSON, I. S.; COSTA, G. H. G.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Bioethanol production from sweet sorghum broth and sugar cane fermentation. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2015).

[0011] A aplicação de campos elétricos afeta diretamente a membrana plasmática promovendo pressão e acúmulo diferencial de cargas com conseqüente diminuição do potencial transmembrana, afetando a permeação através de canais iônicos, e interferindo nos momentos dipolares, podendo alterar a eletrostática e conformação através da indução de torque (MATTAR, J.; TURK M.; NONUS M.; LBOVKA N.I.; EL ZAKHEM H.; VOROBIEVE. Electro-stimulation of *S. cerevisiae* wine yeasts by pulsed electric field and its effects on fermentation capacity. *Bioelectrochemistry*.103:92-7. 2015).

[0012] Um dos principais mecanismos de ação da eletrossíntese, está relacionada ao balanço de NAD, que impacta diretamente sobre as concentrações de acetil-CoA. Deste modo, seguindo as vias metabólicas é possível aumentar a produção de acetato ou mesmo etanol, uma vez que as concentrações intracelulares de acetil-CoA aumentam. Portanto, é possível otimizar a produção de biocompostos utilizando processos de eletroestimulação microbiana (PANDIT A.V.; MAHADEVAN R. In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals. *Microbial Cell Factories*. 10:76, 2011).

[0013] A presente invenção desenvolve um método de eletroestimulação por corrente elétrica alternada capaz de estimular o bioprocessamento fermentativo, interagindo na membrana plasmática, proliferação celular e desenvolvendo vias metabólicas da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se um aumento da produção de etanol e concomitantemente fornecendo características organolépticas ao produto cervejeiro obtido.

Técnica relacionada

[0014] A partir da realização de buscas de anterioridade verificou-se que a patente de número BR 102016007240-9 A8 de 31/03/2016 refere-se a um processo empregado na recuperação do desempenho muscular de pacientes em geral, mais especificamente, de praticantes de atividades físicas e atletas, o processo prevendo a aplicação seriada de pulsos elétricos, de forma transcutânea, cujo protocolo prevê as seguintes fases de eletroestimulação: fase de vasodilatação, fase de

recuperação e fase de desconstrutura. No entanto, o processo supracitado refere-se à estimulação muscular envolvendo um sistema multicelular, não se tratando da estimulação microbiana, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e consequente aumento de produção de álcool.

[0015] A patente de número FR2579627A1 de 29/03/1985 descreve o processo de eletrossíntese de alcoóis por redução eletroquímica de halogênios orgânicos na presença de derivados de carbonil em um meio orgânico contendo um eletrólito indiferente. Apesar da invenção se basear na utilização da corrente elétrica para a síntese de alcoóis, não abrange a utilização do método de eletroestimulação microbiana em um processo fermentativo.

[0016] A patente de número CN102491516A de 25/11/2011, método de invenção empregando microrganismos eletrocatalisados e intensificados para redução e oxidação de águas residuais difíceis de serem biodegradadas e acoplado uma tecnologia de filtração por membrana. O método descrito utiliza corrente contínua e não corrente alternada, e um reator composto por uma área anaeróbica com placa negativa e uma outra aeróbia com TiO₂ / filme de carbono com eletrodo positivo, trata-se de um processo de eletrocatalise e não de um método de eletroestimulação microbiana em uma única câmara, por outro lado, o objetivo é tratar águas residuais e não a otimização do método fermentativo.

[0017] A patente de número PI 1005279-8 A2 de 29/12/2010, reivindica a utilização de fontes de luz ou Lâmpadas Fluorescentes, como forma de acelerar o processo de fermentação do mosto cervejeiro, que posteriormente irá se transformar em cerveja ou chope, ficando apto para o consumo, diminuindo assim o tempo de produção, diminuindo também o custo de produção e aumentando a capacidade produtiva. O processo descrito utiliza a emissão de luz para acelerar a via fermentativa, enquanto este pedido de invenção utiliza-se a corrente elétrica alternada para ativar intermediários metabólicos microbianos que irão otimizar a produção de álcool e fornecer características próprias ao produto final cervejeiro.

Sumário da invenção

[0018] A requerente descobriu que ao aplicar uma corrente alternada na faixa de microamperes durante a fermentação alcoólica pela levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, é possível aumentar a produção de etanol, bem como alterar propriedades organolépticas do produto cervejeiro, diminuindo os custos do bioprocessos.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 mostra concentração de etanol produzido em 48 horas de fermentação nos mostos controle e eletrofermentado (50Hz, 990uA, por 30minutos). *p< 0.05

A Figura 2 mostra a concentração de oxigênio dissolvido em 48 horas nos mostos controle e eletrofermentado (50Hz, 990uA, por 30minutos). *p< 0.05

A Figura 3 mostra o rendimento de etanol obtido, em 48 horas, nos mostos controle e eletrofermentado (50Hz, 990uA, por 30minutos). *p< 0.01

A Figura 4 mostra a produtividade de etanol, em 48 horas, nos mostos controle e eletrofermentado (50Hz, 990uA, por 30minutos). *p< 0.05

A Figura 5 mostra a concentração de células em suspensão, em 48 horas nos mostos controle e eletrofermentado (50Hz, 990uA, por 30minutos). ****p< 0.0001

A Figura 6 mostra os Cromatogramas obtidos com a coluna CarboPac PA1. A) Cromatograma padrão de etanol. B) Cromatograma padrão de glicose e Frutose. C) Cromatograma padrão de sacarose. D) Cromatograma de cerveja produzida através de fermentação convencional. E) Cromatograma de cerveja produzida através de eletrofermentação.

Descrição detalhada da invenção

[0019] O processo de produção de etanol e a produção de bebidas alcoólicas fermentadas possui um número 6 etapas. Assim na etapa 1, conhecida como brassagem ou mosturação, onde é preparada a solução de carboidratos fermentáveis. Podem ser utilizados diferentes grãos para a produção de bebidas, tais como grãos maltados e não maltados (cevada, trigo, arroz, sorgo, milho, entre outros), porém também podem ser utilizadas outras fontes de carboidratos como extrato de cana-de-açúcar, beterraba, batata ou mesmo sacarose industrializada. Nesta etapa podem ser realizadas diferentes rampas de mosturação, com temperatura entre 47°C-78°C por tempos de aquecimento que podem variar de 1-3 horas. A etapa 2, fervura e lupulagem (para a cerveja), onde a solução de carboidratos (mosto) é mantida entre 85°C a 115°C por 1 hora e o lúpulo adicionado, a lupulagem pode variar de acordo com o estilo de cerveja a ser elaborado.

A etapa 3 Whirlpool, onde o sedimento de lúpulo é decantado e o mosto resfriado, a temperaturas abaixo de 37°C. Na etapa 4 ocorre a fermentação efetuando-se a eletromodulação a cada 24 horas, as leveduras são inoculadas no mosto são eletromoduladas por um emissor de microcorrentes alternadas, por frequências que variam entre 1Hz e 600Hz, e amperagem entre 10-1000uA. A corrente pode ainda estar nas modulações polarizadas ou não polarizadas. Durante esta etapa o etanol é produzido, quantificado por densidade (alcoólímetro) e o mesmo pode ser extraído por destilação. Na produção cervejeira poderá ocorrer a etapa 5, constituída pela maturação e clarificação, onde o mosto fermentado é resfriado entre 0-4° C por 4-10 dias para a redução de sedimentos (opcional). Etapa 6 envase e carbonatação (passiva ou ativa), na carbonatação passiva a cerveja é gaseificada com a introdução de CO₂, enquanto na carbonatação ativa adiciona-se uma solução de 0,4-4 g/L de sacarose no processo de envase para a produção de CO₂ pela *Saccharomyces cerevisiae*, durante 4 e 7 dias.

Exemplos de concretização da invenção (descrição específica da metodologia e resultados obtidos)

[0020] Para execução da eletroestimulação das leveduras foram preparados mostos cervejeiros. Estes mostos foram preparados utilizando grãos maltados de cevada, que foram inseridos em água filtrada à 71°C. Após a inserção do malte na água a temperatura foi reduzida para 65°C, esta temperatura foi mantida por 1 hora. Após este período, a temperatura foi elevada a 78°C por 10 minutos e em seguida, na etapa de lupulagem a temperatura foi elevada a 100°C por uma hora. Vale ressaltar que existem outras formas de brassagem, que envolvem diferentes rampas de temperaturas que podem ser utilizadas para a produção de mosto, estes tipos de rampas de brassagem podem alterar o perfil de carboidratos fermentáveis do mosto, portanto devem ser considerados antes da produção da cerveja.

[0021] Após a etapa de lupulagem existe a etapa de "wirpool" que consiste na formação de um vórtice, por um período de 3 minutos, no mosto para a redução de sedimentos de lúpulo na cerveja. Em seguida o mosto livre de sedimentos de lúpulo é aerado, com o auxílio de um sistema de recirculação, e tem sua temperatura reduzida a pelo menos 37°C.

[0022] Nesta temperatura (37°C) foram inoculadas as leveduras. Para as produções dos fermentados foram utilizadas leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, comerciais liofilizadas, cada sachê continha 11g. Para cada 10L de mosto foram utilizados 11g de leveduras liofilizadas.

[0023] Após homogeneizar o mosto contendo a cultura microbiana foi realizada a primeira aplicação da corrente elétrica em microamperagem. Nos ensaios de eletromodulação utilizaram-se aparelhos emissores de microcorrente (corrente alternada, de baixa intensidade) com frequência de 50 Hz e intensidade de corrente de 990µA, durante 30 minutos. Este estímulo foi realizado uma vez a cada 24 horas durante um período de 96 horas, sendo que o tempo padrão para fermentação no processo convencional é de 120 horas. O primeiro estímulo ocorreu no tempo 0 horas, sendo realizados 5 estímulos.

[0024] A avaliação destes estímulos se deu através da aferição da densidade do meio, por auxílio de um densímetro analógico. A densidade foi aferida a cada 24 horas, nestas análises foram retirados 100mL de amostra e os mesmos foram reservados em proveta. Em seguida o densímetro, sanitizado com álcool 70%, foi inserido na solução e gentilmente o mesmo foi rotacionado para que a densidade fosse anotada. Deste modo a concentração de etanol foi determinada pela seguinte fórmula matemática:
*Concentração de etanol = (densidade inicial – densidade final) * 131,25*

[0025] Outras medidas como oxigênio dissolvido (OD), condutividade, pH, pEh, foram realizadas usando um aparelho multiparamétrico (sympHony, VWR Internatinal Radnor, PA 19087) com os eletrodo de referência (89231-586, 89231-624 e 89231-618), Grau Brix foi obtido através da observação de 700uL em refratometro analogico. Para a determinação da concentração de glicose utilizou-se um glicômetro eletrônico (G-tech free). Para tanto, tiras teste serão utilizadas uma vez por teste e serão aplicados 50 µL de amostra sobre cada tira com o auxílio de um micropipetador.

[0026] O produto final foi analisado por cromatografia no equipamento Dionex ICS-3000 (Thermofisher, USA), equipado com detector PAD140 e sistema pós-coluna Dionex PC10 (Thermofisher, USA). Com eluição isocrática 5mM NaOH a 1ml/min pré-coluna, pós-coluna solução de NaOH a 50mM a 1ml/min totalizando 27,5mM de NaOH a 2ml/min

no detector amperométrico. A análise cromatográfica permitiu observar a composição dos açúcares presentes e perfil de etanol produzido e os impactos da estimulação elétrica na composição do produto.

[0027] Demonstrou-se experimentalmente que as diferenças encontradas entre os grupos controle e tratados eram obtidas nas primeiras 48 horas. Após este tempo as diferenças entre os grupos tratados e controle basicamente se mantinham.

[0028] Com estes estímulos foi possível aumentar a concentração de etanol no meio, quando comparamos os grupos controle e tratados com a corrente elétrica. Vale ressaltar que a qualidade e quantidade dos açúcares disponíveis para fermentação, bem como a temperatura da fermentação também podem influenciar no processo.

[0029] Um ponto importante neste processo foi que os grupos estimulados reduzem a concentração de oxigênio dissolvido mais rapidamente que os grupos controle, além de apresentar concentrações de oxigênio dissolvidos menores que os grupos controle durante todo o processo. Este fato pode se associar à maior eficiência fermentativa descrita anteriormente, uma vez que a fermentação ocorre em anaerobiose.

[0030] É importante salientar que no caso da produção de cervejas altas temperaturas na fermentação, geralmente, são acompanhadas pela esterificação acentuada de componentes do meio, gerando portanto "off flavors" (sabores relacionados ao estresse das leveduras e/ou desagradáveis ao paladar). A presença de esterificação acentuada, no entanto, como característica negativa, só foi percebida nos grupos controle. Assim foi possível, através da eletrofermentação com microcorrentes, produzir uma bebida alcoólica com maior teor de etanol e menores quantidades de "off flavors".

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL caracterizado por compreender as seguintes etapas:

Etapa A – Preparação de meio de produção a partir de diferentes fontes de carboidratos, tais como grãos maltados e não maltados, sacarose, dentre outros;

Etapa B – Preparo de inóculo microbiano e inoculação de microrganismos em meio de produção utilizando a cepa *Saccharomyces cerevisiae*;

Etapa C – Aplicação de corrente elétrica alternada no meio de produção contendo a levedura;

Etapa D – Extração de etanol por destilação do meio fermentado e posterior resfriamento do material evaporado para do etanol condensação.

ETAPA E – Maturação e clarificação do mosto fermentado;

ETAPA F – Adição de CO₂ no mosto fermentado.

2. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa C de eletroestimulação ocorrer por corrente alternada de frequência 1-600Hz e microamperagem 10-1000uA no meio de produção contendo a levedura.

3. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa C do processo de produção ocorrer em biorreator, frascos Erlenmeyer ou matrizes microbianas imobilizadas.

4. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a Etapa D, ser opcional, do processo de produção para obtenção de produto não cervejeiro, tal como etanol ou bebida destilada.

5. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa D do processo de destilação ocorrer em temperatura de 60°C a 90 °C, sendo a temperatura ótima de 78,4 °C.

6. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa E ser opcional para obtenção de produto cervejeiro.

7. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa E do processo de maturação e clarificação do mosto fermentado por resfriamento, 0-6°C, até por 120 horas.

8. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a Etapa F podendo ser passiva, carbonatação forçada, pela adição de CO₂ comprimido a uma pressão 0.5-1,5 Kg/cm², enquanto a carbonatação ativa adiciona-se uma solução Primer, com concentração de 0,4-4 g/L de sacarose, ao mosto para após 96-144 horas haver formação de CO₂ na cerveja.

9. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com reivindicação 2 caracterizado por maior produção de etanol e levedura em suspensão.

10. MÉTODO DE ELETROESTIMULAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, de acordo com reivindicação 2 caracterizado por eletroestimulação pode ser utilizado em processo de fermentação em batelada quanto em processo de fermentação contínua.

11. FORMULAÇÃO CERVEJEIRA PARA ALIMENTAÇÃO caracterizada por consistir uma solução etanólica contendo maior teor alcoólico.

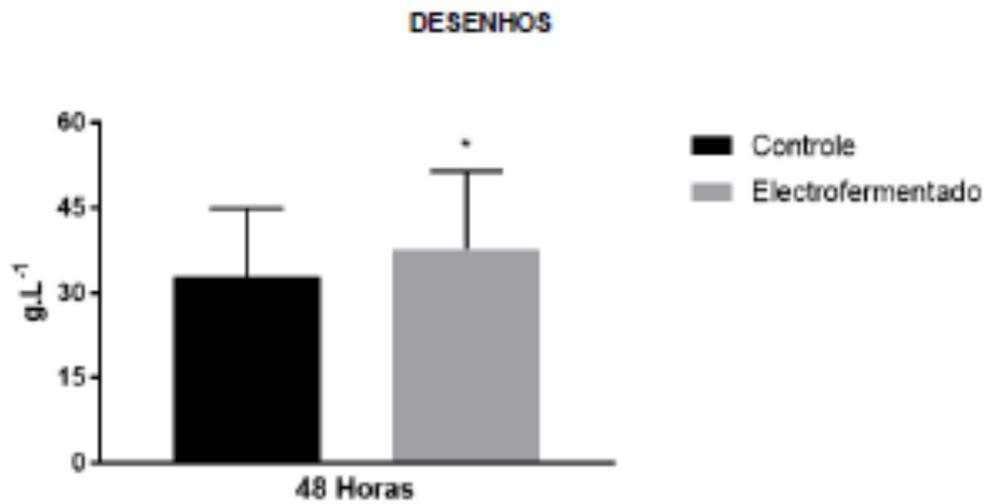


Figura 1

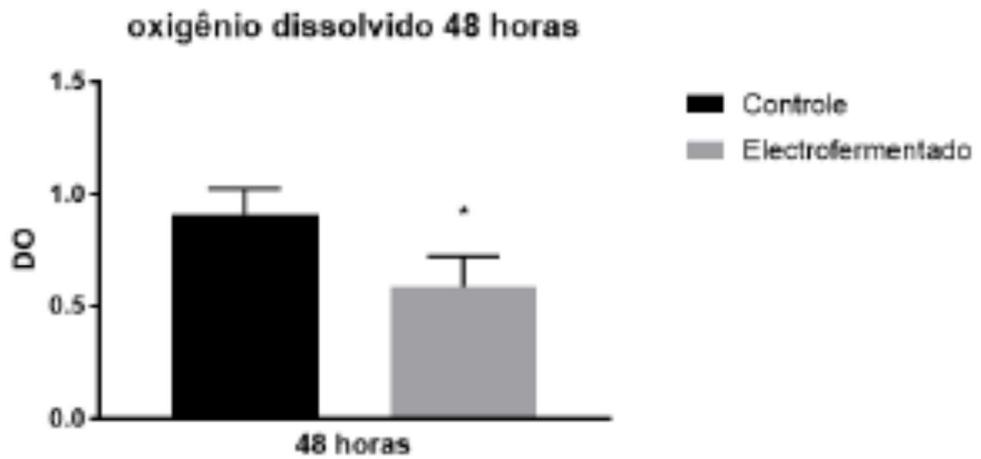


Figura 2

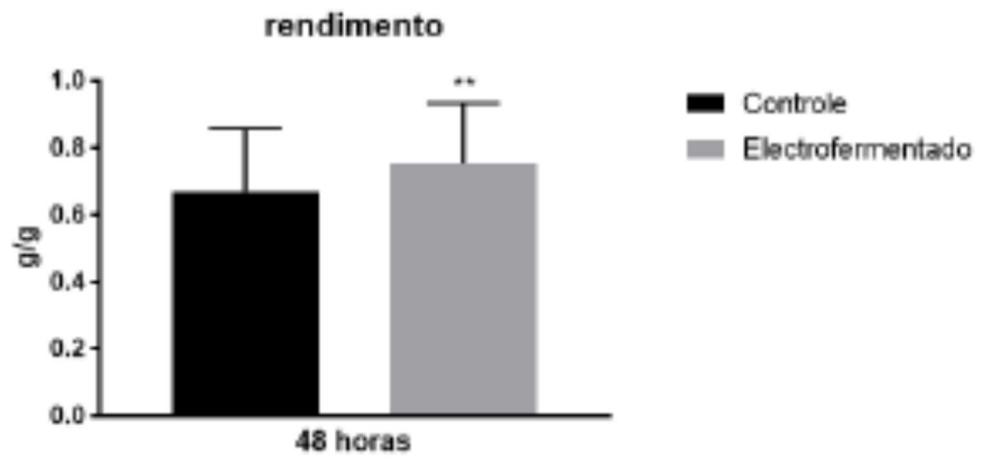


Figura 3

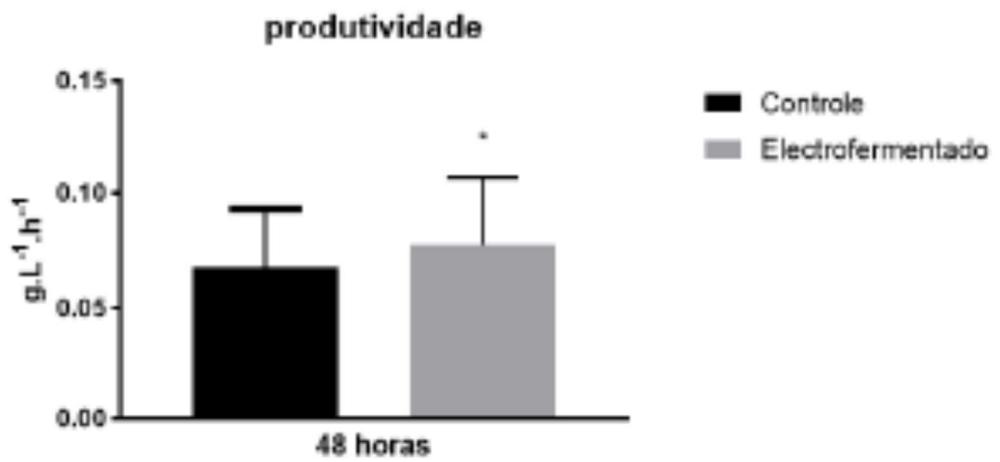


Figura 4

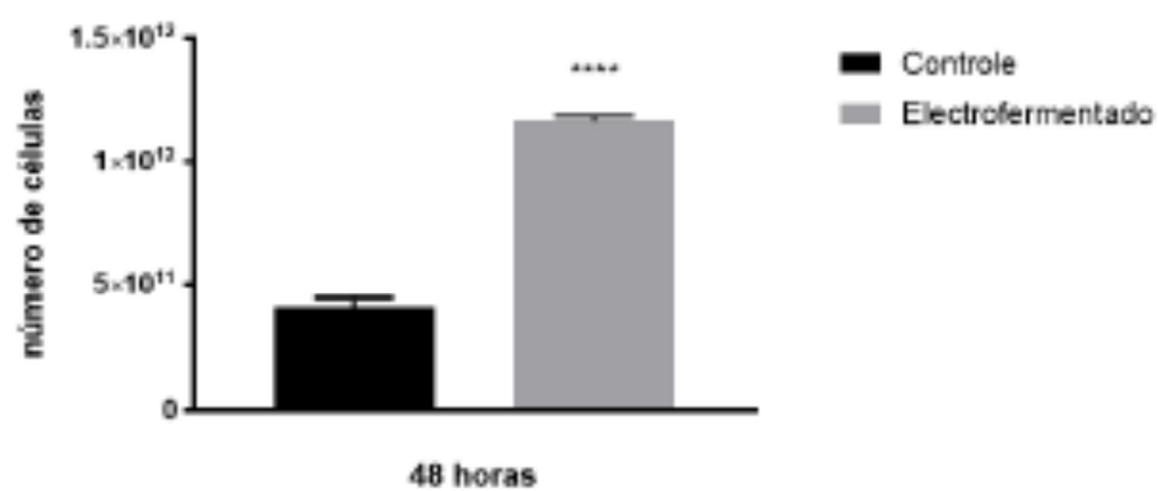


Figura 5

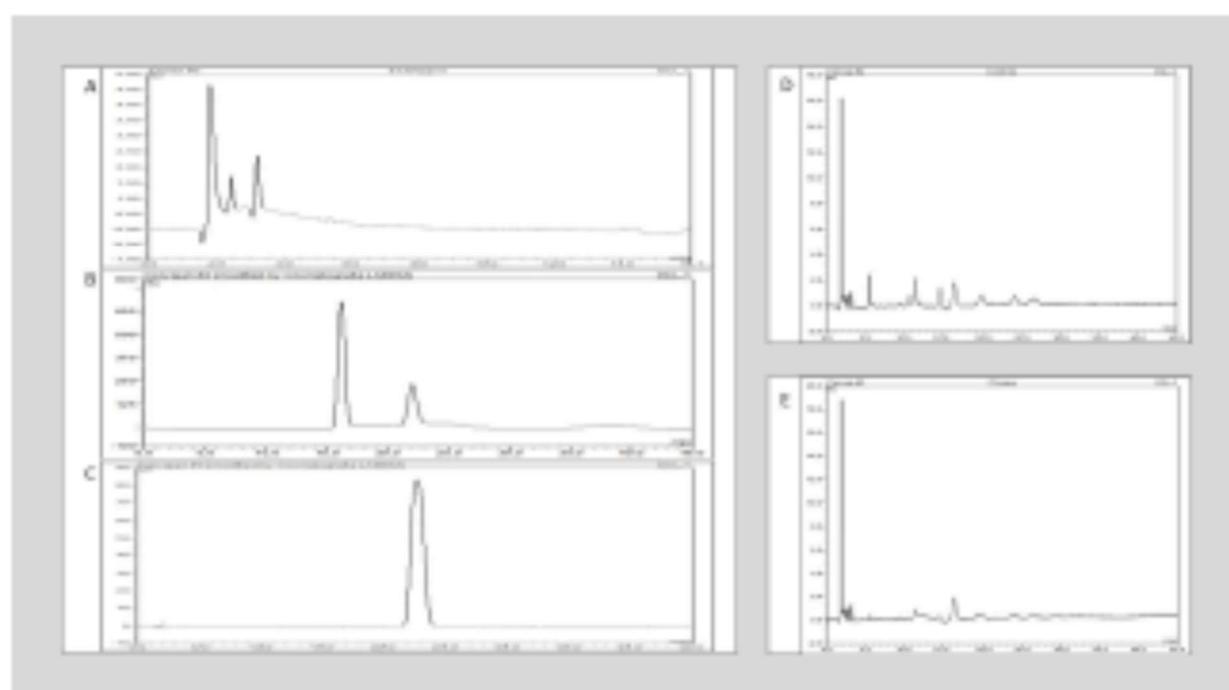


Figura 6

4.2.9 Avaliação preliminar do protótipo III

Nessa etapa, o protótipo III, de inox 316L com capacidade total de 100L, foi testado. Esses testes revelaram similaridade entre as fermentações eletroestimuladas usando o protótipo II modificado (dados não mostrados).

5. DISCUSSÃO

A *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucarioto unicelular com rápida divisão sendo considerado um organismo modelo para estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos (Hartwell, 1974). Essa levedura também é o microrganismo preferido na produção de bioetanol a partir de biomassa devido sua melhor capacidade produtiva (Bovo *et al.*, 2014). Por isso, esta levedura foi utilizada como modelo de produção neste estudo.

Tendo em vista a capacidade produtiva de bioetanol de *S. cerevisiae* e as diferentes aplicações nas indústrias de alimentos e bebidas associados à escassez e aumento do preço do petróleo bruto que reforça a necessidade de busca de fontes alternativas de energia, de modo que a otimização do processo produtivo se torna importante (El Sayed e Ibrahim, 2016).

A modulação metabólica destes fungos pode ser alcançada através de indutores físicos, como correntes elétricas e campos eletromagnéticos. Estes indutores têm como objetivo inibir ou estimular sistemas biológicos (Bodewein *et al.*, 2019). Deste modo, demonstrou-se neste estudo que correntes com intensidades e frequências diferentes podem produzir resultados diferentes sobre o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* (Figuras 7 e 8).

Dentre os principais efeitos da aplicação de microcorrentes em células eucarióticas estão o aumento de ATP e o aumento do aporte nutricional, tal como o aporte de aminoácidos. Estes fatores induzem um aumento na síntese proteica, mesmo isoladamente (Cheng *et al.*, 1982). Estes efeitos podem explicar o aumento no metabolismo demonstrado neste estudo.

Vale ressaltar que a amperagem não é o único fator impactante no processo de estimulação. Assim outros fatores, como o tempo, foram citados por Cheng e colaboradores (1982), e a frequência da corrente, como demonstrado no presente estudo, podem impactar também no resultado. Portanto, assim como correntes elétricas com amperagens maiores que 1000 μ A podem gerar eletrólise no meio e inibir a proliferação celular, correntes elétricas com frequências diferentes também podem gerar efeitos distintos, tais como os supracitados (Cheng *et al.*, 1982).

Corroborando com Nakanishi (1998), a aplicação de correntes elétricas pode estimular a multiplicação celular de *Saccharomyces*, bem como da produção de etanol (Figuras 8 - 11). No caso do referido autor foram utilizadas correntes contínuas e alternadas com intensidades em miliamperagem, enquanto o presente estudo apresenta protocolos onde foram aplicadas apenas correntes alternadas em microamperagem.

As correntes elétricas com 1Hz podem ser usados em processos de biomodulação por aumentarem o ATP celular. Enquanto correntes elétricas com 50Hz é usada na biomodulação por alterar o potencial de membrana (Arantes *et al.*, 2018). Desde modo hipotetizamos que por agir na produção direta de ATP a corrente elétrica com 1Hz depende de O₂ para atuar, visto que a principal via de produção de ATP é a fosforilação oxidativa. Enquanto, as correntes com 50 Hz podem atuar de modo mais efetivo no aumento do aporte nutricional. Por isso, com taxas baixa de O₂ a fermentação pode ser estimulada pelas correntes elétricas de 50Hz.

Vale salientar que nas produções utilizando correntes contínuas comumente são usados biorreatores com duas câmaras. Enquanto que nas produções com correntes alternadas é possível trabalhar com biorreatores de câmara simples. Esta possibilidade se dá devido a incapacidade da corrente alternada em formar cloro ativo por exemplo (Naderi e Nasser, 2020).

Segundo Habschied e colaboradores, em 2021, compostos clorados ou mesmo a água clorada podem promover a formação de clorofenóis. Estes compostos podem gerar sabores desagradáveis (*off-flavours*) nas bebidas, tais como sabores semelhantes à solvente, plásticos ou adstringente. Portanto, para evitar a ocorrência destes sabores na cerveja foram usadas apenas correntes alternadas.

Em função do maior aporte de nutrientes promovido pela corrente usada na etapa II (modelo cervejeiro) as leveduras, de modo indireto, aumentaram a taxa de proliferação. Apesar da eletroestimulação não agir diretamente no metabolismo de DNA, o aumento da produção de proteínas pode alterar as taxas de multiplicação celular por modificar a maquinaria e estruturas celulares (Cheng *et al.*, 1982; Haneke *et al.*, 2020).

Com o aumento da taxa de proliferação observou-se um aumento no número de células no grupo eletrofermentado (aproximadamente $12,1 \log_{10}$ cel/mL), quando comparado ao controle (aproximadamente $11,6 \log_{10}$ cel/mL). Este aumento, por sua vez, induziu um maior consumo de O_2 e consequentemente produzindo um ambiente favorável à fermentação, devido as baixas taxas de O_2 (Figura 15). As baixas taxam de O_2 são importantes para a fermentação, contudo a ausência total pode bloquear o metabolismo microbiano (Dashko *et al*, 2014).

Diferentemente da taxa de proliferação celular e do consumo de O_2 que foram maiores no grupo eletrofermentado que no grupo controle o consumo de glicose (9,93 e 10,5 mg/dL respectivamente) e carboidratos não apresentou diferenças significativas (5,13 e 5,05 °Brix respectivamente) (figuras 12 e 13). Este evento associa-se, possivelmente, à otimização dos processos metabólicos, bem como ao aumento de proteínas totais.

Quando comparados os grupos controle e eletrofermentado, como esperado em função da eletroestimulação, do aumento do número de células e redução da concentração de O_2 dissolvido, o grupo eletrofermentado apresentou maior produção de etanol (Figura 11). Com uma maior concentração de proteínas é possível que o aumento da regeneração do NAD^+ ser mais efetivo e consequentemente favorecendo a produção de energia na glicólise (Dashko *et al.*, 2014).

Todas estas diferenças durante a fermentação geram um produto diferente do produzido tradicionalmente. Esta afirmação foi demonstrada através da cromatografia que confirmou a maior concentração de etanol no grupo eletrofermentado que no grupo controle e que os níveis de glicose são semelhantes. Além disso, a cromatografia revelou a existência de picos entre o etanol e a glicose que podem ser relacionados à presença de ésteres no grupo controle. Estes compostos são sintetizados quando a levedura cresce em altas temperaturas (Titica *et al.*, 2000). Neste sentido, podemos hipotetizar que a aplicação da corrente elétrica além de otimizar o metabolismo reduziu o estresse causado durante a fermentação em temperatura ambiente.

Demonstrou-se, portanto, que o protocolo desenvolvido pode ser usado para a produção de cerveja com menor estresse celular e conseqüentemente uma bebida mais equilibrada mesmo com a fermentação ocorrendo à temperatura ambiente.

6. CONCLUSÃO

Por fim, demonstrou-se que os biorreatores desenvolvidos possibilitaram implementação da eletromodulação;

A modulação da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* através da aplicação de correntes elétricas é possível;

Correntes elétricas com 1Hz de frequência tendem a reduzir a produção de etanol;

Correntes elétricas com 50Hz de frequência tendem a aumentar a produção de etanol;

Existem diferenças no perfil cromatográfico dos produtos com e sem a eletroestimulação.

Vale ressaltar que mais estudos envolvendo o tema devem ser realizados para elucidar os mecanismos de ação desencadeados pelas correntes elétricas.

REFERÊNCIAS

Arantes, P. B. et al. UTILIZAÇÃO DE MICROCORRENTES NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO. **Revista Diálogos Interdisciplinares**. 7, 3, 2018.

Arunasri, K. et al. Monitoring metabolic pathway alterations in *Escherichia coli* due to applied potentials in microbial electrochemical system. **Bioelectrochemistry**, v. 134, p. 107530, 2020.

Bodewein, L. et al. Systematic review on the biological effects of electric, magnetic and electromagnetic fields in the intermediate frequency range (300 Hz to 1 MHz), **Environmental Research**, v. 171, p. 247-259, 2019

Bortoleto, G. G.; Gomes, W. P. C. Determinação de compostos orgânicos voláteis em cervejas artesanais por cromatografia gasosa e amostragem headspace. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 9, n. 9, pág. e600997746, 2020.

Bovo, B. et al. Exploring the use of *Saccharomyces cerevisiae* commercial strain and *Saccharomyces ludwigii* natural isolate for grape marc fermentation to improve sensory properties of spirits. **Food Microbiology**, v. 41, p. 33–41, 2014.

Bruce J., Analysis of anions in beer using ion chromatography. **J. Aut. Meth. & Manag. Chem.** 24 (4):127–130, 2002.

Canada. Natural Resources Canada. Ethanol. 2020. Available online: <https://www.nrcan.gc.ca/energy-efficiency/transportationalternative-fuels/alternative-fuels/biofuels/ethanol/3493> (acessado em 4 de agosto de 2021).

Carvalho, L. G. **Produção de Cerveja. Dossiê Técnico**. REDETEC-Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2007.

Cheng, N. et al. The Effects of Electric Currents on ATP Generation, Protein Synthesis, and Membrane Transport in Rat Skin, **Clinical Orthopaedics and Related Research**: 171, 264-272, 1982.

Cserhádi, T., Szogyi, M. Chromatography of beer. **Eur. Chem. Bull.** 2(4), 154-159, 2013.

Czerwińska-Główka, D.; Krukiewicz, K. A journey in the complex interactions between electrochemistry and bacteriology: From electroactivity to electromodulation of bacterial biofilms. **Bioelectrochemistry**, v. 131, 2020.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno C, Piškur J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? **FEMS Yeast Res.** 14(6):826-32. 2014

El Sayed, W. M. M.; IBRAHIM, H. A. H. Evaluation of Bioethanol Production from *Ulva lactuca* By *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 6, n. 2, 2016.

Habschied, K.; Košir, I.J.; Krstanović, V.; Kumrić, G.; Mastanjević, K. Beer Polyphenols— Bitterness, Astringency, and Off-Flavors. **Beverages**. 7, 38, 2021.

Haneke, K., et al. CDK1 acopla a proliferação com a síntese de proteínas. **J Cell Biol.** 219 (3): e201906147. 2020

Hartwell, L. H. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. **Bacteriological Reviews**, v. 38, n. 2, p. 164–198, 1974.

Huang, H.; Qureshi, N.; Chen, M.-H.; Liu, W.; Singh, V. Ethanol production from food waste at high solids content with vacuum recovery technology. **J. Agric. Food Chem.**, 63, 2760–2766. 2015

Joshi J., et al. Enhancement of Ethanol Production in Electrochemical Cell by *Saccharomyces cerevisiae* (CDBT2) and *Wickerhamomyces anomalus* (CDBT7). **Frontiers in Energy Research**. 7. 2019

Krantz, M.; Nordlander, B.; Valadi, H.; Johansson, M.; Gustafsson, L.; Hohmann, S. Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. **Eukaryot. Cell**, 3, 1381–1390. 2004

Li Y. et al. Anaerobic degradation of xenobiotic organic contaminants (XOCs): The role of electron flow and potential enhancing strategies. **Journal of Environmental Sciences**, Volume 101. 2021

Lopes, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. Suppl. 1. 2016

Lucarini, Adriana C.; Silva, La Da; Bianchi, Reinaldo Ac. Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos. **Revista pesquisa e tecnologia FEI**, n. 26, p. 36-40, 2004.

Malakar, S.; Paul, S.K.; Pou, K.R.J. **Biotechnological Interventions in Beverage Production**. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*; Academic Press: New York, NY, USA, pp. 1–37. 2020

Moscoviz, R. et al. Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 856–865, 2016.

Muktham, R. et al. A Review on 1st and 2nd Generation Bioethanol Production-Recent Progress. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, 6, 72-92. 2016

Naderi M, Nasser S. Optimization of free chlorine, electric and current efficiency in an electrochemical reactor for water disinfection purposes by RSM. **J Environ Health Sci Eng**. 8;18(2):1343-1350. 2020

Nakanishi, K. et al. Effect of electric current on growth and alcohol production by yeast cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 250–253, 1998.

Oliveira, P. N. et al. Production and characterization of a new mango distilled beverage. **Scientia Agricola**, v. 79, n. 1. 2022.

OLIVEIRA, V. G. **Processos Biotecnológicos Industriais - produção de bens de consumo com o uso de fungos e bactérias**. Editora Saraiva, 2015.

Perozzi, C. e Beaune, H. **Cerveja em casa**. São Paulo: TAPIOCA, 2019.

Rago, L.; Pant, D.; Schievano, A. Electro-Fermentation— **Microbial Electrochemistry as New Frontier in Biomass Refineries and Industrial Fermentations**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

Silva, Felipe Henriques Alves da et al. Infecção por *Saccharomyces cerevisiae*: uma infecção atípica em UTI. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 2011, v. 23, n. 1

Simeone, Maria Lúcia Ferreira, et al. Avaliação do Brix e perfil de açúcares em diferentes genótipos de sorgo sacarino. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. **Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.

Titica, M., et al. Modeling of the Kinetics of Higher Alcohol and Ester Production Based on CO₂Emission with a View to Control of Beer Flavor by Temperature and Top Pressure. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** 58(4):167-174, 2000

Todhanakasem, T., et al. Zymomonas mobilis Biofilm Reactor for Ethanol Production Using Rice Straw Hydrolysate Under Continuous and Repeated Batch Processes. **Frontiers in Microbiology**, 10. 2019

Tse, T. J., Wiens, D. J. & Reaney, M. J. T. Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. **Fermentation**, 7, 268. 2021

Tse, T.J.et al. Saccharomyces cerevisiae fermentation of 28 barley and 12 oat cultivars. **Fermentation**, 7, 59. 2021

Venturini Filho, W.G.; Cereda, M.P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. de A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial, v.4 - Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, Cap.4, p.91-144. 2001

Yang, S. T., Liu, X. & Zhang, Y. Metabolic Engineering – Applications, Methods, and Challenges. In Shang-Tian Yang. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, Elsevier,73-118. 2007

Zeyoudi, M. et al. Impact of continuous and intermittent supply of electric field on the function and microbial community of wastewater treatment electro-bioreactors. **Electrochimica Acta**, v. 181, p. 271–279, 2015.