

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

BRUNA CARAMORI SCHUH TIERLING

**USO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA
ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO RESÍDUO ÚMIDO DE
CERVEJARIA NA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2016

BRUNA CARAMORI SCHUH TIERLING

**USO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA
ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO RESÍDUO ÚMIDO DE
CERVEJARIA NA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: PROF^a DR^a GRACINDA MARINA CASTELO DA SILVA

TOLEDO
2016

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

BRUNA CARAMORI SCHUH TIERLING

**USO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA
ENRIQUECIMENTO PROTEICO DO RESÍDUO ÚMIDO DE
CERVEJARIA NA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, *Campus* Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Prof^a Dr^a GRACINDA MARINA CASTELO DA SILVA
ORIENTADORA / UTFPR *campus* Toledo

Prof^a Dr^a ELISÂNGELA SERENATO MADALOZZO
COORIENTADORA / UEMS *campus* Naviraí

Prof Dr EDUARDO BITTENCOURT SYNDEY
DOCENTE / UTFPR

MSc. ELISSANDRO JAIR KLEIN
DOUTORANDO / UNICAMP

Toledo, julho de 2016

* A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso

RESUMO

TIERLING, Bruna Caramori Schuh. Uso do planejamento experimental para enriquecimento proteico do resíduo úmido de cervejaria na fermentação em meio sólido. 2016. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Superior em Tecnologia em Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016.

A indústria cervejeira é uma grande geradora de resíduos, dentre os principais resíduos gerados se encontra o bagaço de malte, neste trabalho tratado como resíduo úmido de cervejaria (RUC). Tal resíduo possui ótimas características nutricionais e potencialidades para ser aplicado na nutrição animal gerando um produto de valor agregado e reduzindo o impacto ambiental, contudo, como as características nutricionais do RUC variam de acordo com a estratégia de produção de cada indústria, muitas vezes faz-se necessária a aplicação de processos fermentativos para seu enriquecimento proteico. O uso de um planejamento experimental adequado permite avaliar de forma aprofundada as condições adequadas para cada processo, com gastos reduzidos em termos de análises e tempo destinado a estas. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo utilizar de um planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional) 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios para avaliação das variáveis agitação e temperatura no processo fermentativo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada a concentrações de 3% nos ensaios de fermentação contribuindo para obtenção de valores de enriquecimento proteico de até 3 vezes maior (em base úmida) que o teor proteico do RUC sem processamento (4,97%). O ensaio de maior rendimento foi observado as condições de 44° C e 150 rpm às 28 horas de fermentação, com valor de proteína bruta de 15,56%, conferindo em base seca o valor de 22,88% de proteína bruta. Ao passo que a variável temperatura se mostrou totalmente influente no processo fermentativo devido à sua estrita dependência do crescimento microbiano, a agitação não foi significativa na faixa estudada. Ao final do processo fermentativo o RUC ainda apresentava 32% de umidade, o que viabiliza a aplicação de um processo de secagem. Conclui-se que o RUC tem potencialidades para ser aplicado na nutrição animal, contudo, demanda estudos a respeito de suas características nutricionais, que variam de acordo com cada indústria, bem como, conhecimento a respeito das exigências nutricionais de cada espécie de animal.

Palavras-chave: processo fermentativo, teor proteico, características nutricionais.

ABSTRACT

TIERLING, Bruna Caramori Schuh. Using the experimental design for protein enrichment of wet brewery residue on fermentation in solid medium. 2016. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Superior em Tecnologia em Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016.

The brewing industry is a major generator of waste from the main waste generated is the beer residues, this work treated as wet brewery residue (RUC). This residue has excellent nutritional characteristics and potential to be applied in animal nutrition generating a value-added product and reducing environmental impact, however, such nutritional characteristics of the RUC vary according to each industry production strategy often it is necessary the application of fermentative processes for its protein enrichment. The use of an appropriate experimental design allows us to evaluate in detail the appropriate conditions for each process, with reduced spending in terms of analysis and time allotted to them. That way, this study aimed to use an experimental design DCCR (central composite design) 22 with 3 central points and 4 axial points, totalizing 11 trials for evaluation of variables agitation and temperature in the fermentation process. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used at 3% concentration in the fermentation trials contributing to obtain protein enrichment values up to 3 times (on a wet basis) greater than the protein content of the unprocessed RUC (4.97%). The test highest yield was observed the conditions of 44 °C and 150 rpm at 28 hours fermentation with 15.56% crude protein value, conferring on a dry basis the value of 22.88% crude protein. While the temperature variable proved totally influential in the fermentation process due to its strict dependence on microbial growth, the agitation was not significant in the range studied. At the end of the fermentation process the wet brewery residue still has 32% moisture, which enables the application of a drying process. It is concluded that the wet brewery residue has the potential to be used in animal nutrition, however, demand studies on their nutritional characteristics, which vary according to each industry, as well as, knowledge about the nutritional requirements of each species of animal.

Palavras-chave: fermentative process, protein content, nutritional characteristics.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CZ	Cinzas
DCCR	Delineamento composto central rotacional
FMS	Fermentação em meio sólido
FSS	Fermentação em substrato sólido
FES	Fermentação em estado sólido
g	Massa em gramas
h	hora
LI	Porcentagem lipídeos (%)
M	Peso da amostra
Múmida	Massa de água presente na amostra (g)
Mseca	Massa seca obtida em estufa (g)
N	Número de gramas
Na	Normalidade de ácido
P	Número de gramas da amostra inicial
PB	Proteína bruta
rpm	rotações por minuto
RUC	Resíduo úmido de cervejaria
T	temperatura (°C)
U	Porcentagem de umidade
V	Volume
Xbs	Razão entre a massa úmida e a massa de sólido
+	Nível Superior
-	Nível inferior
0	Ponto Central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Pareto	32
Figura 2 - Superfície de resposta (função da temperatura (°C) e agitação (rpm) para a % de proteína.	33
Figura 3 - Curvas de contorno em função da temperatura (°C) e agitação (rpm) para a % de proteína.	34
Figura 4 - Curva de enriquecimento proteico para cada ensaio em função do tempo.	36
Figura 5 - Curva de enriquecimento proteico para o ensaio 9 em função do tempo	37
Figura 6 - Aspecto Visual do RUC a) Sem processamento.....	43
Figura 6 -b)após 28 horas de fermentação	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre a composição química do resíduo úmido de cervejaria proveniente de diferentes indústrias.....	16
Tabela 2 – Composição química do bagaço de malte desidratado	17
Tabela 3 – Composição química da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seca	18
Tabela 4 – Composição nutricional da mistura de 80% do RUC e 20% de levedura <i>in natura</i> e após o processo de secagem na temperatura de 70 °C*	19
Tabela 5 – Variáveis e valores utilizados no DCCR	25
Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental.....	25
Tabela 7 – Matriz do DCCR para o teor de proteína (%) obtida no RUC	30
Tabela 8 – Tabela de efeitos para as variáveis temperatura e agitação no rendimento do teor de proteico	31
Tabela 9 – ANOVA para a concentração de proteína (%).....	32
Tabela 10 - Percentual de acréscimo (+) ou decréscimo (-) no teor proteico entre 28 e 32 horas	39
Tabela 11 - Caracterização nutricional do RUC após mistura de 80% RUC e 20% levedura (Boffo e Klagenboech) e após o processo de fermentação (a 44° e 150 rpm).....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos específicos.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	14
2.2	RESÍDUO ÚMIDO DE CERVEJARIA.....	15
2.3	LEVEDURA (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	17
2.4	FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO.....	19
2.5	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3	MATERIAL DE MÉTODOS.....	22
3.1	MATERIAIS.....	22
3.2	EQUIPAMENTOS	22
3.3	REAGENTES	22
3.4	METODOLOGIA	23
3.4.1	Micro-organismo	23
3.4.2	Substrato	23
3.4.3	Método de cultivo.....	23
3.4.5	Planejamento Experimental	24
3.4.6	Determinação da umidade inicial do bagaço de malte e da levedura	25
3.4.7	Teor proteico.....	26
3.4.8	Teor de umidade.....	27
3.4.9	Lipídeos	28
3.4.10	Cinzas.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	FERMENTAÇÃO MEIO SÓLIDO DO RUC	35

4.3	CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL	41
5	CONCLUSÃO	44
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICE	52

1 INTRODUÇÃO

Qualquer processo produtivo é passível de gerar resíduos. O aumento da conscientização ecológica começou no início do século XX e deixou bem claro que um dos grandes desafios para as próximas décadas é a sustentabilidade ambiental. A bioconversão de determinados produtos agrícolas e da indústria de alimentos têm recebido atenção por estes produtos representarem recursos possíveis e utilizáveis na síntese de outros produtos úteis (PINTO et al, 2005).

A produção de determinadas culturas no Brasil têm gerado volumes altos de resíduo e subprodutos. Existem diversos relatos de aproveitamento de resíduos na alimentação de ruminantes, e alguns resíduos já tem seu uso bastante disseminado entre os pecuaristas, uma vez que a alimentação básica deste tipo de animal se dá através de pasto natural ou cultivado, que se apresenta escasso na época seca do ano (CARVALHO, 1993).

O setor cervejeiro tem grande produção durante o ano todo. Segundo Santos e Ribeiro (2005) para cada 100 litros de cerveja produzidos, são gerados de 14 a 20 Kg de bagaço de malte, em termos de quantidade este é o principal resíduo. Segundo o SICOBE (2016) (Sistema de Controle de Produção de Bebidas), durante o ano de 2015 foram produzidos cerca de 13,8 bilhões de litros de cerveja no Brasil. Portanto, no ano de 2015 foram gerados de 1,9 a 2,7 bi de Kg de bagaço de malte.

De acordo com Brochier (2009) a quantidade de resíduo úmido de cervejaria gerado é 32% superior à quantidade de cevada utilizada na produção da cerveja, este fato faz com que o setor cervejeiro seja caracterizado como grande gerador de resíduos.

O bagaço de malte tem grandes potencialidades para ser utilizado na alimentação animal, porém é necessário o estudo aprofundado deste subproduto para verificar se este atende as necessidades de nutrição animal. Em determinados casos, é necessário que este passe por um enriquecimento proteico que se dá através da fermentação em estado sólido.

No que se trata de resíduos sólidos, a fermentação em meio sólido desempenha papel de destaque no aproveitamento dos mesmos. Devido o crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos

apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado (PINTO et al., 2005).

Há na literatura trabalhos baseados na caracterização e enriquecimento proteico do bagaço de malte e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como Klagenboech (2012), Boffo (2014), Cordeiro et al (2012). Baseando-se na literatura existente pode-se realizar um planejamento experimental, pois, trabalhar com as melhores condições de cultivo no processo fermentativo resultará em menores gastos, tempo e pesquisa.

O uso planejamento experimental se torna viável pelos benefícios que este apresenta: redução do número de ensaios sem prejuízo na qualidade das informações; estudo de diversas variáveis, separando seus efeitos; determinação de confiabilidade dos resultados; seleção de variáveis que influenciam no processo com número reduzido de ensaios (BUTTON, 2005).

O bagaço de malte merece estudos e aplicação por se tratar de um resíduo com potencialidades e geração em grande escala. A estratégia de aplicação do planejamento experimental conjunta à fermentação em meio sólido, além de agregar valor, irá contribuir para o enriquecimento proteico do resíduo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da temperatura e agitação no enriquecimento proteico do bagaço de malte (resíduo de úmido de cervejaria ou RUC) através da fermentação em meio sólido (FMS) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischman), para que este resíduo se torne um complemento na nutrição animal.

1.1.2 Objetivos específicos

- Elaborar um planejamento fatorial do tipo DCCR (delineamento composto central rotacional), 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais para avaliar as seguintes variáveis do processo de fermentação do RUC: temperatura de cultivo e agitação;

- Efetuar ensaios da FMS nas condições estabelecidas através do Planejamento Experimental e em seguida estudar as melhores condições de fermentação;

- Monitorar a cinética da reação, analisar o teor proteico de todas as amostras e avaliar as características físico-químicas (umidade, proteína, lipídeos, cinzas) da amostra que obtiver maior enriquecimento proteico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DA CERVEJA

Estima-se que a produção de cerveja começou por volta de 8.000 a.C., desenvolvida juntamente aos processos de fermentação de cereais, e difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada (AQUARONE et al, 2001).

A cerveja foi introduzida no Brasil em 1808 através de D. João VI, e em 1900 já se estabeleciam indústrias cervejeiras em nosso país. A boa qualidade da cerveja e o clima brasileiro contribuem para o consumo praticamente uniforme durante todo o ano, com queda de apenas 10% nos meses mais frios (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

De acordo com a Cervbrasil (2016) (Associação Brasileira da Indústria da Cerveja) o setor cervejeiro corresponde a 1,6% do PIB brasileiro e recolhe mais de R\$ 21 milhões em tributos em todo país.

Segundo a legislação brasileira, cerveja pode ser definida como bebida obtida através da fermentação alcoólica do mosto de malte de cevada, e água potável, ação de levedura e adição de lúpulo. O malte de cevada pode também, ser substituído por outros cereais maltados ou não (arroz, trigo, centeio, milho, aveia ou sorgo) (AQUARONE et al, 2001).

As cervejas podem ser classificadas de acordo com o processo de fermentação: baixa fermentação (temperatura inferior a 12 °C), alta fermentação (temperaturas superiores a 25 °C), e chope (cerveja de baixa fermentação não pasteurizada). Contudo, independente da classificação, para a produção da cerveja são usadas as mesmas matérias-primas: malte, levedura, água e lúpulo (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006).

O malte trata-se da cevada parcialmente germinada e seca, que confere aroma e sabor característicos, além de ser responsável por parte do teor alcoólico (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). Outros cereais podem apresentar resultados satisfatórios quando maltados, porém, a cevada apresenta menores dificuldades técnicas no processo de maltagem (AQUARONE et al, 2001).

A produção da cerveja, segundo Filho (2010), pode ser dividida em oito etapas essenciais: moagem do malte, mosturação (ou tratamento enzimático do mosto), filtração do mosto, fervura do mosto, tratamento do mosto, fermentação, maturação e clarificação.

O resíduo em questão (bagaço de malte/RUC) é resultante da etapa de filtração. De acordo com MELKINOV (2007), na etapa de mosturação ocorre a mistura do malte moído com água, então, as enzimas do próprio malte são ativadas de acordo com um perfil de temperatura controlado que permite hidrolisar o amido em mono, di e trissacarídeos e dextrinas, e as proteínas em peptídeos e aminoácidos. Na etapa de filtração a fração insolúvel do malte é removida, obtendo-se o bagaço de malte e o mosto.

2.2 RESÍDUO ÚMIDO DE CERVEJARIA

FILHO (2010) definiu malte como matéria-prima resultante da germinação, sob condições controladas, de qualquer cereal (cevada, arroz, milho, trigo, aveia, sorgo, triticale, etc.). Neste estudo será tratado do bagaço de malte oriundo da cevada.

Os resíduos sólidos gerados na produção da cerveja são provenientes principalmente das etapas de filtração, envase e tratamento de água e efluentes líquidos. Os principais resíduos sólidos são: grãos usados, bagaço de malte, trub grosso e trub fino. O trub grosso, trub fino e bagaço de malte possuem excelentes características nutricionais, por isso são utilizados na fabricação de ração animal (SANTOS; RIBEIRO, 2005).

O valor nutricional do resíduo está atrelado ao tipo de fabricação e processo de produção empregados. Outros fatores, como a origem dos grãos de cevada, e adição de adjuntos também determinam a composição química dos subprodutos (VELASCO et al, 2009).

Portanto, pode-se perceber a variação nas características do RUC de acordo com a Tabela 1, para diferentes marcas de cerveja, principalmente se tratando do teor de proteína bruta, que chega a variar 5,8%.

Tabela 1. Comparação entre a composição química do resíduo úmido de cervejaria, proveniente de diferentes indústrias.

Nutriente (%)	Indústria			
	Brahma	Kaiser	Schincariol	Skol
Massa Seca	15,6	9,2	12,3	14,7
Proteína Bruta	31,8	26,0	27,6	31,7
Fibra Bruta	15,8	18,9	14,1	14,9
Fibra em Detergente Neutro	43,8	54,0	44,5	47,8
Fibra em Detergente Ácido	21,3	26,5	20,9	25,9
Lignina	3,5	4,8	4,5	5,3
Nutrientes Digestíveis Totais	74,0	69,4	70,6	68,9

Fonte: Adaptado de Velasco¹ (apud Aronovich, 1999).

Cordeiro, El-Aouar e Gusmão (2012), avaliaram as características físico-químicas do RUC, onde obteve-se cerca de 15,46% de carboidratos, e 5,43% e proteínas totais, em base úmida. Neste caso, constatou-se elevado teor de água, o que pode propiciar crescimento microbiano. Nos estudos realizados por Bourscheidt, Oliveira e Silva (2010) verificou-se que o RUC analisado possuía umidade média de 82,19%.

Devido o alto teor de umidade presente no RUC, a operação de secagem se torna indispensável, pois diminui o volume do material e aumenta o seu tempo de conservação (KLAGENBOECH; THOMAZINI; SILVA, 2011). Contudo, deve-se considerar a importância deste material, pois o teor de umidade pode contribuir no processo de fermentação, aumentando o crescimento microbiano.

No seguinte caso, apresentado pela Tabela 2, obteve-se uma composição maior de proteína após o RUC ser desidratado e moído:

¹ ARONOVICH, M. **Composição bromatológica e degradabilidade de silagens de resíduo úmido de cervejaria**. 1999. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Tabela 2 – Composição química do bagaço de malte desidratado

Parâmetros físico-químicos	Composição (%)
Proteína bruta	15,9
Matéria seca	24,4
Extrato etéreo	9,2
Fibra bruta	17,4
Material mineral	1,1

Fonte: Ascheri et al., 2007.

De acordo com o estudo abordado por Velasco et al (2009), a inclusão do resíduo úmido de cervejaria nas dietas de vacas de alta produção de leite, tem a vantagem de complementar os teores de proteína bruta, beneficiando a produção de leite destes animais.

Através do estudo realizado por Geron et al (2010), constatou-se que a inclusão de até 15% do resíduo de cervejaria fermentado (RCF) na dieta de vacas lactantes é favorável, pois aumenta o coeficientes de digestibilidade total de matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo, além de não prejudicar o consumo de nutrientes nem alterar a qualidade e produção de leite.

Baseado nas literaturas descritas percebe-se o grande potencial de utilização do bagaço de malte na dieta animal.

2.3 LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*)

As leveduras fazem parte do Reino Fungi, assim como os bolores. Contudo, as leveduras têm capacidade de crescer e se reproduzirem mais rápido do que os bolores, por se tratarem de células simples. Sua reprodução se dá geralmente por germinação ou brotamento. (CARVALHO; BENTO; SILVA¹, 2006 *apud* Pelczar, 1980).

² PELCZAR, MJ; REID, R; CHAM, ECS. Fungos: As Leveduras. In: **Microbiologia** (vol.1), pp. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 198.

Há milênios o homem vem utilizando as leveduras para a produção de pão, cervejas, vinho e outros alimentos e bebidas derivados de fermentação. A partir da atividade metabólica das leveduras pode-se obter enzimas, vitaminas, proteínas, gorduras, etc (AQUARONE et al, 2001).

As leveduras são o tipo de micro-organismo mais utilizado pela indústria, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida cientificamente, esta, possui as mesmas funções de qualquer outro organismo vivo, respira, alimenta-se, excreta, dentre outras (ARAÚJO² et al (2009) *apud* ROCHA (2002)).

Literaturas anteriores trabalharam no sentido de caracterizar a levedura, como na Tabela 3:

Tabela 3 – Composição química da levedura *Saccharomyces cerevisiae* seca

Parâmetros físico-químicos	Composição (%)
Umidade (voláteis a 105 °C)	8,72 – 10,02
Proteína bruta	28,70 – 38,28
Extrato etéreo	0,91 – 1,03
Fibra bruta	0,31 – 0,80
Material mineral	4,36 – 5,18

Fonte: Boffo³, 2014 (*apud* Butolo, 1996).

Boffo (2014) trabalhou com a análise da cinética de secagem de misturas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e bagaço de malte, bem como o enriquecimento proteico, analisou os parâmetros físico-químicos, e concluiu que tal mistura possui potencial para utilização como ração animal. Após o processo de secagem a mistura de 80% RUC e 20% levedura atingiram concentrações de 28, 51% de proteína bruta (Tabela 4).

³ ROCHA, A.P.T. **Estudo do desempenho de um leite de jorro convencional para secagem de leveduras**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, 2002.

⁴ BUTOLO, José E. **Uso da biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras fontes de nutrientes**. In: WORKSHOP – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, p. 70-89, 1996.

Tabela 4 – Composição nutricional da mistura de 80% de bagaço de malte e 20% de levedura *in natura* e após o processo de secagem na temperatura de 70 °C*

Parâmetros (%)	<i>In natura</i>	1,2 m/s	1,4 m/s
Umidade	81,12 ± 0,45	3,84 ± 0,15	3,52 ± 0,11
Matéria seca	18,87 ± 0,45	95,86 ± 0,15	96,16 ± 0,11
Cinzas	0,81 ± 0,03	4,13 ± 0,01	4,05 ± 0,03
Lipídios	0,28 ± 0,06	4,09 ± 0,21	3,97 ± 0,24
Proteína bruta	6,27 ± 0,33	28,51 ± 0,39	26,16 ± 0,24
Fibras	12,37	-	-

Fonte: Boffo, 2014.

Notas: * Média de três repetições.

2.4 FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Pode ser comumente chamada de fermentação em substrato sólido (FSS), fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação em meio sólido (FMS). Várias formas de alimentos utilizando essa técnica fazem parte da dieta de diversos povos há muito tempo, tanto que, não é possível precisar dados sobre o início desta prática pela atividade humana (SCHMIDELL et al, 2001).

São diversos tipo de matérias-primas que podem ser utilizadas para tal processo, como: celulose, hemicelulose, farelos, palhas, polpas, bagaço de cana e melação, grãos de diferentes variedades, etc. Com tais matérias-primas pode-se obter compostos orgânicos, enzimas, álcool, enriquecimento proteico, antibióticos, alimentos e toxinas (SCHMIDELL et al, 2001).

De acordo com Santos⁴ (2006, *apud* Bramorski (1997) e Lu, Maddox e Brooks (1998)), uma das vantagens de trabalhar com a fermentação em estado sólido é a simplicidade do meio, constituindo-se de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento microbiano.

⁵ BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 1997; LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. **Application of a multi-layer packedbed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review.** Process Biochemistry, v. 33, n. 2, p. 117-123, 1998

A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio, e demais componentes, e ainda, serve como suporte para o crescimento de células microbianas. Outra vantagem da fermentação em estado sólido é o fato de o crescimento microbiano ocorrer em condições mais próximas às dos *habitats* naturais (PINTO et al. 2005).

Schmidell et al (2001), elencou certos parâmetros que precisam ser controlados para que o processo fermentativo resulte em um produto com boas características, como umidade, atividade de água, temperatura, pH, aeração, agitação, estimativa e característica de crescimento. Da mesma forma, Borzani et al (2001) elencou os fatores que influenciam no crescimento microbiano: temperatura, pH, oxigênio e agitação.

Cada micro-organismo possui três temperaturas cardeais, onde abaixo da temperatura mínima não há crescimento, acima da temperatura máxima também não haverá crescimento, e a temperatura ótima representa crescimento máximo. Através da temperatura de crescimento microbiano pode-se classificar os micro-organismos em três grandes grupos: termófilos (cuja temperatura ótima localiza-se em torno de 60 °C), criófilos (em torno de 10 °C) e mesófilos (entre 20 e 40 °C) (BORZANI et al, 2001).

A levedura em questão trata-se de um microrganismo mesófilo, por apresentar crescimento microbiano a temperaturas entre 30 e 40 °C, sendo a temperatura ótima em torno de 37 °C (Muñoz; Catrilaf⁵, 2013 *apud* Paul Held, 2010).

Outro fator que merece destaque é a agitação. Esta variável desempenha papel fundamental no processo fermentativo. O objetivo de um sistema de agitação e aeração é fornecer oxigênio para manter a atividade respiratória. Portanto, a agitação visa transferir o oxigênio entre fases para que o oxigênio dissolvido chegue às células suspensas, penetre nas células e seja consumido na reação. Além de colaborar com a transferência gasosa, a agitação promove melhor homogeneização do meio e impede a formação de agregados (SCHMIDELL et al, 2001).

⁶ HELD, Paul. Principal Scientist, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* The Utility of Synergy™**. H1 for Providing High Quality Kinetic Data for Yeast Growth Applications. 2010.

Ao avaliar a extração de proteases utilizando torta de canola como substrato Freitas et al (2010), constataram que trabalhando-se com agitação de 100 rpm, obteve-se um aumento de 17% sobre a recuperação de enzimas em relação as amostras que não foram agitadas durante a fermentação.

2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O termo planejamento experimental pode ser definido como conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, é utilizado para determinar a influência das variáveis estabelecidas em um sistema ou processo (BUTTON, 2005).

De acordo com Calado (2003) determinando-se quais são as variáveis que apresentam maior influência no processo, tem-se como resultado a redução na variação do processo e melhor concordância entre os valores pretendidos e valores obtidos, redução no tempo e no custo do processo, e ainda melhoria no rendimento.

Button (2005) elencou alguns quesitos que devem ser estipulados no preparo de um planejamento experimental, ou também chamado de planejamento fatorial:

- a) determinação de quais são as variáveis mais influentes nos resultados;
- b) atribuição de valores às variáveis significativas de modo a otimização dos resultados;
- c) atribuição de valores à essas variáveis de modo a minimizar a variabilidade dos resultados e a influencia das variáveis incontroláveis;

Um planejamento fatorial 2^2 é o planejamento mais simples, onde dois fatores são estudados em dois níveis (valores). Neste trabalho será estudado também o ponto central entre os níveis (média). Como já citado, o presente estudo trabalhará com os fatores temperatura e agitação.

Nos planejamentos de dois níveis, costuma-se identificar os níveis superior e inferior através dos sinais (+) e (-) respectivamente, adotou-se também o ponto central que será representado pelo algarismo 0 (zero).

3 MATERIAL DE MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

- Balões de Kjeldahl;
- Balões volumétricos;
- Bandejas de alumínio;
- Pipetas graduadas;
- Espátula de metal;
- Proveta 250 mL;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Dessecador de vidro;
- Cadinhos de porcelana.

3.2 EQUIPAMENTOS

- *Freezer*, Bosh;
- Balança Analítica, Shimadzu;
- Mufla, Fornitec;
- Estufa com circulação de ar, Solab;
- Destilador de nitrogênio, Tecnal;
- Extrator de óleos e gordura soxhlet, Marconi.

3.3 REAGENTES

- Ácido sulfúrico P.A.;
- Éter de petróleo P.A.;
- Hidróxido de sódio P.A.;
- Vermelho de metila;
- Verde de bromocresol;
- Sulfato de cobre.

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fermento biológico comercial.

3.4.2 Substrato

O bagaço de malte, resíduo industrial, foi fornecido por uma indústria cervejeira situada no Oeste do Paraná – Brasil. As amostras foram acondicionadas sem processamento. Estas, permaneceram armazenadas em *freezer* a temperatura de -5° a $\pm 2^{\circ}\text{C}$, e para os ensaios de fermentação foram descongeladas a temperatura ambiente por volta de 24h (MENEZES, 2010).

3.4.3 Método de cultivo

O método de cultivo utilizado se trata de frascos de erlenmeyer de 250 mL aplicados como biorreatores, juntamente com a câmara de rotação orbital, Shaker, contendo suporte para os Erlenmeyers.

Os ensaios de FMS foram realizados de forma aleatória, em duas câmaras de rotação orbital (Shaker), sendo que os pontos centrais foram realizados no mesmo Shaker, em bateladas diferentes.

O substrato foi alocado no biorreator uniformemente, para a realização do processo fermentativo em sistema de batelada, na concentração de 3% de levedura baseado nos estudos e no referencial teórico de Araújo et al (2009), que avaliou

diferentes aplicabilidades da *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação semissólida.

Para cada ensaio de fermentação foram colocados dois frascos de erlenmeyer contendo cerca de 50g de amostra. Para cada alíquota retirada eram extraídas cerca de 7 g de amostra.

Para a temperatura de fermentação serão avaliados os níveis de 20 e 40 °C, sendo 30°C o valor afixado para o ponto central. Para agitação serão trabalhados os níveis de 100 e 300 rpm, sendo 200 rpm o ponto central.

As alíquotas foram retiradas de amostras do substrato antes do processamento bem como após 2, 4, 8, 12, 24, 28 e 32 horas de cultivo, para determinação do percentual de proteína bruta (metodologia adaptada de Campos, 2005).

3.4.5 Planejamento Experimental

Foi realizado um delineamento experimental considerando as seguintes variáveis: temperatura e agitação (Tabela 5). As faixas das variáveis independentes foram selecionadas baseadas na literatura: por se tratar de um microrganismo mesófilo, a faixa de atividade da levedura em questão é de 20 °C a 40 °C, portanto esta foi adotada para o planejamento. Quanto a agitação, observa-se carência na literatura referente a monitoramento desta variável na FMS, acabou se estipulando a faixa de rpm executada pelo equipamento (máximo de 250 rpm), foram adotados os valores de 100 a 200 rpm.

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, totalizando 11 ensaios realizados de forma aleatória de acordo com a ordem das análises arranjadas pelo *software* Statística 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Como resposta foi avaliada a porcentagem de proteína. Na Tabela 5 estão expressos os valores utilizados no DCCR.

Tabela 5 – Variáveis e valores utilizados no DCCR

Variáveis	Nível				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	16	20	30	40	44
Agitação (rpm)	79	100	150	200	221

Fonte: O autor.

O planejamento estatístico e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0. Os resultados obtidos e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,1$).

Na Tabela 6 estão expressos os experimentos executados, e a quais condições foram submetidos:

Tabela 6 – Matriz do planejamento experimental

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
1	-1	-1
2	+1	+1
3	-1	+1
4	+1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,41	0
9	+1,41	0
10	0	-1,41
11	0	+1,41

Fonte: O autor.

3.4.6 Determinação da umidade inicial do bagaço de malte e da levedura

A umidade inicial em base seca do RUC e da levedura foi feita em triplicata através do método padrão em estufa, que consiste em colocar uma determinada massa de amostra em estufa na temperatura de 105 °C, por 24 h, de acordo com a

metodologia descrita por Menezes (2010). A umidade inicial é calculada pela seguinte equação (1):

$$X_{bs} = (M_{úmida} - M_{seca}) / M_{seca} \quad (1)$$

Onde:

X_{bs} : razão entre a massa úmida e a massa de sólido isenta de umidade por determinado tempo

$M_{úmida}$: massa de água presente na amostra (g)

M_{seca} : a massa seca obtida em estufa (g).

3.4.7 Teor proteico

O teor de proteína foi analisado seguindo a metodologia estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), através do método de Kjeldahl, baseado em 3 etapas: digestão, destilação e titulação, onde a matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio presente é transformado em amônia.

Na etapa de digestão a amostra é decomposta com ácido sulfúrico em um catalisador, neste momento o nitrogênio presente é transformado em sal amoniacal. Já na etapa de destilação a amônia é liberada do sal amoniacal através de reação com hidróxido e coletada em uma solução ácida. Na titulação, será determinada a quantidade de nitrogênio titulando a amostra com ácido utilizado na etapa de destilação. Através da equação (2):

$$\% \text{ de PB} = V \cdot 0,14 \cdot f / P \quad (2)$$

Onde:

% de PB: porcentagem de Proteína Bruta

V: volume de H₂SO₄ utilizado na titulação (mL)

f: fator de conversão

Para completar os cálculos, foi utilizado o fator de conversão de 5,83, como prevê o método prescrito em Instituto Adolfo Lutz (2008), para produtos oriundos da cevada.

As análises de proteína foram realizadas em duplicata para cada alíquota retirada durante o processo de fermentação (11 ensaios x 7 alíquotas) resultando em 154 ensaios.

De acordo com o objetivo, análise de teor proteico foi realizada para todas as amostras, sendo que uma delas apresentou maior rendimento em termos de proteína, e esta passou pelas análises de caracterização nutricional.

3.4.8 Teor de umidade

Seguindo a metodologia descrita em Instituto Adolfo Lutz (2008), foram pesados de 2g da amostra em cápsula de metal previamente tarada. A amostra, aquecida durante 3 horas com a estufa a 105°C, em seguida foi resfriada a temperatura ambiente e pesada. A análise foi repetida até que a amostra apresentou peso constante. A partir da equação (3) pode se obter o teor de umidade:

$$U = (N / P) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

U: porcentagem de umidade;

N: número de gramas de umidade (perda de massa em g);

P: número de gramas da amostra inicial.

3.4.9 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada pelo método Soxhlet de acordo com a metodologia prescrita em Instituto Adolfo Lutz (2008), que se baseia na extração da gordura utilizando o Extrator de Óleos e Graxas, com aquecimento e éter de petróleo. A porcentagem de lipídios foi obtida a partir da Equação (4)

$$LI = (N / P) \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

LI: é a porcentagem lipídeos (%)

N: massa de lipídeos (g)

P: massa da amostra inicial (g)

3.4.10 Cinzas

A amostra foi aquecida em mufla a 550°C e em seguida resfriada a temperatura ambiente e pesada, segundo metodologia descrita em Instituto Adolfo Lutz (2008). O teor de cinzas pode ser calculado a partir da equação (6):

$$CZ = (N / P) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde:

CZ: é a porcentagem de cinzas (%);

N: o número de gramas de cinzas (g);

P: o número de gramas da amostra inicial (g).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nas análises de proteína, bem como a caracterização nutricional do ponto de maior enriquecimento proteico. De igual forma, serão discutidos os parâmetros utilizados na FMS e a aplicação do planejamento experimental.

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A matriz do DCCR contendo o resultado do teor de proteína obtida para o RUC é apresentada na tabela 7. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, com desvio padrão relativo de 4,3%, indicando boa repetibilidade do processo. Pode-se observar que o ensaio que apresentou a maior porcentagem de proteína foi o ensaio 9, com 15,56%.

De maneira geral, o maior valor de proteína obtido nos foi às 28 horas de processo fermentativo, portanto, será apresentada (Tabela 7) a matriz do DCCR com a resposta da variável dependente obtida em 28 horas.

Tabela 7 – Matriz do DCCR para o teor de proteína (%) obtida no RUC

(Continua)

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	% Proteína (28h)
1	20	100	7,9987
2	40	200	9,2200
3	20	200	6,6913
4	40	100	9,5979
5	30	150	8,6112
6	30	150	7,9375

Tabela 7 – Matriz do DCCR para o teor de proteína (%) obtida no bagaço

Ensaio	Variáveis independentes		(Conclusão)
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Variável dependente
7	30	150	% Proteína (28h)
8	16	150	8,0878
9	44	150	8,5398
10	30	221	15,5611
11	30	79	9,2230
			7,5002

Fonte: O autor.

O intervalo de confiança adotado para as análises estatísticas foi de 90%, se tratando de um processo biológico. Os efeitos das variáveis temperatura e agitação sobre o enriquecimento proteico estão apresentados da Tabela 8.

Tabela 8. Tabela de efeitos para as variáveis temperatura e agitação no rendimento do teor proteico.

	Efeito	p-valor*
Média/Intercepto	8,2125	0,0003
Temperatura	3,5145	0,0284
Agitação	0,1877	0,8769
Temperatura x Agitação	0,4647	0,7869

*p<0,1

Verifica-se que o efeito da temperatura é significativo enquanto a agitação não exerce influência sobre o processo. O que explica maior teor proteico a temperaturas mais elevadas em níveis de agitação aleatórios.

A figura 3 ilustra o diagrama de Pareto, baseado na interação dos efeitos das variáveis de entrada (temperatura e agitação) e a resposta, teor proteico.

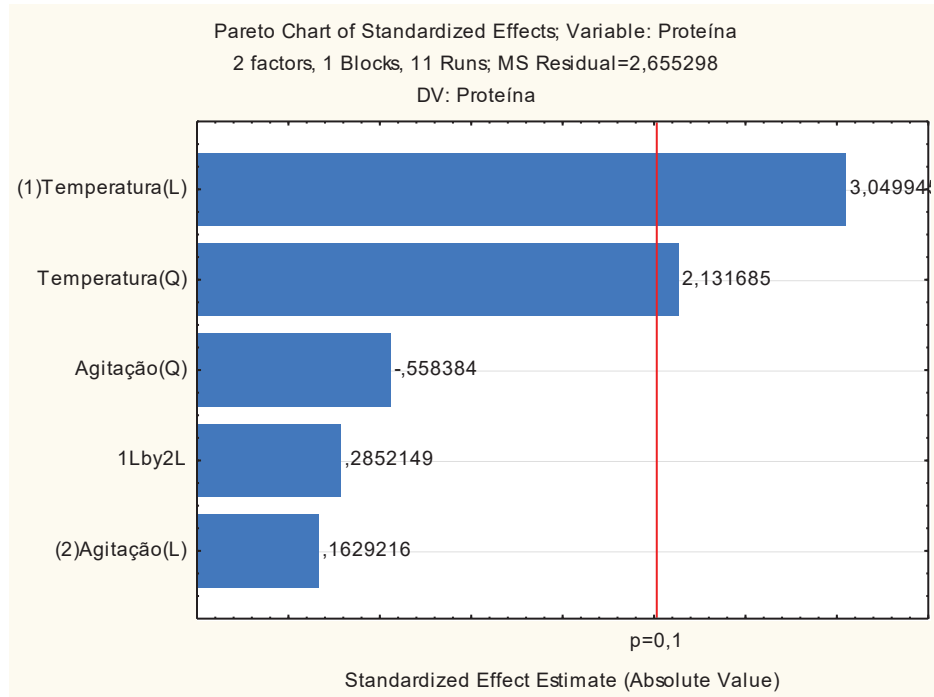


Figura 1. Diagrama de Pareto.

Considerando somente os termos significativos (os parâmetros linear (T) e quadrático de temperatura (T^2)), a Tabela 9 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de proteína. O coeficiente de determinação foi de 72,87%.

Tabela 9 – ANOVA para a concentração de proteína (%)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	39,65	2	19,83	
Resíduo	14,76	8	1,84	10,78
Total	54,41	10		

$$F_{2;8;0,1} = 3,11$$

$$\% \text{ Proteína} = 16,85 - 0,78 t + 0,01 t^2 \quad (6)$$

A partir da Tabela 9, observa-se que F calculado > F tabelado, o que valida o modelo no nível de significância adotado, dentro da faixa estabelecida nos níveis para as variáveis em questão.

A partir da ANOVA foi gerada a superfície de resposta apresentadas nas Figuras 2 e 3. A análise da superfície indicou que, quanto maior a temperatura empregada no processo de fermentação, maior será a % de proteína obtida do RUC considerando a faixa de temperatura estudada.

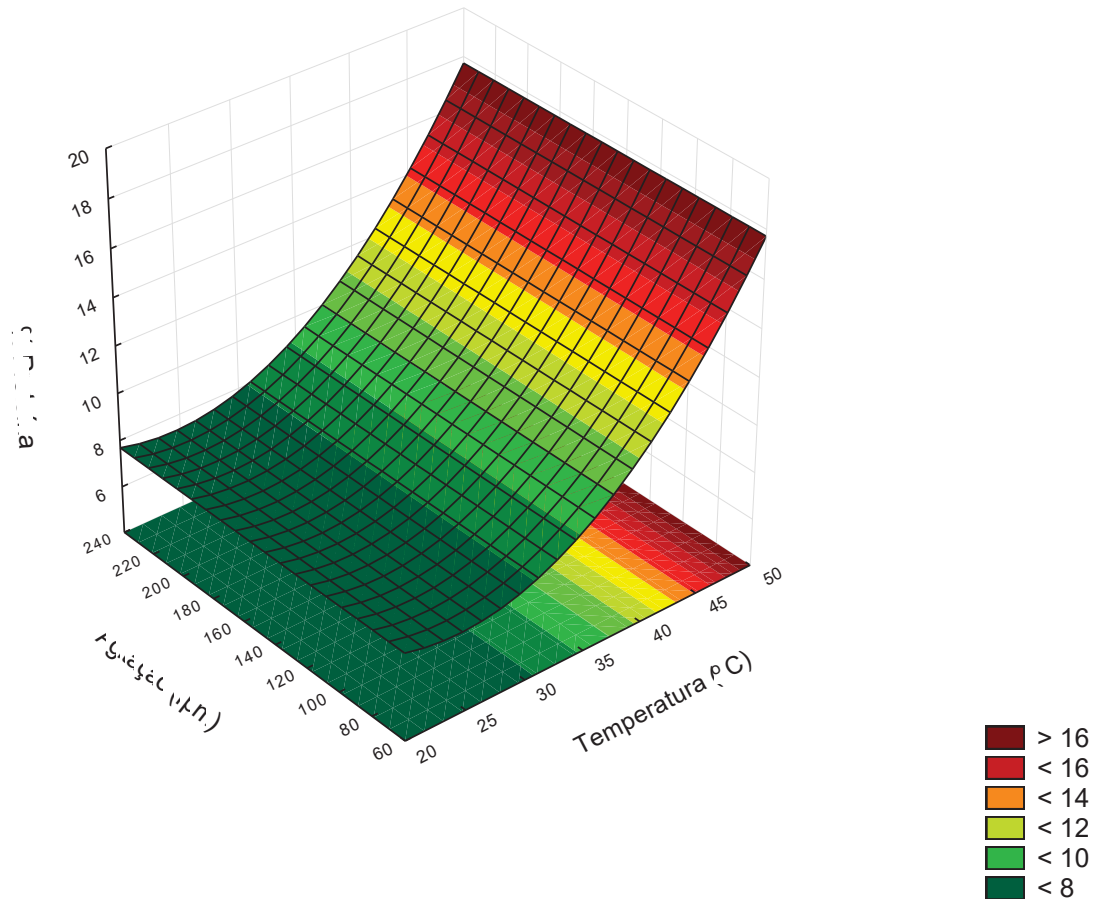


Figura 2 – Superfície de resposta (função da temperatura (°C) e agitação (rpm) para a % de proteína.

Com relação à agitação, esta variável não foi significativa na faixa estudada. Observa-se na Figura 3 que não há curvatura, portanto, não há interação das variáveis, pois o termo de interação foi removido.

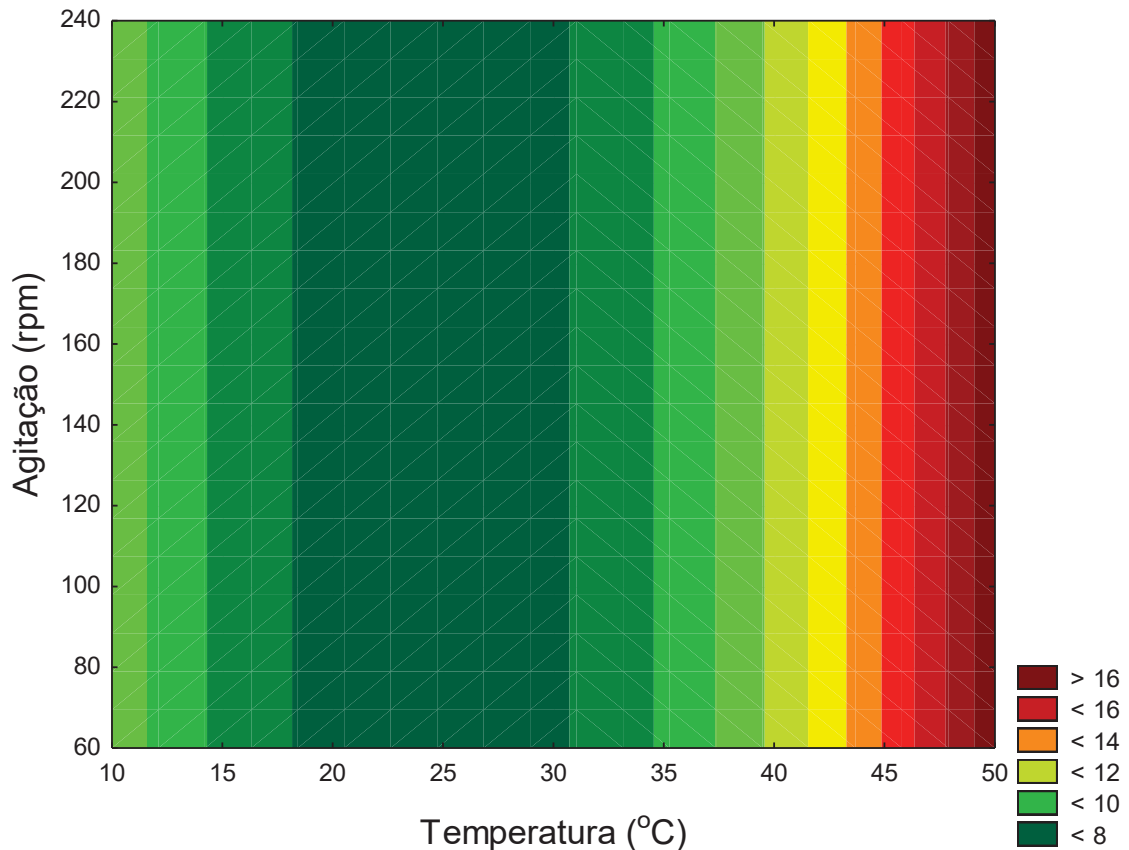


Figura 3 – Curvas de contorno em função da temperatura (°C) e agitação (rpm) para a % de proteína.

O artifício da superfície de resposta é comumente usado para otimização dos processos fermentativos. Araújo et al (2014) utilizou um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para otimização da fermentação alcoólica de soro de queijo. Através da superfície de resposta obtida o autor pode verificar a produtividade da *Saccharomyces cerevisiae* em função das variáveis concentração de sacarose, e concentração de levedura.

O emprego do planejamento experimental foi também observado na fermentação em estado sólido. Santos (2008) utilizou o planejamento fatorial para avaliação de três variáveis (2^3): concentração inicial de umidade, suplementação com uma fonte de nitrogênio e suplementação com uma fonte de fósforo, na fermentação em meio sólido do pedúnculo de caju para produção de pectinase.

Como se observa na superfície de resposta obtida neste trabalho (Figura 2), a agitação não exerceu papel significativo na faixa estudada. Por outro lado, a temperatura se mostrou de fundamental importância, obtendo valores maiores de

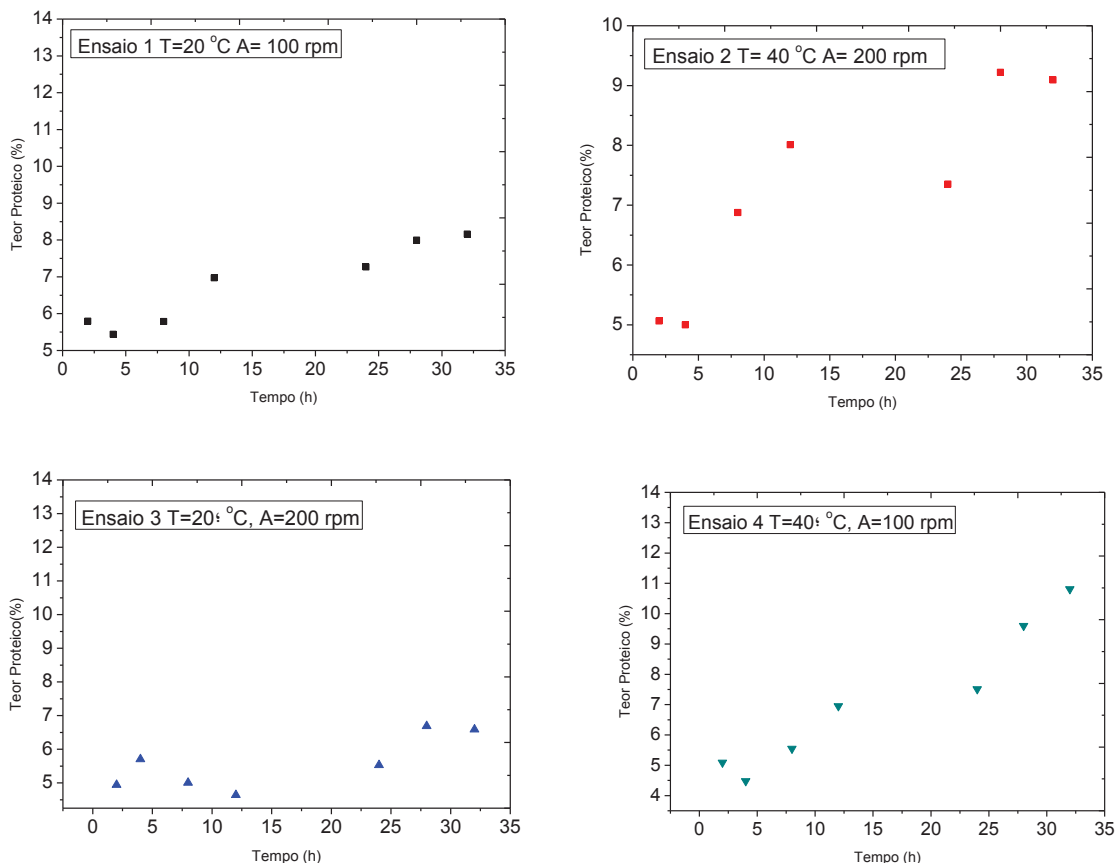
enriquecimento proteico a temperaturas acima de 30° C, como expresso nos ensaios 2 (40 ° C), 4 (40 ° C) e 9 (44 ° C).

4.2 FERMENTAÇÃO MEIO SÓLIDO DO RUC

Antes de se iniciarem as bateladas de fermentação, foram feitas as análises de proteína para o substrato e para a levedura sem processamento, obtendo-se valores de 4,9788%, e 10,6223% de PB, respectivamente.

As alíquotas retiradas durante o processo fermentativo eram imediatamente resfriadas (em freezer), até temperaturas de aproximadamente -5 °C, deste modo processo fermentativo era cessado o mais rápido possível. As amostras eram mantidas plastificadas e congeladas até a realização da análise de proteína.

O comportamento de cada ensaio em função do tempo está apresentado na Figura 4, expresso em Teor Proteico X Tempo. No Apêndice A, são apresentados os valores obtidos para cada ensaio em função do tempo.



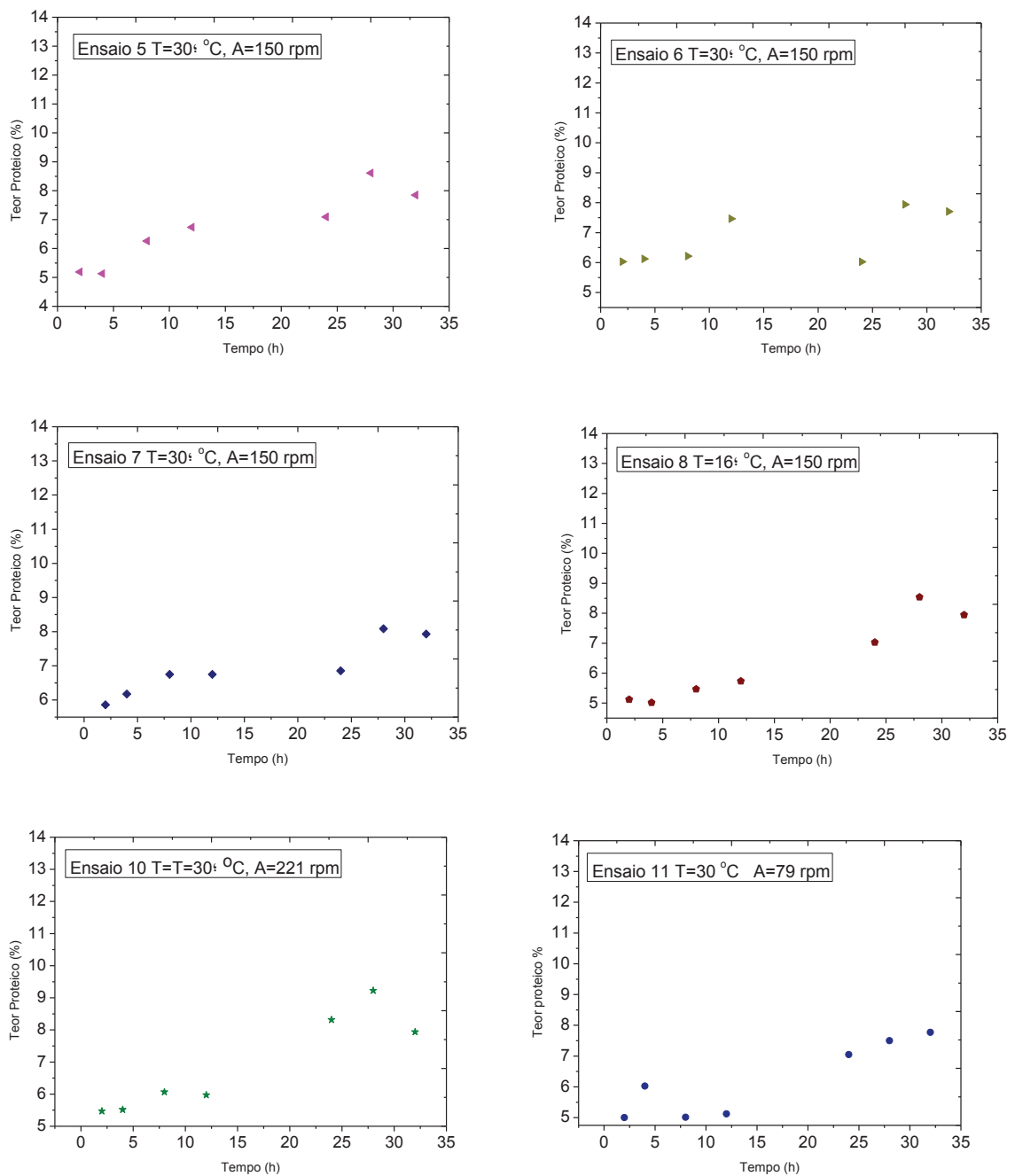


Figura 4. Curva de enriquecimento proteico para cada ensaio em função do tempo.

Observando a Figura 4, nota-se que o RUC superou em duas, e até três vezes o teor proteico em base úmida frente à amostra sem processamento. Tais aspectos são representados pelo ensaio 4 ($T=40^{\circ}\text{C}$, $A=100\text{ rpm}$) às 32 horas com percentual de PB de 10,8070%, e também no ensaio 9 ($T=44^{\circ}\text{C}$, $A=150\text{ rpm}$) às 28 horas de fermentação com 15,5611% de proteína bruta.

As condições observadas no ensaio 9 (44 °C, 150 rpm), conferem às 28 horas de processo fermentativo 32% de umidade, ou seja, 68% de matéria seca. O teor de umidade presente na amostra permite concluir que o teor proteico em base seca é de 22,88%.

Está apresentado na Figura 5 o teor proteico em função do tempo, para o ensaio 9, sendo este o que obteve maior enriquecimento proteico após o processo fermentativo: 15,5611% em base úmida.

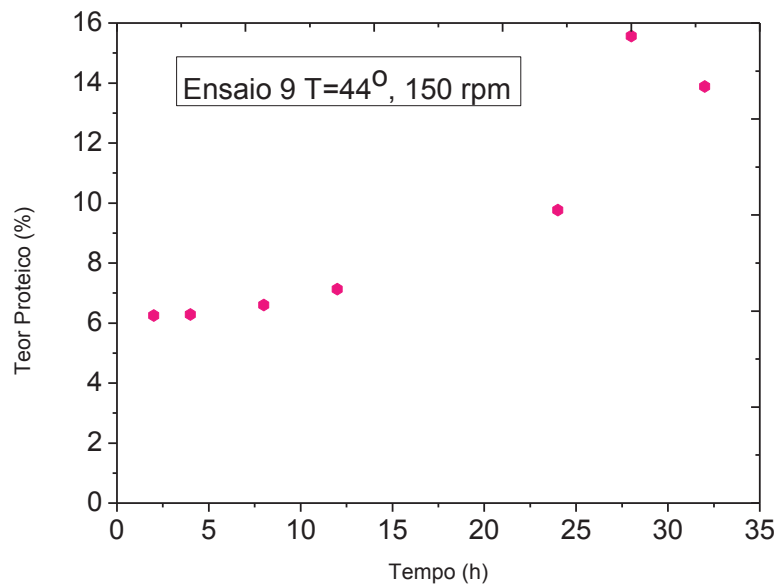


Figura 5. Enriquecimento proteico do ensaio 9 em função do tempo.

Devido à sua estrita dependência do crescimento microbiano, também pela facilidade de determinação, a temperatura é a variável mais frequentemente medida e controlada nos processos fermentativos. A agitação por sua vez, mostra sua importância devido ao controle de oxigênio desenvolvido no meio de cultivo (SCHMIDELL et al, 2001).

A necessidade da fermentação aplicada ao RUC se dá de acordo com suas características nutricionais. Cabral Filho (1999) esclarece que o RUC possui uma grande variabilidade em suas características nutricionais, e parte dessa variabilidade é atribuída à estratégia de fabricação de cada indústria.

O RUC tratado neste trabalho apresenta baixo teor de proteína em seu estado sem processamento (base úmida), 4,97%, o que pode ser provocado devido à quantidade de malte utilizada na produção da cerveja, sendo adicionados os demais adjuntos como cereais, lúpulo e afins. Portanto, no presente caso processo de fermentação torna-se indispensável.

Constatou-se que mesmo aplicando baixa concentração de levedura (3%) o nível de proteína elevou-se consideravelmente para os ensaios que operaram com temperaturas próximas à temperatura de atuação da *Saccharomyces cerevisiae*, 37° C. Os ensaios 2 e 4 foram expostos a temperatura de 40° C e obtiveram teores proteicos de 9,22 e 9,6% em base úmida.

A agitação não pode ser explicada da mesma forma, pois os valores maiores de proteína bruta foram encontrados em ensaios com valores aleatórios de agitação como ensaios 2 (200 rpm), 4 (100 rpm) e 9 (150 rpm). O alto teor de umidade presente no RUC pode ser um fator limitante ao se trabalhar com a variável agitação, pois este tende a impedir o deslocamento do material dentro do biorreator, formando um bloco de substrato, dificultando a contribuição da variável para homogeneização e aeração do processo.

Quanto ao enriquecimento proteico, de uma forma generalizada percebe-se o aumento gradativo no teor proteico, mais pronunciado entre 24 e 28 horas de fermentação, e de igual forma percebe-se um e decréscimo por volta das 32 horas de fermentação.

Estão apresentados na Tabela 10 os percentuais de decréscimo (-) e acréscimo (+) no teor proteico no período de 28 horas para 32 horas de fermentação.

Tabela 10. Percentual de acréscimo (+) ou decréscimo (-) no teor proteico entre 28 e 32 horas.

Ensaio	28h	32h	Percentual (+) ou (-) (%)
1	7,9987 ± 0,18	8,1620 ± 0,1	+2,0415
2	9,2200 ± 0,45	9,0927 ± 0,48	-1,3806
3	6,6913 ± 0,01	6,5895 ± 0,01	-1,5213
4	9,5979 ± 0,42	10,8070 ± 1,45	+12,5975
5	8,6112 ± 0,57	7,8516 ± 0,64	-8,8210
6	7,9375 ± 0,1	7,7034 ± 0,41	-2,9492
7	8,0878 ± 0,1	7,9310 ± 0,3	-1,9387
8	8,5398 ± 0,76	7,9453 ± 0,51	-6,9615
9	15,5611 ± 1,1	13,8830 ± 0,03	-10,7969
10	9,2230 ± 0,1	7,9373 ± 0,5	-13,9401
11	7,5002 ± 0,52	7,7733 ± 0,11	+3,6412

Fonte: O autor.

Nota: Ensaio 1: T=20° C, A=100 rpm; Ensaio 2: T=40° C, A=200 rpm; Ensaio 3: T=20° C, A=200 rpm; Ensaio 4: T=40° C, A=100 rpm; Ensaio 5: T=30° C, A=150 rpm; Ensaio 6: T=30° C, A=150 rpm; Ensaio 7: T=30° C, A=150 rpm; Ensaio 8: T=16° C, A=150 rpm; Ensaio 9: T=44° C, A=150 rpm; Ensaio 10: T=30° C, A=221 rpm; Ensaio 11: T=30° C, A=79 rpm.

De acordo com a Tabela 10, o ensaio que sofreu maior perda de teor proteico foi o ensaio 10 que operou em 30° C e com a condição extrema de agitação em 221 rpm, perdendo 13,9401% de PB. Grandes perdas também podem ser observadas no ensaio 9 (44° C e 150 rpm), de 10,7969%.

Considerando que o maior coeficiente de variação obtido nas análises foi de 20%, o método utilizado se mostrou homogêneo. Coeficientes de variação acima de 25% indicam que o método utilizado é heterogêneo, pois quanto maior o coeficiente de variação, maior a dispersão entre os dados da série. Contudo, as perdas no teor proteico podem ser atribuídas a erros aleatórios durante a execução das análises,

embora também observadas como um fenômeno natural durante o processo fermentativo.

O decréscimo no teor proteico foi observado por Santos (2013), o autor trabalhou com o enriquecimento proteico do farelo da palma forrageira utilizando diferentes microrganismos (*Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.*). O decréscimo do teor proteico foi atribuído à possível desnaturação, morte celular (não ocorrendo mais o processo fermentativo), e também à probabilidade de haver volatilização de NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^- no decorrer do tempo de cultivo.

O autor ainda ressalta que quando os microrganismos são colocados em meios de cultivo apropriado, estes tendem a se dividir ativamente, retirando do meio os nutrientes necessários para a produção de novos microrganismos, este processo é contínuo até que um dos nutrientes se esgote.

No que diz respeito ao próprio RUC, a degradação também foi observada por Geron et al (2007), trabalhando com o resíduo de cervejaria fermentado por meio de ensilagem (fermentação anaeróbica), e verificou perdas de proteína de 6% no período de estocagem. Porém, o autor expõe que as perdas encontradas podem se dar de acordo com as condições adotadas para a fermentação e ainda que tal quesito pode se tornar um problema durante o período de estocagem.

Johnson et al (1987) citam que as perdas no teor proteico também podem ocorrer devido à desaminação ou volatilização do produto, e ainda que alternativa mais econômica seria o processo de fermentação anaeróbica para a conservação do RUC.

4.3 CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL

Como proposto pelo planejamento experimental, de acordo com o item 3.4.7, foram realizadas as análises de proteína e em seguida, passou pelas análises de caracterização nutricional a amostra que obteve maior enriquecimento proteico. O ensaio 9 (44° C e 150 rpm), portanto, além do teor proteico passou pelas análises de teor de umidade, cinzas e lipídios.

Boffo (2014) e Klagenboech (2012) em seus ensaios de secagem, trabalharam com o RUC oriundo da mesma indústria cervejeira que o RUC analisado neste trabalho, ambos autores realizaram a caracterização nutricional para misturas sem processamento, de 80% RUC e 20% levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

A Tabela 11 apresenta a comparação da caracterização nutricional baseado em referência anterior (Klagenboech, 2012) que trabalhou com o mesmo RUC, aplicado a diferentes tratamentos, e o RUC após processo fermentativo em base seca.

Tabela 11. Caracterização nutricional do RUC após mistura de 80% RUC e 20% levedura (Klagenboech), e em base seca após o processo de fermentação (a 44° e 150 rpm).

Parâmetros (%)	Klagenboech	Ensaio 9
Proteína	6,27	22,88 ± 1,1
Umidade	81,12	32,00 ± 0,28
Matéria Seca	18,88	68,00
Lipídios	0,28	4,13 ± 0,16
Cinzas	0,81	1,14 ± 0,03
Fibras	13,32	-

Fonte: O autor.

Na Tabela 11 verifica-se que o teor proteico para o ensaio 9 mostrou-se maior comparado às misturas de RUC e levedura sem processamento. O teor de lipídios aumentou consideravelmente, enquanto o a quantidade de matéria mineral (cinzas), pouco variou.

Klagenboech (2012) também utilizou misturas de 60 % RUC e 40% levedura, obtendo um teor de fibras em amostras sem processamento de 7,73%. A análise de

fibras aplicada a diferentes concentrações de levedura permite prever que grande parte da fibra presente na mistura provém do RUC.

De acordo com Cabral (1999), o RUC caracteriza-se como um concentrado de médio valor proteico, porém, a adição do resíduo em dietas de vacas em produção contribui para atender as necessidades requeridas em termos de fibras, podendo ser incluso em taxas de 15 a 20% da matéria seca total da dieta.

Ainda relacionado ao teor de fibras, Dhiman et al (2003), ressaltam que o RUC é de bastante adequado na alimentação de ruminantes, especialmente de vacas leiteiras de alta produção, devido à natureza fibrosa e o baixo teor energético que possui, contribuindo para balancear o consumo das quantidades de amido.

Cordeiro et al (2012) em sua proposta de utilização do RUC na alimentação humana, encontrou valores de proteína para o RUC sem processamento semelhantes ao encontrado por este trabalho (5,37%). O autor obteve 15,46% de carboidratos em suas análises, e concluiu que o RUC possui potencial para ser usado na alimentação humana devido a composição nutricional similar aos outros produtos consumidos pelos humanos.

Neste trabalho, a quantidade de água presente no RUC foi de fundamental importância para o processo fermentativo. Na análise de umidade inicial obteve-se um percentual de 80%, e o teor de umidade obtido para o ensaio 9 (44°, 150 rpm), após 28 horas de fermentação foi de 32%.

No que se trata da caracterização nutricional aplicada às necessidades dos animais, Mendonça (2012) ressalta a importância da quantidade de água presente no RUC, pois esta tende a aumentar o consumo voluntário de água e a retenção desta no organismo do animal.

Em contrapartida o consumo de matéria seca é um dos fatores mais importantes ao se formular uma dieta para ruminantes, devido à sua relação com o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais, afinal é a partir da matéria seca que o animal estará consumindo maior ou menor quantidade de nutrientes (BROCHIER; CARVALHO, 2009).

A figura a 6 traz o aspecto visual da perda de água durante o processo fermentativo.



Figura 6. Aspecto visual do RUC
a) Sem processamento. **b) Após 28 horas de fermentação.**

Cabral Filho et al (2007) fizeram testes de substituição do Feno de Tifton pelo RUC ensilado, em ovinos em manutenção. Para isso utilizaram inclusões de misturas de 33% RUC + feno, e 67% RUC + feno, contendo valores de PB de 15,9 e 19,6 %. A conclusão encontrada pelos autores aponta que, além de o RUC ser uma alternativa economicamente viável, a substituição das misturas com 33% de RUC melhorou a digestibilidade dos animais comparado à dietas exclusivas de feno. Já a substituição com 67% de RUC pode reduzir o consumo voluntário e a digestibilidade dos ovinos.

Tais quesitos apresentados a respeito da caracterização nutricional do RUC apontam que este tem grandes potencialidades na substituição de dietas de diferentes animais. Contudo, para que processo ocorra efetivamente se faz necessário um estudo aprofundado a respeito do resíduo, bem como da espécie de animal que se deseja alimentar.

5 CONCLUSÃO

- Devido à boa atuação do processo fermentativo em 28 horas, bem como as perdas encontradas no teor proteico, 32 horas não são necessárias para este processo de fermentação;
- A variável agitação não se mostrou significativa na faixa estudada, o que pode ser atribuído à dificuldade de deslocamento do substrato dentro do biorreator;
- A variável temperatura exerceu grande influencia sobre o processo pois, os maiores valores de enriquecimento se deram nas temperaturas de 40 e 44° C;
- De acordo com a grande variabilidade da composição química e nutricional do RUC, antes de sua aplicação devem ser realizados estudos de caracterização do mesmo;
- Ao final do processo fermentativo o RUC ainda possuía teor de umidade do considerável (32%), o que pode dificultar ou inviabilizar processos posteriores como transporte e manejo, portanto, torna-se interessante estudo de a aplicação de técnicas de secagem após o processo fermentativo;
- O DCCR utilizado se mostrou uma ferramenta eficiente para definir se as variáveis eram significativas, bem como, as melhores condições da fermentação.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Elaborar um planejamento experimental baseado nas condições ótimas de temperatura obtidas neste trabalho;
- Alterar (no sentido de aumentar) a faixa de agitação frente à faixa utilizada nos ensaios deste trabalho;
- Avaliar a aplicação de processos de secagem após o processo fermentativo, devido ao alto teor de umidade;
- Verificar se em concentrações diferentes que aplicada neste trabalho, a levedura também apresenta bons rendimentos.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Lúcia de Fátima; DIAS, Maria Vitória Carneiro; BRITO, Evaneusa Alves de; JÚNIOR, Salvino Oliveira. **Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal.** 2009. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v.3, n.3, p.47-53, set. 2009.

ARAÚJO, *Magno de Sousa*; ALMEIDA, *Mércia Melo de*; FORMIGA, *Anderson dos Santos*; MOTA, *José Carlos*, QUEIROZ, *Vital de Sousa*. **Aplicação da metodologia da superfície de resposta para otimização da fermentação alcoólica do soro de queijo.** 2014. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.* 2014.

AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de A. **Biotecnologia Industrial.** v. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001.

ARONOVICH, M. **Composição bromatológica e degradabilidade de silagens de resíduo úmido de cervejaria.** 1999. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ASCHERI, D. P. R.; BURGER, M. C. M.; MALHEIROS, L. V.; OLIVEIRA, V. N. Curvas de secagem e caracterização de hidrolisados de bagaço de cevada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. **Recursos não renováveis.** Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/10/10-380-261.htm>>. Acesso em: 19 de novembro 2015.

BOFFO, Eduardo Vieira. **Análise da cinética de secagem e processamento da mistura de bagaço de malte e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) provenientes da indústria cervejeira.** 2014. 75 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal, *campus* Toledo) 2014.

BOURSCHEIDT, Cristiane Thaís; OLIVEIRA, Bárbara Hahn de; SILVA, Gracinda Marina Castelo da. **Avaliação do resíduo do bagaço de malte da alimentação animal.** 2010. 5 f. EXPOUT 2010. Anais do II ENDICT – Encontro de divulgação científica e tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Toledo.

BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia Industrial**. v. 1. São Paulo: Editora Blücher, 2001.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 1997.

BROCHIER, Mariana Augusta; CARVALHO, Sérgio. **Aspectos ambientais, produtivos e econômicos do aproveitamento de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cordeiros em sistema de confinamento**. 2009. 8f. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria: 2009.

BUTOLO, José E. **Uso da biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras fontes de nutrientes**. In: WORKSHOP – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, p. 70-89, 1996.

BUTTON, Sérgio Tonini. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. 2005. 88 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas: 2005.

CABRAL FILHO, Sergio Lucio Solomon. **Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares correlatas**. 1999. 82 f. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo. Piracicaba: 1999.

CABRAL FILHO, Sérgio Lúcio Solomon., BUENO, Ives Cláudio da Silva, ABDALLA Adibe Luiz. **Substituição do feno de tifton pelo resíduo úmido de cervejaria em dietas de ovinos em manutenção**. 2007. Laboratório de Nutrição Animal. Universidade de São Paulo. Piracicaba: 2007.

CALADO, Verônica; MONTGOMERY, Douglas C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: Editora E-pappers Serviços Editoriais, 2003. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=1Yp7Q23dcLcC&pg=PA7&lpg=PA7&dq=Planejamento+de+Experimentos+usando+o+Statistica&source=bl&ots=8uui_j0RIF&sig=C h8bWz7jWc2jmXVIKfISNNw8Nnc&hl=pt-BR&sa=X&ei=ceFwVKCHGK- wsATdr4LgBg&ved=0CDYQ6AEwBA#v=onepage&q=Planejamento%20de%20Experimentos%20usando%20o%20Statistica&f=false>. Acesso em 20 de novembro de 2015.

CAMPOS, Ana Regina Nascimento; SANTANA, Renato Alexandre Costa de.; DANTAS, José Pires.; OLIVEIRA, Líbia de Sousa Conrado.; SILVA Flávio Luiz Honorato da. **Enriquecimento proteico do bagaço do pedúnculo do caju por cultivo semi-sólido**. Revista de Biologia e Ciência da Terra. Vol. 5 nº 2. 2005.

CARVALHO, Flavio Condé de. **Disponibilidade resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas**. 1993. 16f. Simpósio Utilização de Subprodutos Agroindustriais e Resíduos de Colheita na Alimentação de Ruminantes. São Paulo: 1993.

CERVBRASIL. Associação brasileira da indústria da cerveja. **Mercado Cervejeiro**. Disponível em <<http://cervbrasil.org.br/category/mercado-cervejeiro/>>. Acesso em 28 de maio de 2016.

CORDEIRO, Luana Gomes. **Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. 2011. 120 f. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa: 2011.

CORDEIRO, Luana Gomes; EL-AOUAR, Ânoar Abbas; GURMÃO, Rennan Pereira. **Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias**. 2012. 3 f. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia. João Pessoa: 2012.

DHIMAN T. R., BINGHAM, H. R., RADLOFFT H. D. **Production Response of Lactating Cows Fed Dried Versus Wet Brewers' Grain in Diets with Similar Dry Matter Content**. 2003. Animal Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University. 2003.

FILHO, Waldemar Gastoni Venturini. **Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. 1ª Ed. 2010. Vol. 1. Editora Blucher.

FREITAS, A. C. de; CASTRO; R. J. S. de; PINTO G. A. S. **Estudo das condições de extração de protease em processo fermentativo semi-sólido**. 2010. 6 f. XVIII Congresso brasileiro de Engenharia Química, V Congresso brasileiro de termodinâmica aplicada, VIII Encontro brasileiro de Adsorção. Foz do Iguaçu: 2010.

GERON, Luiz Juliano Valério; ZEOULA, Lúcia Maria; BRANCO, Antônio Ferriani; ERKE, Jacco Arnoud; PRADO, Odimari Priscila Pires do; JACOBI, Guido. **Caracterização, fracionamento protéico, degradabilidade ruminal e digestibilidade in vitro da matéria seca e proteína bruta do resíduo de**

cervejaria úmido e fermentado. 2007. Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá. Maringá: 2007.

GERON, Luiz Juliano Valério; ZEOULA, Lúcia Maria; ERKEL, Jacco Arnoud; PRADO, Ivanor Nunes do; BUBLITZ Eder; PRADO, Odimari Priscila Pires do. **Consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite de vacas alimentadas com resíduo de cervejaria fermentado.** 2010. 8 f. Departamento de zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá: 2010.

HELD, Paul. Principal Scientist, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of Saccharomyces Cerevisiae The Utility of Synergy™.** H1 for Providing High Quality Kinetic Data for Yeast Growth Applications. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. IV ed. 1ª ed. digital. Versão eletrônica: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOHNSON C.O.L.E., HUBER J. T., KING, K. J.. **Storage and Utilization of Brewers Wet Grains in Diets for Lactating Dairy Cows.** 1987. Department of Animal Science, Michigan State University. 1987.

KLAGENBOECH, Rafaeli. **Estudo da secagem da mistura de biomassa de levedura (Saccharomyces cerevisiae) e bagaço de malte resíduos da indústria cervejeira.** 2012. 64 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2012.

KLAGENBOECH, Rafaeli; THOMAZINI, Maria Helena; SILVA, Gracinda Marina Castelo da. **Resíduo úmido de cervejaria: uma alternativa na alimentação animal.** 2011. 7 f. Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Toledo.

LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. **Application of a multi-layer packedbed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review.** Process Biochemistry, v. 33, n. 2, p. 117-123, 1998.

MELNIKOV, Giuliano Marcelo Dragone. **Fermentação primária para produção de cervejas de alta densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte.** 2007. 140f. Tese - Doutorado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2007.

MENDONÇA, Lícia Mendes. **Utilização do resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cabras anglo nubiana em final de lactação.** Universidade Federal de Sergipe. Núcleo de Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais. São Cristóvão: 2012.

MENEZES, Maraísa L. de. **Remoção do Corante Reativo Azul 5G a partir de Soluções Aquosas Utilizando o Bagaço do Maracujá Amarelo como Adsorvente.** 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

OETTERER, Marília; D'ARCE, MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO; SPOTO, MARTA. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos.** Editora Manole Ltda, 2006.

PELCZAR, MJ; REID, R; CHAM, ECS. Fungos: As Leveduras. In: **Microbiologia** (vol.1), pp. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 198.

PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; BRITO, Edy Sousa de; ANDRADE, Andrea Maria Rodrigues; FRAGA, Sandra Lúcia Pinheiro. TEIXEIRA, Renata Beltrão. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais.** 2005. 5f. Embrapa, Fortaleza: 2005.

ROCHA, A.P.T. **Estudo do desempenho de um leito de jorro convencional para secagem de leveduras.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, 2002.

SANTOS, Mateus Sales dos. RIBEIRO, Flávio de Miranda. **Cervejas e refrigerantes.** São Paulo : CETESB, 2005. 58 p.

SANTOS, Sharline Florentino de Melo; SOUZA, Rosane Liege Alves de; ALTCÂNTARA, Siumara R.; PINTO, Gustavo Adolfo Saavedra; SILVA, Flávio Luiz Honorato da.; MACEDO, Gorete Ribeiro de. **Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju.** 2008. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.10, n.2, p.101-109, 2008.

SANTOS, Tamires Carvalho dos. **Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento proteico para utilização na alimentação de ruminantes.** 2013. Programa de Pós-

Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetininga: 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica**. v.2. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001.

SICOBÉ. Sistema de Controle de Produção de Bebidas. 2014. Disponível em:<http://gerencialpublico.cmb.gov.br/PROD_BEBIDAS_EMBALAGEM_REGIAO_2015_2016.html>. Acesso em 28 de maio de 2016.

VELASCO, Frederico Osório; GONÇALVES, Lúcio Carlos; TEIXEIRA, Alex de Matos; FARIA Jr., Wilson Gonçalves de; MAGALHÃES, Felipe Antunes. **Alimentos para gado de leite**. Editores: Lúcio Carlos Gonçalves, Iran Borges, Pedro Dias Sales Ferreira. Editora FEPMVZ. Belo Horizonte: 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Tabela de Valores de PB (%) obtidos após o processo fermentativo, média de duplicata.

Ensaio/tempo	2h	4h	8h
Ensaio 1	5,7973 ± 0,34	5,4413 ± 0,67	5,7847 ± 0,41
Ensaio 2	5,0634 ± 0,32	5,0001 ± 0,27	6,8772 ± 0,5
Ensaio 3	4,9421 ± 0,14	5,7054 ± 0,3	5,0050 ± 0,1
Ensaio 4	5,0918 ± 0,14	4,4782 ± 0,26	5,5501 ± 0,23
Ensaio 5	5,1870 ± 1,57	5,1304 ± 1,73	6,2601 ± 0,59
Ensaio 6	6,0295 ± 0,38	6,1215 ± 0,25	6,2151 ± 0,77
Ensaio 7	5,8618 ± 0,4	6,1766 ± 0,7	6,7522 ± 0,48
Ensaio 8	5,1198 ± 0,31	5,0170 ± 0,38	5,4677 ± 0,03
Ensaio 9	6,2549 ± 0,13	6,2840 ± 0,02	6,6038 ± 0,1
Ensaio 10	5,4677 ± 0,18	5,5148 ± 0,33	6,0653 ± 0,02
Ensaio 11	5,0001 ± 0,14	6,0261 ± 0,02	5,0103 ± 0,07

Ensaio/tempo	12h	24h	28h	32h
Ensaio 1	6,9733 ± 0,99	7,2641 ± 0,11	7,9987 ± 0,18	8,1620 ± 0,1
Ensaio 2	8,0094 ± 0,65	7,3531 ± 0,48	9,2200 ± 0,45	9,0927 ± 0,48
Ensaio 3	4,6411 ± 0,22	5,5200 ± 0,89	6,6913 ± 0,01	6,5895 ± 0,01
Ensaio 4	6,9498 ± 0,32	7,5094 ± 0,46	9,5979 ± 0,42	10,8070 ± 1,45
Ensaio 5	6,7356 ± 0,02	7,0940 ± 0,46	8,6112 ± 0,57	7,8516 ± 0,64
Ensaio 6	7,4624 ± 0,3	6,0214 ± 0,18	7,9375 ± 0,1	7,7034 ± 0,41
Ensaio 7	6,7493 ± 0,48	6,8530 ± 2,06	8,0878 ± 0,1	7,9310 ± 0,3
Ensaio 8	5,7354 ± 0,28	7,0283 ± 0,32	8,5398 ± 0,76	7,9453 ± 0,51
Ensaio 9	7,1325 ± 0,22	9,7638 ± 0,73	15,5611 ± 1,1	13,8830 ± 0,03
Ensaio 10	5,9703 ± 0,04	8,3145 ± 0,02	9,2230 ± 0,1	7,9373 ± 0,5
Ensaio 11	5,1212 ± 0,3	7,0490 ± 0,28	7,5002 ± 0,52	7,7733 ± 0,11

Fonte: O autor

Nota: Ensaio 1: T=20 °C, A=100 rpm; Ensaio 2: T=40 °C, A=200 rpm; Ensaio 3: T=20 °C, A=200 rpm; Ensaio 4: T=40 °C, A=100 rpm; Ensaio 5: T=30 °C, A=150 rpm; Ensaio 6: T=30 °C, A=150 rpm; Ensaio 7: T=30 °C, A=150 rpm; Ensaio 8: T=16 °C, A=150 rpm; Ensaio 9: T=44 °C, A=150 rpm; Ensaio 10: T=30 °C, A=221 rpm; Ensaio 11: T=30 °C, A=79 rpm.