

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

JOÃO HENRIQUE DOS PASSOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL PELA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO
PERMEADO DE SORO DE LEITE COM *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2015

JOÃO HENRIQUE DOS PASSOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL PELA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO
PERMEADO DE SORO DE LEITE COM *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentada à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnologia Federal do Paraná – UTFPR *Campus* Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gracinda Marina Castelo da Silva.

TOLEDO

2015

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

JOAO HENRIQUE DOS PASSOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL PELA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO
PERMEADO DE SORO DE LEITE COM *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

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

Profª Drª Gracinda Marina Castelo Da Silva
Orientadora

Profª Drª Karina Graziella Fiametti Colombo
Co-orientadora

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
Banca

Prof. Dr. Clóvis Bombardelli
Banca

Toledo, dezembro de 2015.

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

“O grande rio tem seu trajeto, antes do mar imenso. Copiando-lhe a expressão, a alma percorre igualmente caminhos variados e etapas diversas, também recebendo afluentes de conhecimentos, aqui e ali, avoluma-se em expressão e purifica-se em qualidade, antes de encontrar o oceano eterno da sabedoria”. Emmanuel, por Francisco Cândido Xavier.

RESUMO

PASSOS, João Henrique. **PRODUÇÃO DE ETANOL PELA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO PERMEADO DE SORO DE LEITE COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2015.

O soro do leite é um subproduto da fabricação de queijo, constituído por uma mistura de proteínas, lactose, sais minerais, gordura e água. Estima-se que em média a fabricação de 1 kg de queijo necessita de 10 litros de leite e fornece 9 litros de soro, que pode ser visto como um agente poluidor, devido a alta DBO (Demanda biológica de oxigênio), ou como um produto nobre, devido aos teores de proteínas solúveis e lactose. O permeado de soro de leite é formado quando o soro de leite passa pelo processo de separação por membranas e centrifugação, onde são retiradas as proteínas e as gorduras, respectivamente. Este trabalho teve como objetivo elaborar um planejamento experimental 3^2 , variando os valores de temperatura e pH em três níveis, e avaliar a melhor condição para a fermentação do permeado de soro leite, após a sua hidrólise com a enzima lactase (β -Galactosidase), por meio da *Saccharomyces cerevisiae* e realizar análises de caracterização do permeado e controle de crescimento da biomassa, pH e produção de etanol durante o tempo de fermentação. O presente trabalho contou com 12 ensaios de fermentação para a conversão de glicose em etanol, com tempo total de fermentação de 32 horas, sendo utilizados valores de pH, 4,0, 4,5 e 5,0 e temperaturas de 25, 30 e 35 °C. Com os resultados encontrados foi elaborado o planejamento experimental e encontrado a condição com maior produção de etanol, sendo esta a que utilizou um pH de 4,0 e temperatura de 35° C, produzindo uma quantidade de 41,80 g/L de etanol, apresentando um rendimento de 75,80 %.

Palavras-chave: Permeado de soro de leite, etanol, fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

PASSOS, João Henrique. **ETHANOL PRODUCTION BY ALCOHOLIC FERMENTATION USING WHEY PERMEATE WITH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***. Completion of course work, Federal Technological University of Paraná. Toledo, 2015.

Whey is a by-product of cheese manufacturing, comprising a mixture of proteins, lactose, minerals, fat and water. It is estimated that the production of 1 kg cheese requires 10 liters of milk and provides 9 liters of whey, which can be regarded as a polluting agent to high BOD (Biological Oxygen Demand), or as a noble product, because the levels of soluble proteins and lactose. The whey permeate is formed when the whey pass through the process of membrane separation and centrifugation, where proteins and fats are removed, respectively. This study aimed to develop an 32 experimental design, varying the temperature and pH values on three levels, and evaluate the best condition for the fermentation of whey permeate, after the hydrolysis with the enzyme lactase (β -galactosidase), by *Saccharomyces cerevisiae* and performing analysis for the characterization and control of the permeate growth of biomass, pH and ethanol production during fermentation time. The present study was 12 fermentation trials for the conversion of glucose to ethanol with total fermentation time of 32 hours, use pH values, 4.0, 4.5 and 5.0, and temperatures of 25, 30 and 35 ° C. To the results it was developed the experimental design and It was possible to find the condition with increased ethanol production, this being used to a pH of 4.0 and a temperature of 35 ° C producing an amount of 41.80 g / L ethanol, with a yield of 75,80 %.

Keywords: whey permeate, ethanol, alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias Químicas
CPS	Concentrado Proteico de Soro
D	Diálise
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
ED	Eletrodiálise
g	gramas
IPS	Isolado Proteico de Soro
k	kilo
L	Litro
m	mili
MF	Micro Filtração
NF	Nano Filtração
OI	Osmose inversa
PET	Politereftalato de Etileno
PG	Pervaporação Gasosa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSM	Processo de Separação por Membranas
PV	Pervaporação
UF	Ultra Filtração
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
β	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de fabricação de queijos, caseína, concentrado protéico de soro e permeado de soro de leite.....	15
Figura 2 - Representação do processo de separação por membranas.....	18
Figura 3 - Estrutura química da lactose.....	21
Figura 4 - Fases da curva de crescimento microbiano.....	23
Figura 5 - Processo de hidrólise da glicose pela enzima β -galactosidase.....	24
Figura 6 - Biorreator simples feito com garrafa PET.....	31
Figura 7 - Esquema da câmara de Neubauer.....	39
Figura 8 - Gráfico de valores preditos por valores observados.....	44
Figura 9 - Diagrama de Pareto.....	45
Figura 10 - Gráfico de Superfície de Resposta da produção de etanol.....	46
Figura 11 - Análises realizadas para o controle de Biomassa, °Brix, Etanol e pH durante o período de fermentação para os ensaios de 1 à 6.....	48
Figura 12 - Análises realizadas para o controle de Biomassa, °Brix, Etanol e pH durante o período de fermentação para os ensaios de 7 à 12.....	49
Figura 13 - Consumo de açúcares redutores através do tempo de fermentação	50
Figura 14 – Produção de etanol para os ensaios de 1 à 12.....	51
Figura 15 – Curvas de produção de etanol através do tempo.....	52
Figura 16 – Gráfico para a condição que apresentou maior produção de etanol utilizando uma temperatura de 35 °C e um pH de 4,0.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos soros de leite doce e ácido.....	17
Tabela 2 - Exemplo de uma matriz de um planejamento fatorial 2^3	27
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 com 3 repetições no ponto central.	29
Tabela 4 - Caracterização e comparação do permeado de soro de leite.....	41
Tabela 5 -Caracterização e comparação dos nutrientes contidos no permeado de soro de leite	42
Tabela 6 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 com 3 repetições no ponto central..	43
Tabela 7 – ANOVA.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS.....	15
2.2 SORO DE LEITE.....	16
2.3 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	18
2.3.1 Ultrafiltração	19
2.3.2 Permeado de soro de leite	19
2.4 LACTOSE.....	21
2.5 LEVEDURA	21
2.5.1 Hidrólise da lactose	23
2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	25
2.6.1 Temperatura.....	26
2.6.3 Concentração do inóculo.....	26
2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 OBTENÇÃO DO PERMEADO SORO DE LEITE	28
3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE	29
3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	30
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	32
3.5.1 Caracterização do Permeado de Soro de Leite.....	32
3.5.1.1 Determinação de resíduo por incineração (cinzas).	32
3.5.1.3 Determinação de lipídeos.....	33
3.5.1.4 Determinação dos nutrientes.....	34
3.5.1.5 Proteínas	34
3.5.1.6 Umidade	36
3.5.2.1 Determinação de graus Brix	36
3.5.2.2 Determinação do pH.....	37
3.5.2.3 Determinação do teor alcoólico	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE.....	40

4.2 Planejamento experimental	42
5 CONCLUSÕES	54
6 SUGESTÕES	55
REFERÊNCIAS	56
Anexo 1. Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa.	62

1 INTRODUÇÃO

Entre os principais efluentes do setor de laticínios encontra-se o soro de leite, que se for visto como efluente industrial representa grandes riscos ao meio ambiente devido a sua alta carga orgânica, apresentando uma elevada DBO. Os níveis de DBO do soro de leite são de 50.000 mg/L, contra cerca de 500 mg/L do esgoto doméstico, ou seja, o soro de leite apresenta um potencial poluidor cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico (MIGLIORANZA, 2002).

A descarga deste resíduo no meio ambiente constitui uma perda significativa de alimento em potencial e energia. Devido à quantidade de matéria orgânica determinada pelas proteínas, lactose e gordura, que justifica seus altos índices de DBO que se refere à quantidade de oxigênio necessária para que ocorra a degradação bioquímica de material orgânico em questão (PONSANO; PINTO; GOMEZ, 1992).

Em média para a fabricação de 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite e esta quantidade fornece cerca de 9 litros de soro (BARBOSA et al, 2010; ANTUNES, 2003; FLORENCIO, 2013). Segundo os últimos dados fornecidos pela ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijos), o país teve uma produção de queijo de 867 mil toneladas no ano de 2011 (SEBRAE, 2014), o que representa uma quantidade aproximada de 7,8 bilhões de litros de soro produzido neste ano.

Com uma grande demanda de produtos que geram como resíduo o soro de leite, acaba sendo necessária a preocupação e o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização deste resíduo, e torná-lo em uma matéria prima para a produção de outros produtos.

A utilização da fermentação alcoólica para a produção de etanol utilizando o soro de leite, tem-se mostrado uma maneira eficaz para a reutilização desse resíduo, pois ela age como um meio de desenvolvimento de novos produtos, trazendo um benefício econômico e ambiental.

Segundo Gabardo (2011), o aproveitamento do soro de queijo em novos processos produtivos ainda não é uma realidade mundial, muito embora a abordagem deste como um resíduo industrial venha sendo oportunamente abandonada. Este subproduto caracteriza-se como rico em nutrientes, com quantidades apreciáveis de lactose, proteínas e sais minerais, constituindo, portanto em um potencial substrato para realização de processos biotecnológicos.

Adicionalmente no Brasil, esse subproduto industrial pode ser obtido a um baixo custo fato que estimula a sua utilização em diversos bioprocessos tais como aqueles que remetem a conversão da lactose para a produção de metabolitos de interesse como o etanol (GABARDO, 2011).

A produção de álcool através da fermentação do soro tem sido estimulada pela crescente necessidade mundial de energia, além de representar uma forma simples de tratamento e disposição de grandes quantidades de soro de leite produzido pela indústria de alimentos (KOSIKOWSKI, 1979).

Devido a essa grande geração de soro de leite produzido pelas indústrias de queijo, surge um grande interesse quanto a sua utilização. Segundo Neves (1993) o soro de leite pode ser visto sob dois aspectos: como agente de poluição, se considerado produto descartável, ou pode ser considerado produto nobre pelo seu teor de proteínas solúveis, ricas em aminoácidos essenciais, pela presença de vitaminas do grupo B e pelo elevado teor de lactose e sais minerais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produção de etanol a partir da fermentação alcoólica do permeado de soro de leite utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Elaborar um planejamento experimental avaliando as melhores condições para a fermentação alcoólica do permeado do soro de leite, com as variações do pH e temperatura utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Realizar ensaios do fermentado alcoólico do soro de leite nas melhores condições obtidas do planejamento experimental.
 - Efetuar análises para a caracterização do permeado do soro de leite.
 - Avaliar o rendimento de etanol na fermentação alcoólica do soro de leite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS

A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria alimentícia, e sua contribuição material em termos de poluição de águas receptoras é significativa, sendo, portanto, necessário o obrigatório tratamento prévio de seus despejos líquidos antes do lançamento (BRIÃO; TAVARES, 2005).

A produção de queijo é responsável pela geração de grandes quantidades de soro de leite, porque consiste em precipitar a caseína por meio da coagulação do leite. Este soro, se rejeitado como efluente, constitui grave problema ambiental, já que muitas queijarias o lançam sem qualquer tratamento, dado a dificuldade encontrada para lucrar com o seu aproveitamento e aos custos que o tratamento representa às empresas (BRIÃO; TAVARES, 2005).

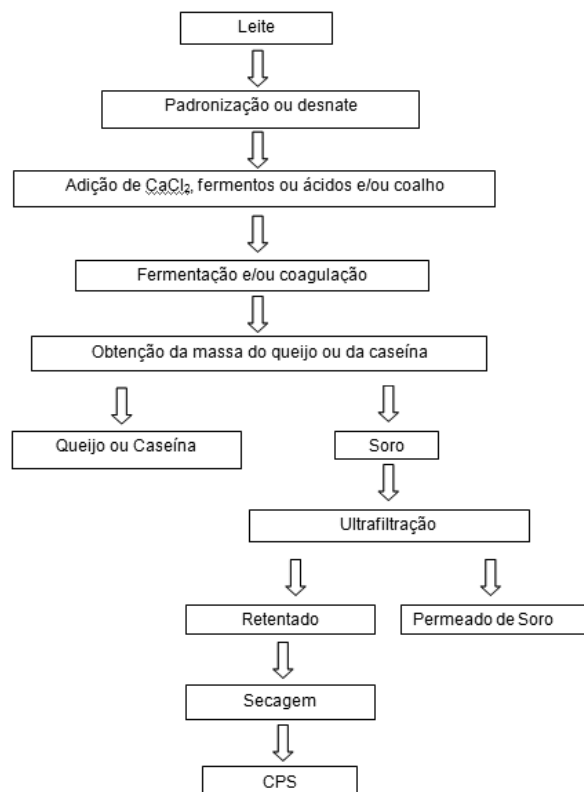


Figura 1 - Etapas de fabricação de queijos, caseína, concentrado protéico de soro e permeado de soro de leite.

Fonte: Zacarchenco (2012).

A Figura 1 (ZACARCHENCO, 2012), apresenta as etapas de fabricação do queijo, caseína, concentrado protéico de soro (CPS) e permeado de soro, em que o leite cru passa por um processo de padronização antes da adição dos agentes que causaram as mudanças no leite, de acordo com o produto que se deseja obter. Com a coagulação ou a fermentação causada por essa adição, obtém-se a massa do queijo, composta pela proteína caseína, que quando separada resultara em dois produtos; queijo e soro.

O soro obtido por esse processo ao passar pelo processo de ultrafiltração gera o retentado, que após a secagem da origem ao concentrado proteico de soro (CPS) e o permeado de soro.

2.2 SORO DE LEITE

Soro de leite ou soro de queijo é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante o processo da fabricação do queijo (SISO, 1996). A coagulação pode ocorrer por duas vias: via ácida, quando a remoção da caseína é feita pela adição de ácido (pH 4,6), ou por via enzimática, feita pela adição de enzima renina, gerando assim, respectivamente, o soro ácido e o soro doce, respectivamente (SGARBIERI, 1996).

Segundo Madrid (1995) a composição do soro varia com a qualidade do leite e com o tipo de queijo que foi produzido. Soros ácidos e doces diferem bastante no conteúdo de sais minerais, não apresentando muitas variações nas quantidades de gordura, umidade e proteínas. Nas caracterizações do soro de leite realizadas por Madrid (1995) e Antunes (2013) apresentaram variações significativas da porcentagem de lactose nos soros ácido e doce, sendo o soro doce, o que apresentou maior quantidade de lactose, conforme mostrado na Tabela 1.

As aplicações do soro de leite como um produto nobre, são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, misturas secas, panificação, chocolate, cereais, aperitivos, bebidas, material combustível, fertilizante e alimentação animal (FLORENCIO et al, 2013).

Entre as diversas aplicações de soro de leite, uma que ganhou destaque e já vem sendo estudada a vários anos, é de utilizá-lo como um meio de cultura, pois devido ao seu valor nutricional, composição e alto teor de lactose, açúcar fermentescível por excelência, fazem do soro de leite um substrato bastante

interessante e atraente para a utilização em processos fermentativos, obtendo-se vários produtos, como ácido láctico, butanol e etanol, entre outros (FLORENCIO et al, 2013).

Tabela 1 - Composição dos soros de leite doce e ácido.

Composição	Madrid (1995)		Antunes (2003)	
	Doce (%)	Ácido (%)	Doce (%)	Ácido (%)
Umidade	93-94	94-95	-	-
Gordura	0,3-0,5	0,3-0,6	0,5	0,04
Proteínas	0,8-1,0	0,8-1,0	0,80	0,75
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2	4,60	4,20
Minerais	0,5-0,7	0,7-0,8	-	-
Ácido Láctico e outros	0,1	0,1-0,8	0,05	0,4

Fonte – Madrid (1995); Antunes (2003).

Entre as diversas aplicações de soro de leite, uma que ganhou destaque e já vem sendo estudada a vários anos, é de utilizá-lo como um meio de cultura, pois devido ao seu valor nutricional, composição e alto teor de lactose, açúcar fermentescível por excelência, fazem do soro de leite um substrato bastante interessante e atraente para a utilização em processos fermentativos, obtendo-se vários produtos, como ácido láctico, butanol e etanol, entre outros (FLORENCIO et al, 2013).

Em um estudo realizado por Florêncio (2013), utilizando o soro de leite como substrato para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi avaliada a maior produção de etanol através de variações com concentrações diferentes de sacarose e de levedura, onde se obtiveram uma produção de 76,14 % de conversão do substrato em etanol.

Souza (2005) também utilizou a *Saccharomyces cerevisiae*, para fermentação do soro de leite, foram alteradas concentrações de soro, de enzima e de inóculo e utilizadas às condições fixas de 30 °C e um pH de 4,5, sendo que as melhores condições encontradas foram de 90 g/L de soro, 0,4 g/L de enzima e 70 g/L de inóculo, produzindo um rendimento de 93,9 %.

2.3 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Segundo Baldasso (2008) os processos de separação por membranas (PSM) são operações que utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões, envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes, seu objetivo principal é a separação, a concentração e/ou a purificação de qualquer componente presente em solução.

As membranas são definidas como uma interface ou uma barreira semi-seletiva que separa duas fases (alimentação e permeado) e restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nestas fases, de acordo com seu tamanho, formato e características (BALDASSO, 2008). A Figura 2, a baixo, representa de maneira geral o processo de separação por membranas.

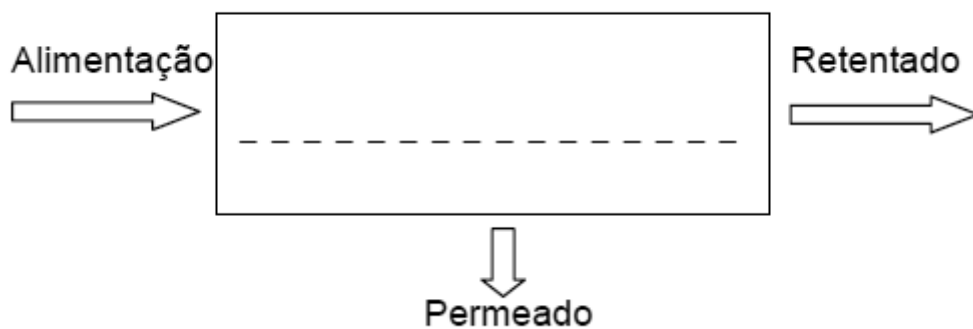


Figura 2 - Representação do processo de separação por membranas.

Fonte: Mulder (1996).

Os processos de separação por membranas podem ser divididos em dois tipos: aqueles que envolvem a difusão do solvente (água) e os que envolvem a difusão do soluto. Os primeiros, mais comumente utilizados industrialmente, são denominados de processos de osmose e envolvem a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (OI); os demais se denominam processos de diálise (D) e envolvem a eletrodialise (ED), a pervaporação (PV) e a permeação gasosa (PG) (MULDER, 1996).

Processos baseados em membranas como a microfiltração, ultrafiltração e a nanofiltração, têm sido apontados como uma boa solução, justamente por serem processos de baixo consumo energético e que proporcionam um tratamento

eficiente, quer para recuperar produtos celulares ou intracelulares, quer para obter o produto clarificado (MOREIRA, 2011).

O processo da ultrafiltração é o mais comum para a obtenção do permeado e do concentrado de soro de leite com propriedades específicas, pois concentra as proteínas e permite a permeação dos componentes de baixa massa molecular, como lactose e minerais (BALDASSO, 2008).

2.3.1 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas e consiste na filtração através de membranas semipermeáveis, com capacidade para reter macromoléculas, como polímeros, pigmentos, proteínas e polissacarídeos e permitindo que moléculas de baixa massa molar atravessem a membrana (MOREIRA, 2011)

As membranas da ultrafiltração apresentam poros na faixa de 1 a 100 nm. Como eles são menores, uma força motriz maior é necessária para se obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. A membrana é feita de uma fina camada de material orgânico ou inorgânico capaz de separar uma corrente líquida de alimentação em duas parcelas, a concentrado e o permeado, em função das propriedades químicas e físicas (MOREIRA, 2011).

2.3.2 Permeado de soro de leite

No processo de ultrafiltração, o soro pode ser separado em duas frações: o retentado, para produção de concentrado proteico de soro (CPS) em concentrações diferentes de 35, 60 ou 80 %, ou mesmo, isolado proteico de soro (IPS) com conteúdo de proteína superior a 90 % em base sólida e o permeado (PEREIRA, 2009).

O permeado de soro de queijo, devido à retirada das proteínas no processo da ultrafiltração resulta em uma fração que contém basicamente lactose que pode ser utilizado para diversos fins na alimentação de animais, na produção de lactose

ou galactose e outros sais como a glicose, álcool, ácido lático (DOMINGUES et al. 1999).

Na caracterização do permeado do soro de leite, utilizado neste trabalho, realizada por Baller (2014) foram encontrados valores de pH de 6,38, lipídeos 0,00 % ; proteínas 0,60 % ; °Brix 14,10; umidade de 85,90 %; cinzas 0,79 % e 10,90 % de lactose.

As proteínas do soro, retiradas pela ultrafiltração são amplamente utilizadas na indústria de alimentos por apresentarem ótimas propriedades funcionais e tecnológicas. Quando não desnaturadas, as proteínas do soro de queijo são boas formadoras de espumas, emulsões e géis (PEREIRA, 2009).

Devido à formação de espumas a utilização do soro de leite diminui a eficiência do processo de destilação, pois, segundo Belincanta (2004), a condição mais importante para se obter uma eficiência satisfatória é aquela na qual os pratos da coluna de destilação operem adequadamente, pois qualquer operação defeituosa da coluna, tal como excessiva formação de espuma ou arraste, má distribuição de vapor, gotejamento ou não retenção de líquido sobre os pratos, dão lugar a uma diminuição da eficiência do processo.

Observa-se que a utilização do permeado do soro de leite para o processo fermentativo e posterior destilação, traz uma diminuição da formação de espuma em excesso, causada pelas proteínas contidas no soro de queijo, uma vez que o permeado não possui proteínas em sua composição, apenas lactose e alguns sais minerais.

Desta forma o permeado de soro de leite representa um ótimo substrato, e entre trabalhos utilizando este substrato o realizado por Assunção (2013) se destaca, no qual se avaliou o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes meios utilizando o permeado de soro de queijo com e sem suplementação. Nas condições de 30 °C e pH 5,0, em que a levedura apresentou um bom crescimento no meio *in natura* que continha apenas o permeado de soro.

Domingues et al (1999) também utilizou o permeado como substrato, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para hidrolisar a lactose, utilizando um valor de pH de 4,00 e 30 °C, e encontrando uma conversão de substrato em etanol em torno de 80 %.

2.4 LACTOSE

A lactose é o açúcar característico do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da matéria seca do leite. É quantitativamente o mais importante dos sólidos não graxos (LONGO, 2006).

É um dissacarídeo constituído por um radical β -D-galactose e um radical D-glicose. A lactose é considerada um açúcar redutor, por que o grupo no carbono anomérico¹ da porção glicose não esta envolvido na ligação glicosídica, portanto, ela esta livre para reagir como agentes oxidantes (CAMPBELL, 2012). A Figura 3 representa a estrutura da lactose.

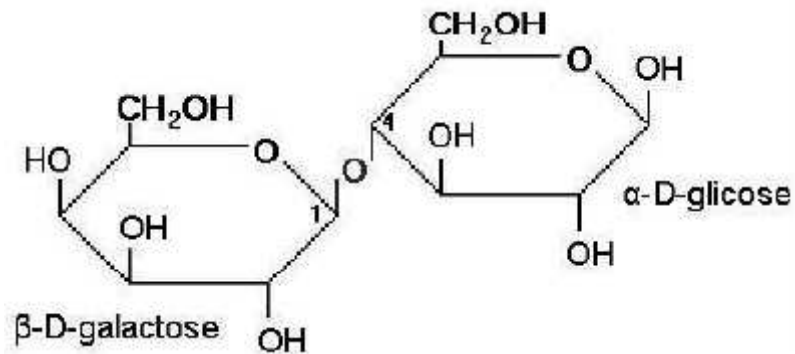


Figura 3 - Estrutura química da lactose.

Fonte: Campbell (2012).

Segundo Longo (2006) a lactose tem o mesmo peso molecular da sacarose da qual difere, contudo, na configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e no poder redutor. A lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose, esta característica pode causar cristalização e, conseqüentemente, problemas tecnológicos durante o processamento de alguns produtos na indústria de laticínios.

A lactose também apresenta baixo poder adoçante, contudo seus componentes monossacarídeos, glicose e galactose, possuem maior poder adoçante que a lactose, além de outras características desejáveis (VIEIRA, 2006).

¹Carbono que pode realizar quatro ligações químicas diferentes (SOLOMONS, 2001).

2.5 LEVEDURA

As leveduras são uma espécie de “bolor” e são encontradas na natureza ou produzidas em laboratórios. A fermentação alcoólica causada por elas ocorre devido ao fato de que as células de levedo produzem a energia que lhes é necessária para sobreviver, através de dois fenômenos de degradação da matéria orgânica: a respiração que necessita do oxigênio ou a fermentação que ocorre na ausência de oxigênio do ar (BARBOSA, 2010).

Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformado em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, chamado de fermentação alcoólica (LIMA et al, 2001)

Barbosa (2010) relatou que entre os microorganismos mais eficientes na fermentação, estão as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marcianus* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, destacando-se o gênero *Saccharomyces* pela alta produção e tolerância a altas concentrações de etanol.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um micro organismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose, sendo que os produtos finais da metabolização irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra (LIMA et al, 2001).

Lima et al. (2001) ressalta que a levedura do gênero *Saccharomyces* representa uma importância econômica em processos biotecnológicos, e que é um dos microrganismos mais estudados e cujo metabolismo é o mais conhecido.

Apesar de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentar uma grande variedade de açúcares, não é capaz de hidrolisar a lactose, devido à ausência da enzima β- galactosidase (que hidrolisa este açúcar em glicose e galactose) e da permeabilidade da lactose, que permite a entrada da lactose para o interior das células. (FARAHNAK et al., 1986).

O desenvolvimento da levedura durante o processo de fermentação poderá ser observado através do gráfico global de crescimento de micro organismos (Figura 4). O gráfico representa as várias fases das concentrações de leveduras durante o período de fermentação (ALTERTHUMM, 2008).

A primeira delas é a fase “lag, a fase inicial e de adaptação da levedura, onde não são observados um aumento significativo na sua concentração. A segunda fase

é a chamada de “log”, a fase de crescimento exponencial, onde os micro organismos se encontram em plena atividade e a sua velocidade de crescimento é muito alta (ALTERTHUMM, 2008).

A terceira fase, fase estacionária, mostra a fase onde a população de leveduras já está em grande número e o meio já não fornecendo nutrientes e condição para suportar um crescimento muito elevado, portanto nessa fase temos a diminuição do crescimento. Onde o crescimento vai diminuindo até atingir a fase em que o número de novas células de leveduras é igual ao número de células de leveduras que morre. A última fase é a fase de declínio, onde o número de organismos que morre se torna progressivamente superior aos dos que surgem. (ALTERTHUMM, 2008).

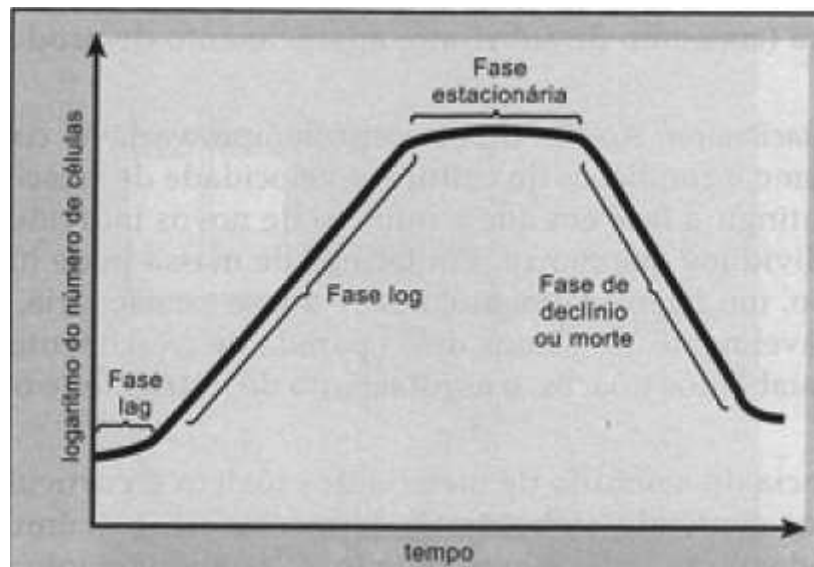


Figura 4 – Fases da curva de crescimento microbiano.
Fonte: Alterthumm (2008).

2.5.1 Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose é uma reação que ocorre na digestão da lactose. A lactose é hidrolisada pela enzima lactase, ao nível de mucosa intestinal, em dois monossacarídeos, a glicose e galactose, carboidratos mais simples, que são melhores absorvidos pelo organismo (CAMPBELL, 2012).

Lactase é o nome mais comum para a enzima β -galactosidase, classificada como hidrolase. Possui capacidade transferase para grupos galactosil, catalisando o

resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose, além de enriquecer o produto hidrolisado com galactoligossacarídeos (VIEIRA, 2006).

A hidrólise da lactose do soro de leite e derivados é um processo promissor nas indústrias alimentícias, ela resulta em produtos sem lactose na sua composição, por produzir um açúcar mais digerível, favorecendo pessoas com intolerância a lactose, a qual é atribuída em baixos níveis de lactase intestinal (VIEIRA, 2006; ANDRADE, 2005).

A lactose pode ser hidrolisada por dois métodos, por via ácida ou por tratamento enzimático com β -galactosidase. O método enzimático da hidrólise emprega a enzima β -galactosidase, a qual hidrolisa a lactose nos seus monossacarídeos constituintes, β -D-galactose e D-glicose, (VIEIRA, 2006).

Segundo Vieira (2006) a hidrólise da enzima por via ácida ocorre em condições severas de pH e temperatura. Esse processo fornece um alto grau de hidrólise em um curto período de tempo (VIEIRA, 2006). A Figura 5 mostra o processo de hidrólise da lactose.

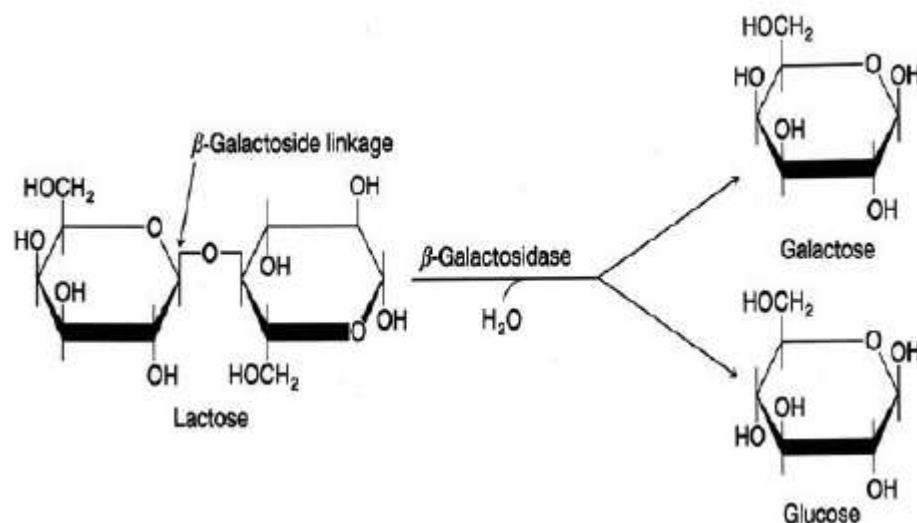


Figura 5 - Processo de hidrólise da lactose pela enzima β -galactosidase.

Fonte: Vieira (2006).

Longo (2006) relata que a vantagem da hidrólise enzimática reside no fato de que a reação se processa a temperatura relativamente baixa, numa faixa que pode variar de $4^{\circ}C$ a $40^{\circ}C$, sendo a temperatura ótima de $30^{\circ}C$ a $40^{\circ}C$, permitindo uma maior economia energética, além de não se formarem produtos secundários.

2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação é o processo inicial da formação de álcool etílico a partir de glicose, sacarose e frutose. É um conjunto de reações especificamente bioquímicas realizadas a partir de três fatores fundamentais: presença de açúcares, microrganismos que sejam capazes de transformar esse açúcar em OH e gás carbônico e ausência de oxigênio (BARBOSA, 2010).

Borzani (2001) define a fermentação alcoólica como “processo anaeróbio para produção de energia, que ocorre com degradação de carboidratos e formação de etanol e CO₂”.

Para aplicação na fermentação alcoólica, espera-se: a) que os microrganismos apresentem elevada eficiência na conversão do substrato em produto; b) que permita acúmulo de produto ao meio fermentativo; c) que não produza substâncias incompatíveis ao produto; d) não sejam patogênicos e e) que não exija condições complexas de processo e que permita rápida liberação de produto ao meio (SCHMIDELL, 2001).

A conversão de substrato em produto se deve ao fato de que as células da levedura produzem energia que lhe é necessária para sua sobrevivência através da degradação da matéria orgânica (BARBOSA, 2010).

Também para processo fermentativo, Schimidell (2001) expõe que o meio de cultivo deve ser o mais barato possível, atender as necessidades nutricionais dos microrganismos, evitar variações drásticas no pH e excessiva formação de espuma, ter composição razoavelmente fixa e não causar dificuldades no tratamento final dos efluentes.

Segundo Barbosa (2010) o processo fermentativo geralmente tem a duração média de 24 horas, com reciclagem do inóculo, ou seja, após decorrer essas 24 horas, as leveduras irão se depositar no fundo do local de fermentação e será adicionado um novo caldo diluído, com temperatura em torno de 30°C.

Diversos fatores afetam o rendimento da fermentação, sejam físicos, como temperatura e agitação, químicos (pH, inibidores e nutrientes) e microbiológicos (concentração de levedura, linhagem e espécie) (LIMA et al., 2001). Alguns desses fatores serão apresentados a seguir.

2.6.1 Temperatura

As leveduras são mesófilas, sendo assim, as temperaturas ótimas para a produção de etanol estão na faixa de 26 a 35°C. Com o aumento da temperatura, aumenta também a velocidade da fermentação, porém, favorece a contaminação bacteriana e as leveduras ficam mais suscetíveis à toxidez do etanol. Temperaturas elevadas também aumentam a evaporação do etanol, causando maiores perdas por evaporação em dornas abertas (LIMA et al., 2001).

2.6.2 pH

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo as mais adequadas entre 4 e 5, para a *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA et al., 2001).

Fermentações alcoólicas em meios mais ácidos têm maior produção de etanol, pois restringe o crescimento do micro organismo, reduzindo a produção de glicerol e a contaminação microbiana (LIMA et al., 2001). Entretanto, deve-se avaliar as condições de pH necessárias para que a ocorra reprodução da levedura, pois valores fora da faixa de atividade da levedura causam a sua inatividade

2.6.3 Concentração do inóculo

Quanto maior a concentração de levedura, mais rápida acontece à fermentação, aumentando a produtividade e o controle sobre as bactérias contaminantes além de restringir o crescimento da própria levedura (LIMA et al., 2001).

Porém, este alto teor de leveduras exige maior energia de manutenção, ou seja, aumenta o consumo de açúcar para manter as células vivas, conseqüentemente resulta em uma maior competição pelos nutrientes do meio, diminuindo a viabilidade do fermento (LIMA et al., 2001).

2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Na utilização do planejamento experimental há uma redução de experimentos ou repetições e uma melhoria na qualidade das informações obtidas através dos resultados. Isto significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Após as escolhas dos valores das variáveis, uma listagem dessas combinações deve ser feita, chamada de matriz de planejamento. Todas as colunas começam com o nível inferior (-) e depois os sinais vão se alternando. Um a um na primeira coluna, - + - +..., depois dois a dois, - - + +..., e finalmente quatro sinais negativos e quatro positivos na última coluna. (Tabela 2) (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Tabela 2 - Exemplo de uma matriz de um planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	1	2	3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fonte: Neto; Scarminio e Bruns, 2001.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental foi realizado em um Laboratório de análises químicas em Cascavel – Paraná e no laboratório de Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Toledo (UTFPR), utilizando amostras de um mesmo lote de permeado de soro de leite coletadas em uma indústria de produtos lácteos concentrados do município de Marechal Cândido Rondon – Paraná.

3.1 OBTENÇÃO DO PERMEADO SORO DE LEITE

O permeado de soro de leite foi coletado em um recipiente de 50 litros, em um tanque de estocagem, sendo que o produto já estava desengordurado e desproteínizado através de filtração que utiliza a técnica de separação por membranas.

Após coletado, o produto foi homogeneizado, fracionado em frascos esterilizados de aproximadamente 1,0 litro e armazenados em freezer, com temperatura de $-8,0^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para a realização dos experimentos e análises, o permeado de soro de leite foi descongelado sob refrigeração à temperatura de $3,0^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por 24 h, sendo os procedimentos realizados imediatamente após o descongelamento para não alterar suas propriedades físico-químicas (ISO 6887-2).

3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para a avaliação da influência das variáveis de entrada escolhidas (Temperatura e pH) sobre a produtividade da variável de resposta (concentração de etanol) foi utilizado o planejamento fatorial 3^2 , sendo 9 ensaios distintos e 3 repetições do ponto central, totalizando 12 ensaios, a matriz do planejamento fatorial é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 com 3 repetições no ponto central.

Experimento	Temperatura	pH
1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	1	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Os valores determinados para a primeira variável de entrada foram as temperaturas de 25 °C (-1), 30 °C (0) e 35 °C (+1), e para os valores da segunda variável de entrada foram os pHs de 4,0 (-1), 4,5 (0) e 5,0 (+1). A interpretação dos dados foi desenvolvida utilizando como ferramenta o software STATISTICA[®] 8.0 e ORIGIN[®] 8.

3.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE

A hidrólise da lactose do permeado de soro de leite foi realizada através das condições encontradas e descritas no trabalho desenvolvido por Baller (2014). Nele, o autor avaliou diferentes condições de pH, temperatura e concentrações da enzima β -Galactosidase, sendo a melhor condição quando utilizado uma temperatura de 37,5 °C, uma concentração de 1,250 g/L de enzima β -Galactosidase e um pH de 6,00.

Deste modo, o procedimento da hidrólise foi iniciado utilizando um volume de 2 litros de permeado de soro de leite em um bioreator simples e previamente esterilizado (Figura 5), sendo feita uma redução do pH para 6,00 com o auxílio de uma solução de ácido cítrico 0,5 mol.L⁻¹.

Após a correção para o pH ideal, foram adicionados ao permeado 2,500 g de enzima β -Galactosidase Maxilact[®] LX 5000, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis*, assim, o biorreator foi levado para o shaker de bancada Weg CFW08 modelo Maqib-shaker, já ambientado a uma temperatura de 37,5 °C, onde permaneceu sob agitação constante a 120 rpm durante 1,5 horas com um termômetro inserido no interior do biorreator para controle de temperatura.

Após o período da hidrólise o biorreator foi retirado do shaker e a reação cessada em banho Maria a 90°C por 2 minutos, e após, resfriado em banho de gelo a 0 °C, e iniciada a etapa de fermentação.

3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A fermentação alcoólica do permeado de soro de leite hidrolisado seguiu conforme a melhor condição encontrada dentre as análises realizadas no planejamento experimental, no qual foram variadas as temperaturas e os valores de pH para cada batelada de processo em biorreator.

Conforme proposto por Andrade (2005) e adaptado por Baller (2014), foi utilizada uma concentração de 0,4 g.L⁻¹ de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na forma liofilizada da marca Fleischmann[®] para um volume de 2,0 litros de permeado de soro de leite hidrolisado e os valores de pH ajustados com solução de ácido cítrico 0,5 mol.L⁻¹.

A fermentação ocorreu em um biorreator simples (Figura 6), feito com garrafa PET (Politereftalato de Etileno) com capacidade de 2,5 litros e com saída para gases formados e saída para coletar amostras. Inicialmente o sistema permaneceu aeróbico e com agitação constante de 50 rpm pelo período de 2 horas, pois isso reflete numa maior produção de energia e biomassa, sendo que posterior a esse período o processo permaneceu em sistema anaeróbico e sem agitação pelo período de 30 horas, totalizando 32 horas de fermentação.

Durante o período de fermentação foram coletadas alíquotas de 100 mL em um intervalo de 2 horas até a 6^a hora e depois mais 3 coletas: uma na 16^a hora, uma na 24^a hora e uma na 32^a hora. Cada amostra coletada do fermentado foi armazenada em frasco âmbar de capacidade superior a 100 mL, previamente higienizados, e realizadas imediatamente as análises de pH, °Brix e contagem de

leveduras (Biomassa), sendo que findada estas análises a fermentação foi cessada em banho Maria a 70 °C e os frascos congelados em freezer a -2 °C para posterior análise de teor alcoólico



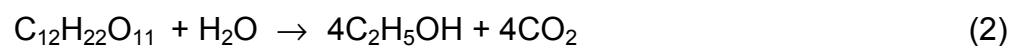
Figura 6 - Biorreator simples feito com garrafa PET.

3.4.1 Cálculo do rendimento da conversão de substrato em etanol.

Segundo Andrade (2005) o rendimento da conversão de substrato em etanol pode ser calculado empregando a Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = [\text{Etanol produzido} / (\text{substrato consumido} * 0,5380)] * 100 \quad (1)$$

O valor de 0,5380 refere-se a estequiometria de conversão da lactose em etanol (ANDRADE, 2005), conforme a Equação 2.



3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Caracterização do Permeado de Soro de Leite

3.5.1.1 Determinação de resíduo por incineração (cinzas).

O resíduo por incineração (cinzas) do leite e seus derivados é constituído principalmente por óxidos de potássio, sódio, cálcio, magnésio, fósforo e por cloretos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O teor de cinzas, que é resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura de 550 a 570°C, foi obtido por meio de ignição de quantidade conhecida da amostra, onde se pesou 5,0 g de amostra em um cadinho tarado e previamente aquecido e mufla a 550°C, onde após o seu resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente foi levado a mufla por aproximadamente 4 horas, até que as cinzas ficaram brancas ou ligeiramente acinzentadas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Após a retirada do cadinho da mufla e seu resfriamento em dessecador, a sua massa foi anotada para a obtenção da porcentagem de cinzas através da Equação 3.

$$\text{Cinzas (\%)} = (100 * N)/P \quad (3)$$

onde:

N = n° de gramas de cinzas;

P = n° de gramas de amostra.

3.5.1.2 Determinação de glicídios redutores em lactose

Quimicamente, os carboidratos glicose e galactose são definidos como poli-hidroxi-aldeídos, segundo Lanagro (2013) eles recebem esta denominação por que apresentam em sua estrutura vários grupos hidroxilas (OH) e um grupo aldeído

(CHO). Devido a estas características eles são capazes de reduzir soluções alcalinas como a solução de Fehling e são chamados de glicídios redutores.

A solução de Fehling é um reagente formado por íon bivalente de cobre (Cu^{2+}) complexado com tartarato em meio alcalino. A amostra a ser testada é aquecida com a solução de Fehling, na presença de um indicador. O poder redutor dos carboidratos baseia-se na oxidação destes para ácidos aldônicos e redução do reagente oxidante (cobre II). A redução provoca formação do óxido de cobre I, precipitado de cor vermelho tijolo (LANAGRO, 2013).

Portanto, a metodologia seguiu conforme a proposta pela Instrução Normativa 68 (2006), na qual foram utilizadas 10 mL do permeado que foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e adicionadas 6 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15 % e 6 mL de solução de sulfato de zinco a 30 % com adição de 1 gota de álcool isoamílico e ajustado o menisco. A solução foi deixada em repouso por 50 minutos e filtrada em papel filtro, o filtrado foi transferido para uma bureta para posterior titulação.

A titulação foi feita com duas soluções preparadas, uma com 5 mL de solução de Fehling A e outra com 5 mL da solução de Fehling B, em ambas foram adicionadas 40 mL de água purificada e levados para aquecimento até ebulição da solução onde foram adicionadas 1 gota de solução de azul de metileno a 1 % e titulado até desaparecimento da coloração do indicador.

A percentagem de lactose pode ser encontrada através da Equação 4.

$$\% \text{ de glicídios redutores em lactose} = [100 \times 250 \times (T/2) \times 1,39] / (V \times m) \quad (4)$$

Onde,

T = título da solução de Fehling;

V = volume de amostra gasto na titulação (mL);

m = massa da amostra (g);

1,39 = fator de conversão da glicose em lactose.

3.5.1.3 Determinação de lipídeos

A determinação dos lipídeos foi realizada pelo método do Butirômetro de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico

e álcool isoamílico, na centrifugação e posterior determinação da gordura (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A extração dos lipídeos seguiu conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), específica para determinação de gorduras em leite e derivados, onde 11 mL de permeado foram adicionadas no lactobutirômetros junto com 10 mL de ácido sulfúrico adicionados lentamente no butirômetro e 1 mL de álcool isoamílico. Uma rolha específica foi colocada na extremidade do butirômetro e o mesmo foi levado para uma centrífuga de Gerber, onde foi centrifugado por 5 minutos e direcionado a um banho-maria a aproximadamente 70 °C pelo tempo de 2 a 3 minutos, com a rolha para baixo.

O butirômetro foi retirado do banho na posição vertical (rolha para baixo) e observado o valor obtido na escala do mesmo, que corresponde diretamente à porcentagem de lipídeos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.5.1.4 Determinação dos micronutrientes

A quantificação dos nutrientes contidos no permeado de soro de leite foi realizada em um laboratório de análises químicas de Cascavel utilizando o método de espectrometria de emissão atômica

A metodologia utilizada pelo laboratório seguiu como padrão de referência o capítulo 9 da AOAC (2005), na qual a análise dos nutrientes é determinada através da técnica de digestão ácida sendo a amostra submetida a altas temperaturas com um ácido forte onde ocorre a degradação de toda a matéria orgânica existente na amostra e restando apenas o resíduo mineral solubilizado em meio ácido, para que posteriormente seja analisada em um ICPE modelo 9000 da marca Shimadzu, até atingir 160°C, conforme abaixo: (os tempos e a temperatura devem ser rigorosamente repetidos).

3.5.1.5 Proteínas

A determinação das proteínas contidas no leite seguiu de acordo com a Instrução Normativa 68 (2006) através do método de Kjeldahl, que se baseia na

transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada, sendo assim, este método é dividido em três etapas principais: a digestão, destilação e titulação.

Na digestão ocorre o aquecimento da amostra, com a presença de um catalisador, com ácido sulfúrico concentrado que causa a oxidação do carbono e hidrogênio. Onde o carbono é transformado em dióxido de carbono (CO_2), o hidrogênio em água (H_2O) e o nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio (LANAGRO, 2013)

O objetivo da etapa de destilação é transformar o nitrogênio presente na solução, que está na forma de sulfato de amônio (NH_4^+), para NH_3 gasoso. Com adição de NaOH concentrado e aquecimento ocorre a liberação da amônia que é separada da mistura por destilação, então, o gás reage com uma solução de ácido bórico, formando o borato de amônio. Na etapa final, a titulação, consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico padronizada (LANAGRO, 2013)

Para a realização da determinação das proteínas, um quantidade de 2 g de permeado foi pesada em tubo de destilação de Kjeldahl e adicionados 2,5 g de catalisador e 7 mL de ácido sulfúrico, e o tubo foi levado para bloco digestor sendo elevada a temperatura gradativamente até uma temperatura final de 450°C , após esse tempo o líquido se tornou límpido e transparente de tonalidade azul-esverdeada.

O tubo de Kjeldahl foi acoplado no início de um destilador de nitrogênio e na extremidade final um erlenmeyer com cerca de 20 mL de solução de ácido bórico com 5 gotas de indicador misto. Uma solução de aproximadamente 20 mL de hidróxido de sódio a 50 % foi adicionada ao tubo e iniciada a destilação até atingir um volume de aproximadamente 75 mL no erlenmeyer, e esta solução foi levada para a titulação com ácido sulfúrico 0,1 N até a viragem do indicador (coloração verde à leve tom róseo - avermelhado).

A percentagem de proteínas foi determinada através da Equação 5.

$$\% \text{ Nitrogênio Total} = (V \times N \times 0,014 \times 100) / m \quad (5)$$

Onde,

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto na titulação após a correção do branco (mL);

N = normalidade teórica da solução de ácido sulfúrico 0,1 N;

f = fator de correção da solução de ácido sulfúrico 0,1 N ou solução de ácido clorídrico 0,1 N;

m = massa da amostra (g).

3.5.1.6 Umidade

Para determinar a umidade, pesou-se 2 g da amostra em um cadinho com areia tarado e anteriormente aquecido em estufa a 105 °C por três horas e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente. O cadinho com a massa de areia foi aquecido em estufa a 105 °C durante 3 horas e após resfriado em dessecador foi pesado e aplicada a equação 6 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\text{Umidade (\%)} = [(m_1 - m_2) \times 100] / m_3 \quad (6)$$

onde,

m_1 = massa do cadinho + amostra (g);

m_2 = massa do cadinho + amostra seca (g);

m_3 = massa da amostra (g).

3.5.2 Análises Realizadas durante a Fermentação

3.5.2.1 Determinação de graus Brix

A determinação de graus Brix foi feita de acordo com a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo utilizado o método do refratômetro para a determinação da concentração de sólidos solúveis em soluções aquosas de açúcar.

O refratômetro utilizado foi o modelo ABBE 0-95%, sendo calibrado com água destilada antes da análise de cada uma das alíquotas retiradas em intervalos de tempo determinados para o acompanhamento do consumo do substrato.

3.5.2.2 Determinação do pH

Seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008) onde foi utilizado o potenciômetro, que determina a concentração de íons de hidrogênio sendo que cada alíquota foi vertidas em becker de 50 mL e após a limpeza e calibração do pHmetro e do eletrodo ele foi imerso no Becker com a amostra e assim obtido o resultado do pH.

3.5.2.3 Determinação do teor alcoólico

Na determinação do teor alcoólico das alíquotas retiradas do fermentado foi utilizada a metodologia de determinação de álcool em volume a 20 °C adaptada do Instituto Adolfo Lutz (2008).

O procedimento para esta análise foi realizado em triplicata e com um volume de 30 mL de cada amostra para a destilação, sendo as alíquotas adicionadas ao microdestilador e o destilado (solução hidroalcoólica) coletado em sua extremidade até um volume aproximado de 50 mL, que foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e adicionada água destilada para ajuste do volume total.

A mistura de água e álcool obtida, hidroalcoólico, foi vertida em um Becker para o ajuste da temperatura em banho de gelo ate que atingir 20 °C e transferida para um picnômetro de 50 mL previamente calibrado e seco e anotada a sua massa.

Com o resultado do volume real obtido da calibração do picnômetro e a massa do hidroalcoólico foi possível determinar a densidade da solução com a Equação 7.

$$\rho = (m_2 - m_1) / V \quad (7)$$

ρ = densidade da solução (g.cm⁻³);

m_1 = massa do picnômetro (g);

m_2 = massa do hidroalcoólico + massa picnômetro (g);

V = volume da solução (cm^{-3}).

A densidade encontrada na equação acima permitiu, através do Anexo 1 (Porcentagem de álcool em volume a 20 °C (% v/v) correspondente à densidade relativa), encontrar o valor do teor alcoólico para cada alíquota destilada, porém, um cálculo de diluição (Equação 8) foi necessário, tendo em vista que um volume de 30 mL foi destilado e este no final ajustado para 100 mL para que o valor possa ser expresso da maneira real.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (8)$$

C_1 = teor alcoólico na amostra;

V_1 = volume de amostra utilizada (30 mL);

C_2 = teor de álcool encontrado no Anexo 1;

V_2 = volume total utilizado (100 mL).

3.5.2.4 Determinação da Biomassa

Com a metodologia de Alves e Guimarães (2010) foi possível determinar a concentração de leveduras presentes nas alíquotas utilizando a câmara de Neubauer e um microscópico ótico. A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, ela possui 9 quadrados que medem 1 mm^2 de área.

O esquema da câmara encontra-se na Figura 7, sendo que para o método somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células, e cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem.

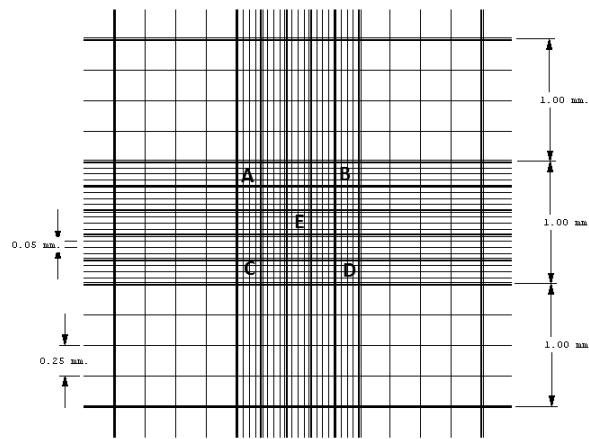


Figura 7 - Esquema da câmara de Neubauer.

Fonte: Côrte-Real e Barbosa, 2010.

De acordo com a metodologia, alíquotas de 0,3 mL foram retiradas de cada frasco âmbar e transferidas para microtubos de Eppendorf com 0,9 mL de água, e homogeneizadas. Uma lamínula foi adicionada na parte superior da câmara de Neubauer e 0,5 mL foram retiradas dos microtubos e transferidas para a extremidade da câmara com cuidado para que a suspensão preenche-se apenas um lado dela e assim foi levada para análise e contagem de leveduras em microscópio ótico.

A lamínula de vidro sobre a câmara serve para conter a suspensão celular, o espaço formado entre elas é de 0,1 mm, sendo assim, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a $0,1 \text{ mm}^3$, portanto, as células contadas em um quadrado contidas em 1 mL equivalem ao valor de células contado multiplicado por 10^4 (fator de correção da câmara).

O número de células por mL de cada suspensão foi obtido através da Equação 9 abaixo:

$$n^\circ \text{ células/mL} = (n_1/n_2) * f * 10^4 \quad (9)$$

Onde,

n_1 = número total de células;

n_2 = número de quadrantes contados;

f = fator de diluição.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERMEADO DO SORO DE LEITE.

As análises realizadas para a caracterização do permeado de soro de leite foram realizadas em triplicata sendo que a média aritmética dos resultados e o coeficiente de variação são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Caracterização e comparação do permeado de soro de leite.

Parâmetros analisados	Resultados	BALLER (2014)	BACH (2014)
Brix (°)	13,6 ± 0,2	14,1	-
Cinzas (%)	0,80 ± 0,00	0,79	0,55
Lactose (%)	10,25 ± 0,02	10,9	4,76
Lipídeos (%)	<0,10 ± 0,00	0	<0,1
pH	6,37 ± 0,02	6,38	6,3
Proteínas (%)	0,52 ± 0,03	0,6	0,83
Umidade (%)	86,34 ± 0,02	85,9	-

Fonte: Baller, 2014; Bach, 2014.

Comparando as características do permeado de soro de leite utilizado para a presente pesquisa com resultado obtido por Baller (2014), que caracterizou o mesmo permeado, e por Bach (2014) para o soro de leite *in natura* desnatado, percebe-se que os resultados encontrados são semelhantes. Principalmente quando comparados com os resultados encontrados por Baller (2014), pois a sua caracterização foi feita para o mesmo permeado de soro de leite, apenas em lotes diferentes.

A análise que apresentou maior diferença foi a da lactose, sendo que os valores encontrados foram de 10,25 % e de 10,90 % em comparação com um de 4,76 % de Bach (2014). A diferença desses resultados pode ocorrer devido ao procedimento de obtenção do permeado para os dois primeiros resultados e para a obtenção do soro de leite *in natura* e desnatado para o Bach (2014).

O valor de pH encontrado de 6,37, que representa a acidez do permeado de soro de leite, é um pH próximo ao necessário para início da hidrólise, conforme determinado através dos testes realizados por Baller (2014) que encontrou a melhor condição do pH para a hidrólise foi de um pH 6,00, sendo assim, apenas uma correção para a redução do pH é necessária. Além do mais, os ajustes para redução do pH não alteram significativamente as outras características do permeado de soro de leite.

O baixo teor de proteínas e a ausência de lipídeos mostram a eficiência do processo de separação por membranas, que faz a retirada das proteínas e do processo de centrifugação, para a retirada dos lipídeos, processos estes aplicados na indústria que forneceu o material de estudo. Conforme dito anteriormente o baixo teor de proteínas é um fator importante, já que um alto teor de proteínas interfere na eficiência do processo de destilação.

O teor de cinzas obtido na análise representa o resíduo inorgânico que permaneceu após a queima da matéria orgânica, que de acordo com Bach (2014) possui alguns substratos importantes para a *Saccharomyces cerevisiae*, como por exemplo, o nitrogênio orgânico e alguns minerais, que auxiliam no crescimento adequado da levedura.

A Tabela 5 apresenta os valores encontrados para os principais nutrientes contidos no permeado de soro de leite, a quantificação ocorreu conforme o item 3.3.2.6, utilizando o método de espectrometria de absorção atômica.

Tabela 5 - Caracterização e comparação dos micro-nutrientes contidos no permeado de soro de leite.

Nutrientes Analisados	Média do resultado \pm desvio padrão (%) ¹	Burrington, 2014 (%)	Variolac, 2012 (%)
Ca	0,845 \pm 0,002	0,36-0,62	0,554
Cu	<0,01 \pm 0,00	-	-
Fe	0,002 \pm 0,000	-	-
K	1,588 \pm 0,002	2,18-5,36	1,715
Mg	0,139 \pm 0,003	0,10-0,13	0,122
Mn	0,002 \pm 0,000	-	-
Na	0,612 \pm 0,001	0,70-0,89	0,575
P	0,615 \pm 0,003	-	0,636
Zn	0,002 \pm 0,000	-	0,1

¹Resultados expressos em porcentagem com relação a massa seca encontrada e apresentada na Tabela 4.

Fonte: Burrington, 2014; Variolac, 2012.

Os micro-nutrientes Mg, Na e P foram encontrados em valores similares aos apresentados por Burrington (2014) e Variolac (2012). Uma porcentagem de 1,588 para o K foi um resultado próximo ao encontrado por Variolac, mas totalmente discrepante quando comparado a porcentagem encontrada por Burrington, de 2,18-5,36 %. O nutriente que apresentou maior porcentagem, quando comparado aos outros, foi o Ca, 0,845 %, sendo Burrington na faixa de 0,36-0,62 % e Variolac 0,554%.

Como o crescimento dos microrganismos é um processo dinâmico que requer energia química e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e a

manutenção das células, diversos íons inorgânicos como os macro-nutrientes (P, K, Mg e Ca) e micro-nutrientes (Cu, Zn, Mn e Na) são necessários para o desenvolvimento da levedura (BASSO, 1996). Segundo Camili e Cabello (2007), os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada de macro e micro nutrientes do mosto é importante, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo.

A caracterização permitiu conhecer de forma detalhada o permeado de soro de leite, que teve a fermentação realizada variando-se as condições de temperatura, e pH, e encontrando-se a condição que atinge maior rendimento de conversão de lactose em etanol.

4.2 Planejamento experimental

Por meio do planejamento fatorial 3^2 realizado, foi possível avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada, pH e temperatura, sobre a resposta, produção de etanol. É possível observar na Tabela 6 os resultados encontrados para a variável de resposta com relações as interações das variáveis de entrada.

Tabela 6 - Matriz do planejamento fatorial 3^2 com 3 repetições no ponto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Etanol (g/L)
1	25	4,0	38,00
2	30	4,0	37,80
3	35	4,0	39,90
4	25	4,5	38,33
5	30	4,5	33,33
6	35	4,5	39,16
7	25	5,0	37,20
8	30	5,0	32,22
9	35	5,0	35,70
10	30	4,5	31,10
11	30	4,5	32,66
12	30	4,5	30,22

Na Figura 8 está apresentada a relação entre os valores preditos pelo planejamento com os valores reais encontrados.

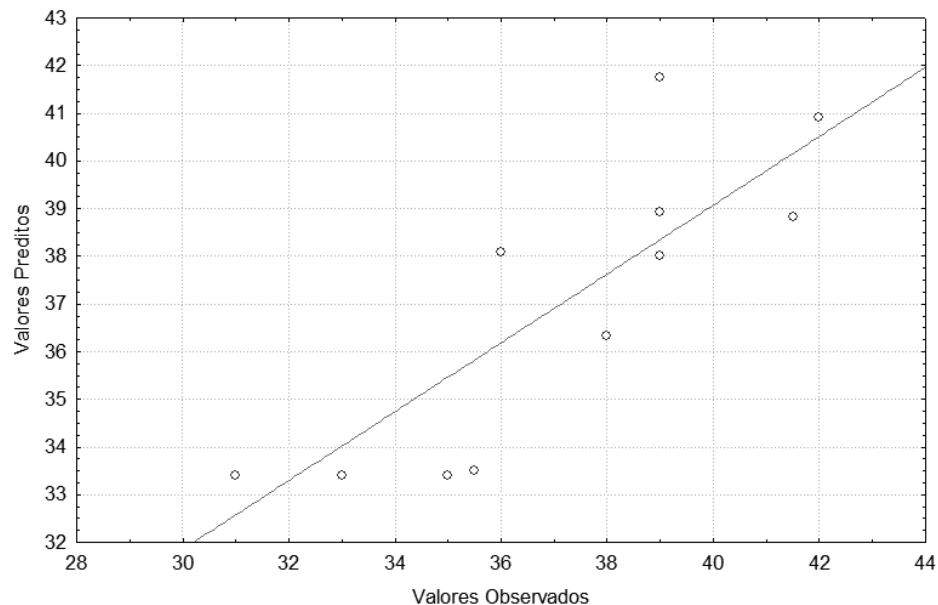


Figura 8 - Gráfico de valores preditos por valores observados

Os valores encontrados para a conversão do substrato em etanol estão representados através dos pontos azuis no gráfico, que segundo Araujo (2013), quantos mais próximos estes pontos estiverem da reta identidade, maior é a capacidade de predição do modelo feito pelo planejamento.

Desta forma observa-se que os valores encontrados, em sua maioria, estão dispostos próximos a reta identidade, no então, essa proximidade não é suficiente para o modelo possuir capacidade preditiva, ou seja, o gráfico nos mostra que o sistema não possui boa qualidade de ajuste e de predição dos resultados.

O diagrama de Pareto ilustra os efeitos das variáveis estudadas, temperatura e pH, e este diagrama compreende um gráfico de barras horizontais que está associado aos efeitos de cada variável individualmente e suas interações, na qual o efeito é tão significativo quanto mais à direita da linha vermelha (valor de p) ele estiver, no nível de significância de 95% de confiança (ARAUJO, 2013).

Na Figura 9 verifica-se que o efeito quadrático (Q) da temperatura e mostra-se estatisticamente significativo a um nível de 95% de confiança, ou seja, ele apresenta influência para experimento. Para os outros efeitos, de pH linear e quadrático e temperatura linear, estes não apresentaram significância estatística, pois estão abaixo do limite de significância $p = 0,05$.

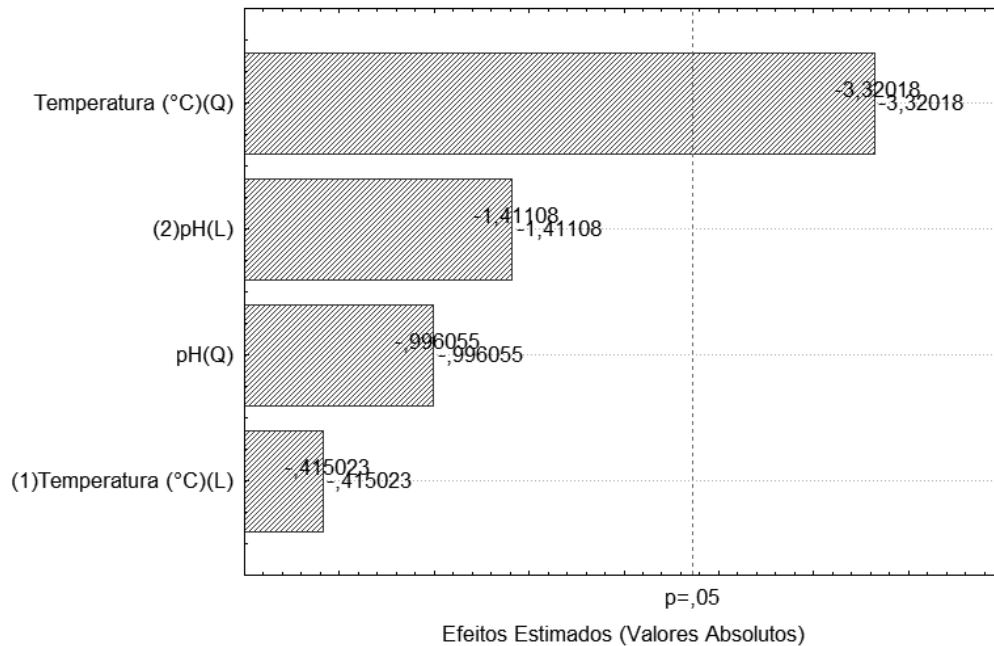


Figura 9 - Diagrama de Pareto.

Com o auxílio da Tabela 7, verifica-se que os dados apresentados no gráfico de Pareto confirma que o sistema não possui capacidade preditiva.

Tabela 7 – ANOVA.

Fatores	SS	df	MS	F	p
Temperatura °C (L)	1,0417	1	1,04167	0,17224	0,690550
Temperatura °C (Q)	66,6667	1	66,66667	11,02362	0,012762
pH (L)	12,0417	1	12,04167	1,99114	0,201085
pH (Q)	6,0000	1	6,00000	0,99213	0,352401
Erro	42,3333	7	6,04762		
Total SS	152,1667	11			

A superfície de resposta da região de combinação binária entre as variáveis pH e temperatura, pode ser observada por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 10. Onde apresenta as regiões de contorno da superfície de resposta para a variável dependente, concentração de produção de álcool.

Observa-se através das curvas de nível, elaborado a partir dos valores mais de produção de etanol para os 12 experimentos realizados, que se for utilizado um pH próximo a 4,0 e uma temperatura próxima a 25 °C, uma concentração superior a 46 g/L de etanol pode ser obtida, sendo assim, com a equação do rendimento do item 3.4.1, seria obtido um rendimento próximo a 83,5 %, de conversão de lactose em etanol.

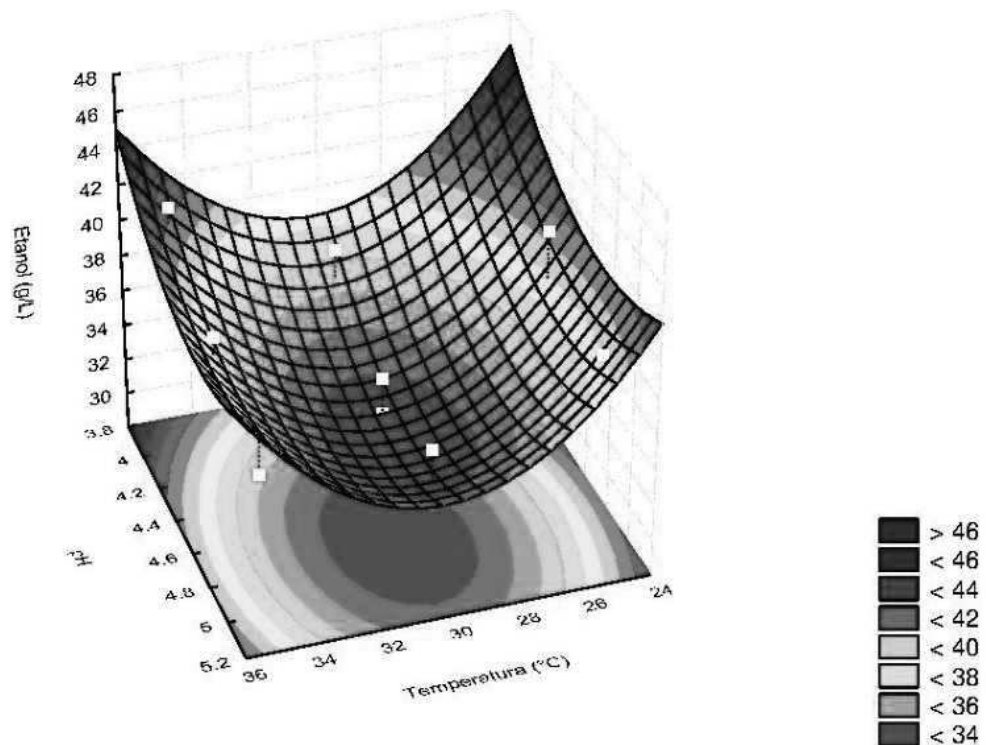


Figura 10 - Gráfico de Superfície de Resposta da produção de etanol.

Observa-se através das curvas de nível, elaborado a partir dos valores mais de produção de etanol para os 12 experimentos realizados, que se for utilizado um pH próximo a 4,0 e uma temperatura próxima a 25 °C, uma concentração superior a 46 g/L de etanol pode ser obtida, sendo assim, com a equação do rendimento do item 3.4.1, seria obtido um rendimento próximo a 83,5 %, de conversão de lactose em etanol.

Porém, ao serem realizados experimentos com faixas de pH tão baixas como 4,0, um cuidado deve ser tomado, pois podem trazer riscos para o rendimento do processo fermentativo, tendo em vista que a faixa de pH para melhor atuação da *Saccharomyces cerevisiae* segundo LIMA et al. (2001) varia de 4,0 a 5,0.

4.3 Fermentação alcoólica do hidrolisado do permeado de soro de leite.

As fermentações do hidrolisado do permeado de soro de leite ocorreram conforme condições especificadas no item 3.4, sendo variada a temperatura, de 25 à 30 °C e o pH de 4.0 à 5.0. Durante as 32 horas de fermentação foram feitas

coletas do fermentado, em intervalos fixos de tempo, de onde foram analisadas a graduação de brix, a biomassa, o pH e o teor de etanol, conforme as metodologias especificadas no item 3.5.

Os resultados encontrados para estas análises, são apresentados nas Figuras 11 e 12.

Dentre os ensaios realizados observou-se que para a biomassa, em todos os ensaios o crescimento apresentou uma curta fase de ambientação (lag) sendo que a partir da 5^a hora já era iniciada a fase de crescimento exponencial (log). Para os 12 experimentos realizados foi possível observar a fase de morte das leveduras após a 25^a hora.

Para o controle do pH durante as fermentações, verifica-se que para todos os ensaios ocorreu a sua redução, em média de 0,5 no valor inicial. Esta redução do pH ocorreu até a 17^a hora, após esse período um aumento no valor do pH de aproximadamente 0,3 foi observado para os ensaios, exceto para 3, que após a 17^a hora continuou com a redução do seu pH.

Possivelmente esse aumento no pH nos ensaios pode ser relacionado a alguma subreação que ocorreu no processo de fermentação, produzindo algum composto que ocasione isso.

Comparando os gráficos de 11 a 12, verifica-se que o consumo de Brix nos ensaios ocorreu de forma acentuada até a chegada da 17^a hora, uma vez que iniciaram com valores próximos a 13 °Brix e nesta hora apresentavam uma média de 10 °Brix. Após a 17^a hora o consumo de açúcares prosseguiu de forma moderada até o final do período de fermentação.

Em todos os ensaios se observou que os açúcares não se consumiram totalmente com a fermentação, resultando em todos os casos um residual medido em torno de 9 °Brix. Isto se deve ao fato da análise de controle realizada ser muito abrangente, pois o procedimento de determinação do Brix consiste na verificação através da refração da luz incidida num prisma e na amostra, sendo que o valor apresentado pelo equipamento é referente a quantidade de sólidos solúveis totais, o que não significa que sejam todos estes açúcares fermentescíveis.

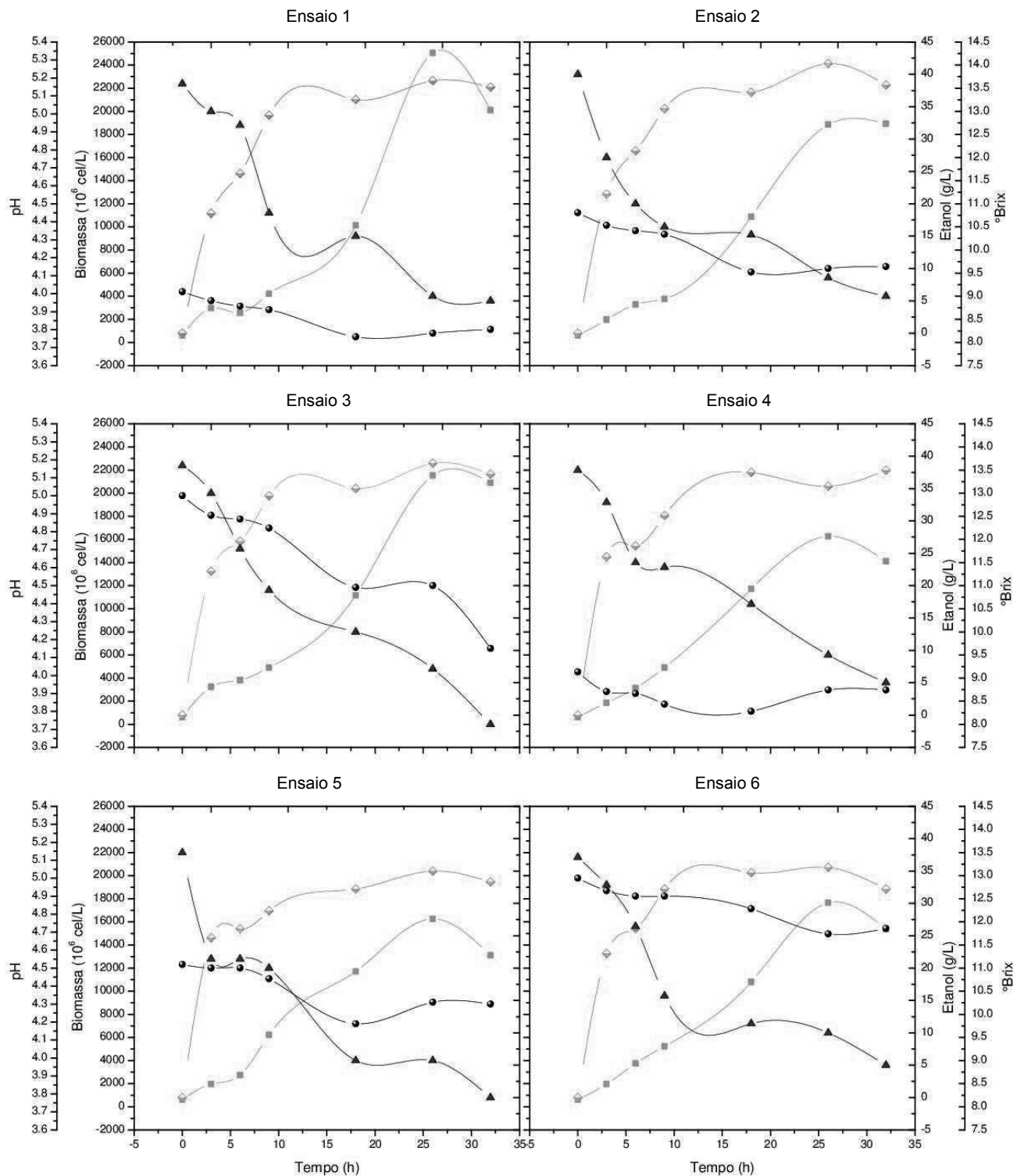


Figura 11 – Análises realizadas para o controle de Biomassa, °Brix, Etanol e pH durante o período de fermentação para os ensaios de 1 à 6. Ensaio 1) Temperatura de 25 °C e pH 4,0; Ensaio 2) Temperatura de 25 °C e pH 4,5; Ensaio 3) Temperatura de 25 °C e pH 5,0; Ensaio 4) Temperatura de 30 °C e pH 4,0; Ensaio 5) Temperatura de 30 °C e pH 4,5; Ensaio 6) Temperatura de 30 °C e pH 5,0. Biomassa (■); °Brix (▲); Etanol (◆) e pH (●).

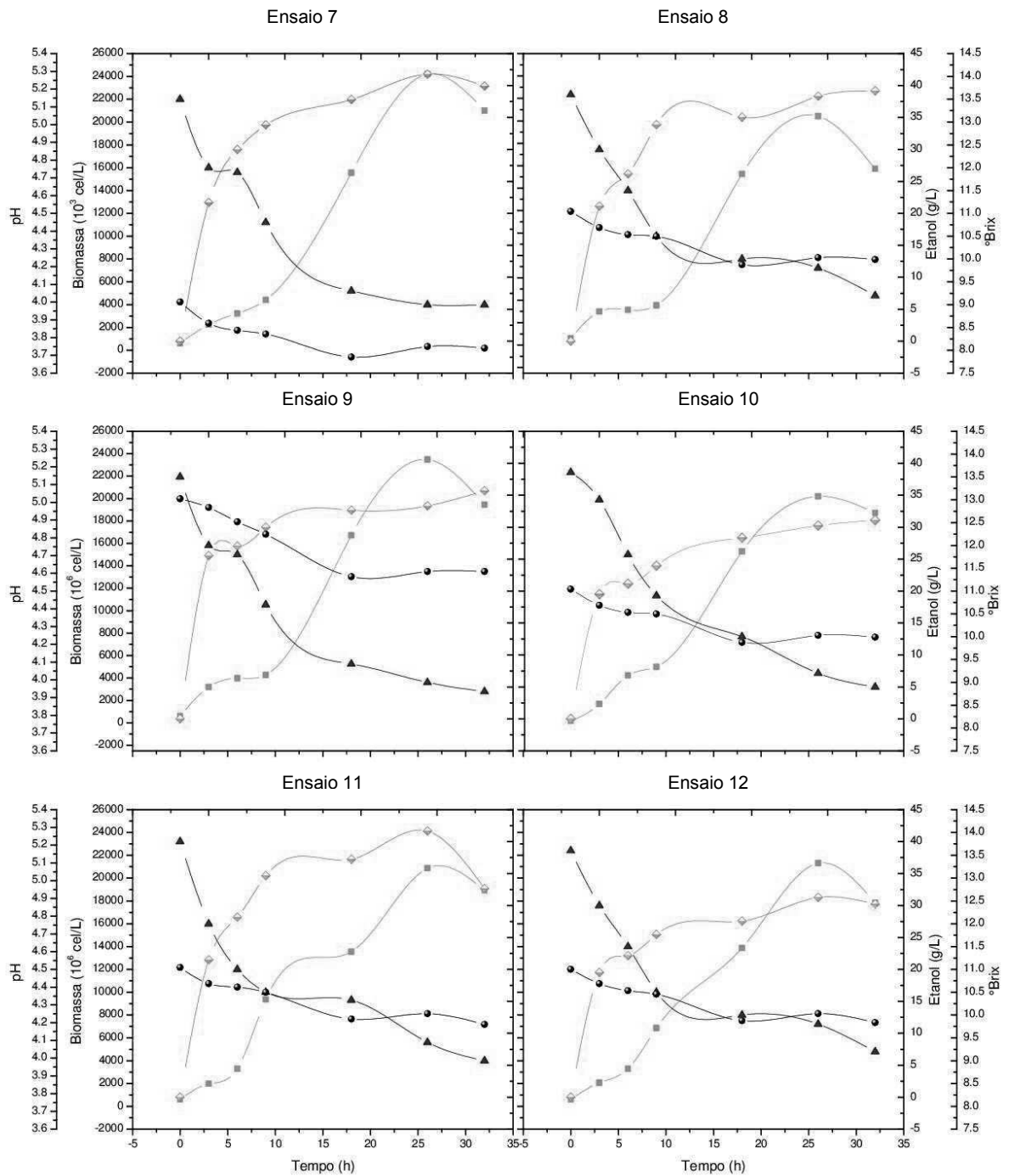


Figura 12 - Análises realizadas para o controle de Biomassa, °Brix, Etanol e pH durante o período de fermentação para os ensaios de 7 à 12. Ensaio 7) Temperatura de 35 °C e pH 4,0; Ensaio 8) Temperatura de 35 °C e pH 4,5; Ensaio 9) Temperatura de 35 °C e pH 5,0; Ensaio 10) Temperatura de 30 °C e pH 4,5; Ensaio 11) Temperatura de 30 °C e pH 4,5; Ensaio 12) Temperatura de 30 °C e pH 4,5. Biomassa (■); °Brix (▲); Etanol (◆) e pH (●).

Desta forma, utilizando como método de determinação dos açúcares pelo refratômetro, não chegaremos a valores próximos a zero, devido à abrangência do método. Andrade (2005) chegou a valores muito próximos a zero para determinação dos açúcares, mostrando que o seu mosto de fermentação foi praticamente todo utilizado para a conversão em etanol.

Observa-se que a metodologia utilizada por Andrade (método DNS) foi específica para a determinação de açúcares redutores, determinando assim apenas aqueles açúcares utilizados realmente na fermentação. A Figura 13 apresenta o consumo dos açúcares pela fermentação desenvolvida, chegando próximos a zero.

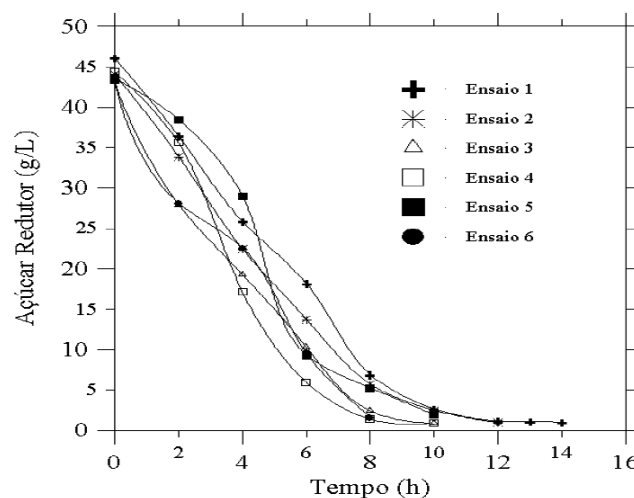


Figura 13 – Consumo de açúcares redutores através do tempo de fermentação.

Fonte: Andrade (2005).

Na Figura 14, estão dispostos as curvas para a produção do etanol em todos os 12 ensaios elaborados.

Os ensaios realizados apresentaram suas curvas de produção de etanol com características semelhantes, todos iniciaram a produção de etanol de forma acentuada até a 8ª hora. Após a 9ª a conversão para etanol seguiu de forma moderada até o final do período da fermentação.

Um declínio na produção de etanol foi observado, com exceção dos ensaios 4, 9 e 10, a partir da 25ª hora, onde a produção estava no seu máximo, após esse momento a produção de etanol decaiu, chegando ao seu valor final na 32ª hora.

Esta característica também foi observada por Andrade (2005), Figura 15. Em seu estudo avaliou a produção de etanol através da fermentação do soro de leite em pó, sendo variadas as concentrações de soro, nutrientes, enzima, inóculo e

agitação, distribuídos entre 12 experimentos, obtendo-se um rendimento de 93.90% para uma concentração de soro de 90 g/L, 0.2 g/L de enzima, 50 g/L de inóculo, 3 g/L de nutrientes e uma agitação de 300 rpm.

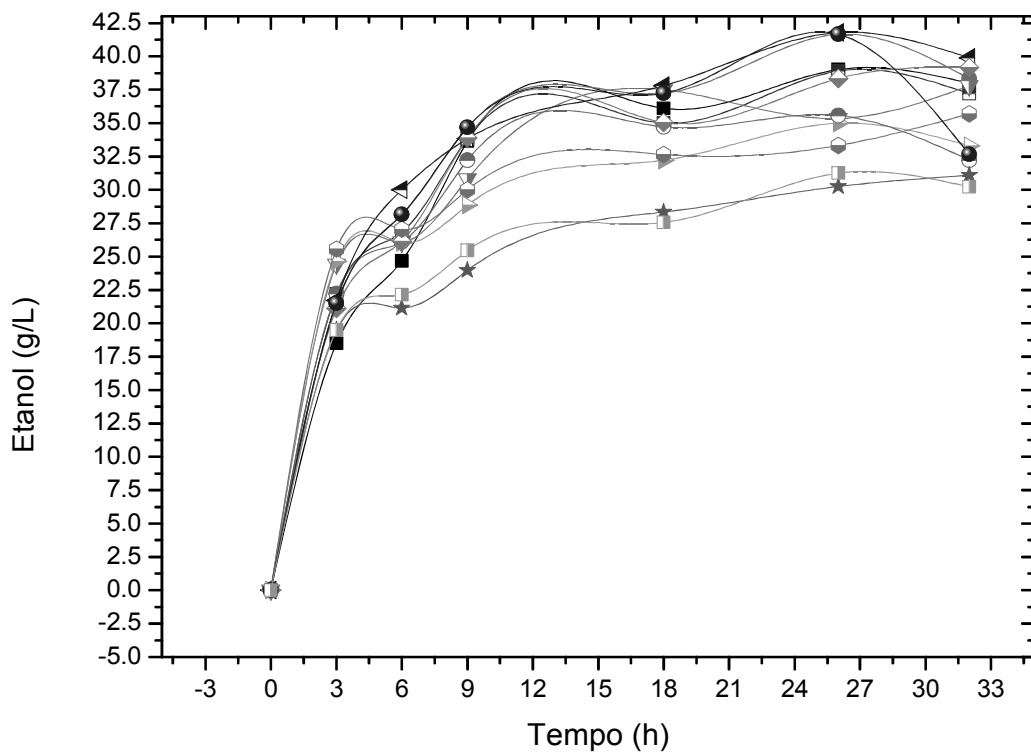


Figura 14 – Produção de etanol para os ensaios de 1 à 12. Ensaio 1 (■); Ensaio 2 (●); Ensaio 3 (▣); Ensaio 4 (▼); Ensaio 5 (▶); Ensaio 6 (⊙); Ensaio 7 (◀); Ensaio 8 (◆); Ensaio 9 (⊕); Ensaio 10 (★); Ensaio 11 (⊗) e Ensaio 12 (▣).

Acredita-se que tal fenômeno possa ter ocorrido devido a vedação nos biorreatores, e como a reação da fermentação é exotérmica pode ter auxiliado a evaporação de etanol. Sub-reações que possam converter etanol em algum outro produto não podem ser descartadas, uma vez que não sabemos totalmente quais são todos os produtos e subprodutos formados.

Portanto, com base nos gráficos analisado, percebe-se que as condições que apresentaram maior produção de etanol são para uma temperatura de 35 °C e um pH de 4,0.

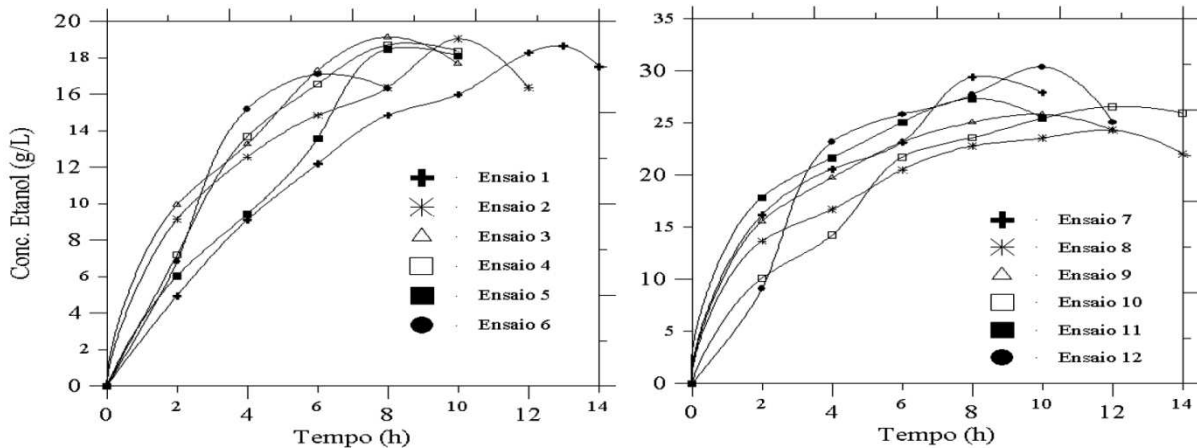


Figura 15 – Curvas de produção de etanol através do tempo.

Fonte: Andrade (2005).

A Figura 16 apresenta a curva de crescimento da levedura, expressos em 10^6 cel/L e a taxa de consumo dos açúcares, em graus Brix, no decorrer do tempo de fermentação.

Inicialmente pode-se observar que a fase lag praticamente não existiu, uma vez que o crescimento já se inicia de forma moderada e assim se mantêm até a 9ª hora com um consumo alto de açúcares, iniciando em 13,6 °Brix e com 10,6 °Brix no final da 9ª hora.

A partir da 9ª hora o crescimento das leveduras entrou na fase log, onde apresentou um crescimento exponencial até 26ª hora, sendo possível observar que a quantidade de leveduras passou de aproximadamente $4800 \cdot 10^6$ cel/L para $24000 \cdot 10^6$ cel/L num período de 17 horas. Desta forma, com o crescimento de leveduras ocorreu o consumo dos açúcares, que se deu de forma elevada para o período, iniciando com 11,8 °Brix e finalizando na 26ª hora com 9,1 °Brix.

Devido aos intervalos de análises e controles de biomassa e dos demais parâmetros, não foi possível observar a fase estacionária, pois, logo após a 26ª hora apenas um último ponto de análise foi coletado e analisado, desta forma logo após a 26ª hora já se verifica a fase de decréscimo da levedura.

A fase final da curva de crescimento pode ser observada a partir da 26ª hora, através de seu declínio que ocorreu até o ponto final da fermentação, na 32ª hora. Este decréscimo na curva mostra a fase de morte, onde o meio de fermentação não apresenta mais condições necessárias para o seu desenvolvimento, seja por falta de nutrientes, população muito grande de leveduras ou intoxicação por etanol, sendo assim, como neste período não ocorreu aumento da biomassa não é

percebido um consumo significativo dos açúcares, que se mantiveram estáveis da 26^a a 32^a hora, finalizando a fermentação com 9 ° Brix.

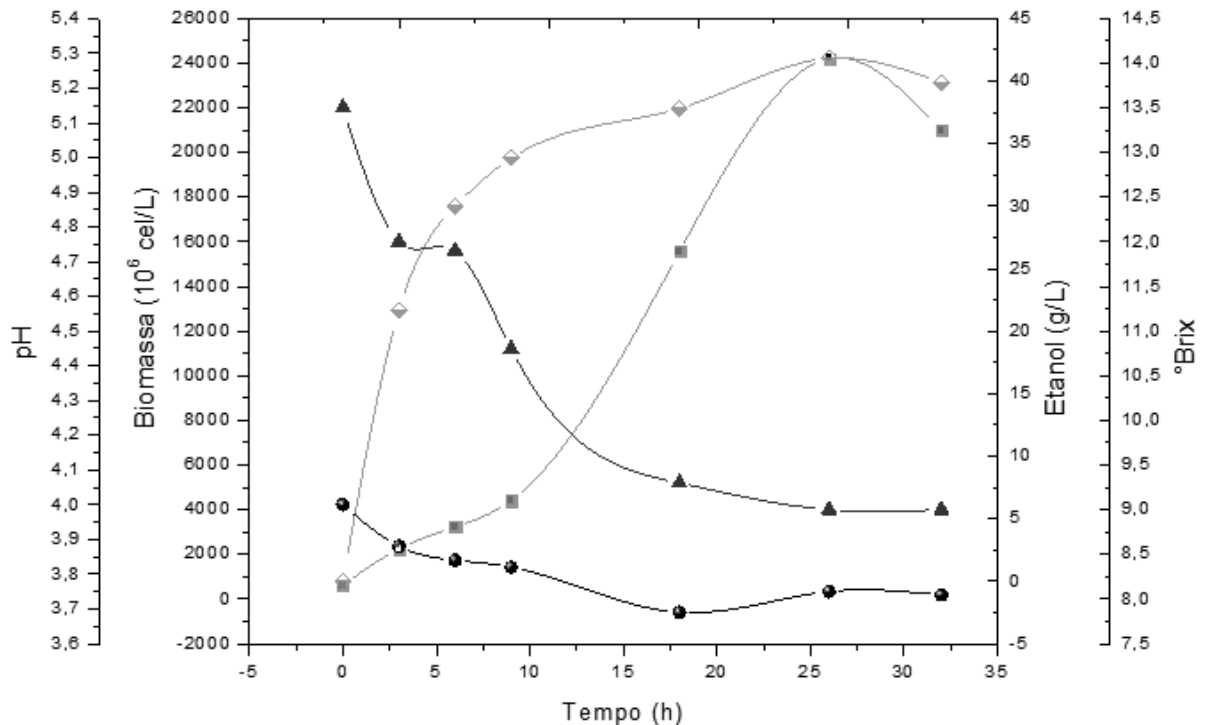


Figura 16 – Gráfico para a condição que apresentou maior produção de etanol utilizando uma temperatura de 35 °C e um pH de 4,0.

Para o comportamento do pH observa-se que no início da fermentação o mosto apresentava pH de 4,00, do início até a 9^a hora ocorreu uma redução do pH até chegar a 9^a hora com um valor de 3,82, mesmo período o consumo do substrato era moderado, devido a fase inicial de crescimento das leveduras.

A partir da 9^a, onde inicia-se a fase de crescimento exponencial da levedura, uma redução acentuada no pH foi observada passando de 3,82 para 3,69 na 18^a hora. Na 26^a hora uma elevação do pH ocorreu passando de 3,69 (18^a hora) para 3,75 e finalizando a fermentação na 32^a hora com um pH final de 3,74.

Segundo Ribeiro (2010) durante a fermentação o pH pode variar por diversas razões, como variações devido ao consumo de fontes de nitrogênio e também formação de ácidos, tais como acético, láctico, pirúvico e succínico.

Verifica-se que a taxa de produção de etanol foi elevada do início até a 8^a hora, iniciando a fermentação com 0,00 g/L e chegando a 33,80 g/L na 8^a, é possível

observar o consumo dos açúcares pelas leveduras através do decaimento dos graus brix e com o aumento da concentração de leveduras.

Durante a fase log do crescimento das leveduras foi possível verificar que não ocorreu uma produção acentuada de etanol, sendo que no início desta fase, na 9ª hora, o sistema apresentava uma produção de etanol de 33,80 g/L e na 26ª hora uma concentração de 41,60 g/L, sendo este o momento em que a produção de etanol chegou a sua máxima concentração.

A partir da 26ª, juntamente com a fase de decrescimento das leveduras, observou-se que a produção de etanol foi reduzida, passando de uma concentração de 41,60 g/L para 39,90 g/L na 32ª hora. Como o sistema de fermentação é por batelada e não ocorreu aumento na quantidade de leveduras, não houve consumo significativo dos açúcares e desta forma também não ocorreu mais a produção de etanol, sendo o período de fermentação finalizado.

O rendimento da conversão de substrato para etanol foi determinado aplicando a equação 1 do item 3.4.1, sendo que inicialmente havia 102,5 g/L de lactose e ao final da fermentação apresentava um teor alcoólico de 41,8 g/L, desta forma o rendimento foi de 75,80 % na produção de etanol a partir do permeado de soro de leite.

No trabalho realizado por Baller (2014) um rendimento de 82,89% foi encontrado quando feita a fermentação em um pH de 4,50 e uma temperatura de 30 °C, resultado semelhante foi encontrado na fermentação 68,42%

Domingues et al (1999) também utilizou o permeado como substrato, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente para hidrolisar a lactose, utilizando um valor de pH de 4,00 e 30 °C, e foram encontrados uma conversão de substrato em etanol de 80 %.

5 CONCLUSÕES

- O planejamento experimental não apresentou um bom ajuste, pois os valores observados apareceram não perto o suficiente da reta identidade.
- Por meio da análise de superfície de resposta foi encontrada uma faixa de maior conversão da lactose em etanol. Sendo próximo a uma temperatura de 25 °C e um pH na faixa de 4,00 apresentando uma produção de 46 g/L de etanol, ou seja um rendimento próximo a 83,5 %.
- Condição com maior produção de etanol foi utilizando a concentração de 0,4 g/L de levedura, pH de 4,0 e temperatura de 35 °C. Sendo produzido 41,8 g/L de etanol que proporcionou um rendimento de 75,80 %.
- O permeado de soro de leite é um subproduto com grande potencial para a produção de etanol.

6 SUGESTÕES

- Testar as condições com o melhor rendimento proposto pelo planejamento experimental.

- Utilizar outros micro organismos para a fermentação.

- Testar a suplementação do permeado de soro de leite com agentes minerais, carboidratos ou outros componentes que podem melhorar o desempenho do micro organismo aplicado na hidrolise e fermentação alcoólica.

- Fazer uso de uma solução tamponante para manter o pH constante durante cada experimento realizado.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R; BASSO, L.C. **Efeito da trealose na manutenção da viabilidade células de leveduras desidratadas por liofilização**. Scientia Agricola. v.54, n.3, setembro/dezembro, 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161997000200013 Acesso em 25 de julho de 2014.

ALVES, Emanuele Amorin e GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Volume 2. Rio de Janeiro 2010.

ALTERTHUMM, Flávio. **Biotecnologia Industrial, Fundamentos I**. Volume 1. Capítulo 1. Blucher. São Paulo, 2008.

ANDRADE, Ailton Cesar de. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANTUNES, Aloísio José. **Funcionalidade de Proteínas do soro de leite bovino**. Barueri: Manole, 2003.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. International, 18^a Edição, 2005.

ASSUNÇÃO, G.M et al. **Uso do permeado de soro de queijo com e sem suplementação para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae***. V Símposio de Engenharia Química, Maringá, 2013.

ARAUJO, Magno de Souza. **Produção de Etanol Neutro a Partir do Soro de Queijo Coalho por Destilação Convencional**. Dissertação (Mestrado em Sistemas

Agroindustriais) - Programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, 2013.

BALDASSO, Camila. **Concentração, Purificação e fracionamento das proteínas do Soro Lácteo através da tecnologia de Separação por Membranas.** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

BALLER, Leocir Dante. **Estudo da hidrólise da lactose do permeado de soro de leite pela enzima β -galactosidase seguido da fermentação alcoólica.** Tese (Tese de Conclusão de Curso em Tecnologia em Processos Químicos) – Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2014.

BARBOSA, Antusia dos Santos, et al. **Estudo Cinético da Fermentação do Soro de Queijo de Coalho para Produção de Aguardente.** Revista Verde, Mossoró, v.5, n.3, p, 237-254, julho/setembro 2010.

BELINCANTA, Juliana. **Coluna de para-destilação: análise das características hidrodinâmicas e de eficiência de murphree.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BRIÃO, V.B; TAVARES, G.C.R. **Geração de efluentes na indústria de laticínios: atitudes preventivas e oportunidades.** 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Campo Grande, 2005.

CAMILI, E. A.; CABELLO, C. Produção de Etanol de Manipueira Tratada com Processo de Flotação. **Revista Raízes E Amidos Tropicais**, v.3, n.1, 2007.

CAMPBELL, Marry K.; FARRELL Shawn O. **Biochemistry.** 7 ed. Canadá: Brooks/Cole Cengage Learning, 2012.

DOMINGUES et al. **Novas metodologias para fermentação alcoólica do soro de queijo**. Lisboa, 1999. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNQA-C15-30%5b2%5d.PDF>>. Acesso em: 02 de junho de 2014.

FARAHNAHK F. et al. **Construction of lactose-assimilating and high-ethanol-producing yeast by protoplast fusion**. Environmental Microbiology, n.2, v.51, p. 362-367, 1986.

FLORENCIO, Isanna M. et al. **Produção de etanol a partir de lactossoro industrial**, Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. n.10, v.10, p.1088-1092, 2013.

GABARDO, Sabrina. **Otimização da Bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instrução Normativa 68. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2008.

ISO 6887-2. **"Microbiology of food for human consumption and animal feed. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological consideration."** 2004.

KOSIKOWSKI, F.U. Whey utilization and whey products. Journal of Dairy Science, v.62, p.1149-1160, 1979.

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. Rio Grande do Sul, 2013.

LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. Editora Edgard Blücher: São Paulo, 2001.

LONGO, Giovana. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOPES, A. M., FONSECA, A. **Biologia Microbiana**. Universidade Aberta, Portugal, 1996.

MADRID, A; CENZANO, I VICENTE J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo. Livraria Varela, 1995.

MIGLIORANZA, L.H.S. **Soro como solução e não como problema**. Food Ingredients, v.3, p.32, 2002.

MOREIRA, E. G; ROCHA, J. C. G. e RAMOS A. M. **A ultrafiltração e sua aplicabilidade na área de alimentos**. Revista Meio Filtrante, n.50, maio/junho de 2011. Disponível em: <http://www.meiofiltrante.com.br/materias_ver.asp?action=detalhe&id=701&revista=n50>. Acesso em: 30 de junho de 2014.

MULDER, Marcel. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2 ed. Enschede, The Netherlands: Kluwe Academic Publishers, 1996.

NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino e BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora Unicamp: Campinas, 2001.

NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. Artigo Técnico. **Revista Leite e Derivados**, n.10, p.50-54, 1993.

PEREIRA, Ivan de Oliveira. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2009.

RIBEIRO. F.A.M. **Fermentação Alcoólica**. Uberaba, 2010. Apostila do Moduloll - Processamento na industria sucroalcooleira da FAZU. RODRIGUES FILHO, A.

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

SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher , 2001.

SEBRAE. São Paulo. **Técnicas e Boas Práticas na Produção de Queijo**. Disponível em :<http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_02_27_RT_Novembro_Agronegocio_QueijoIN30_pdf.pdf>. Acesso em: 02 de julho de 2014.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela, p.517, 1996.

SISO M. I. G. **The Biotechnological utilization of cheese whey: a review**. **Bioresource Technology**, v.57, p. 1-11, 1996.

SOLOMONS, T. W. G. e FRUHLE, C. B. **Química Orgânica.**, 7ª edição. Rio de Janeiro, 2001.

VARIOLAC. **Coproducts of Milk and Whey Processing**, EUA. 2012.

VIEIRA, Aline A. M. T. **Estudo da hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases lactozym[®] e prozyn[®]**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

ZACARCHENCO, Patrícia B. et al. **Permeado de soro: aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite**. Anuário Leite & Derivados. Ano XXI, n.131, São Paulo, 2012.

Anexo 1. Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa.

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,98650	10,0	0,98239	13,5	0,97851	17,0	0,97478	20,5
0,98637	10,1	0,98227	13,6	0,97840	17,1	0,97467	20,6
0,98626	10,2	0,98216	13,7	0,97829	17,2	0,97456	20,7
0,98614	10,3	0,98204	13,8	0,97818	17,3	0,97445	20,8
0,98602	10,4	0,98193	13,9	0,97807	17,4	0,97435	20,9
0,98590	10,5	0,98182	14,0	0,97797	17,5	0,97424	21,0
0,98578	10,6	0,98171	14,1	0,97786	17,6	0,97414	21,1
0,98566	10,7	0,98159	14,2	0,97775	17,7	0,97404	21,2
0,98554	10,8	0,98148	14,3	0,97764	17,8	0,97393	21,3
0,98542	10,9	0,98137	14,4	0,97754	17,9	0,97382	21,4
0,98530	11,0	0,98126	14,5	0,97743	18,0	0,97371	21,5
0,98518	11,1	0,98115	14,6	0,97732	18,1	0,97360	21,6
0,98506	11,2	0,98103	14,7	0,97721	18,2	0,97350	21,7
0,98494	11,3	0,98092	14,8	0,97711	18,3	0,97339	21,8
0,98482	11,4	0,98081	14,9	0,97700	18,4	0,97328	21,9
0,98470	11,5	0,98070	15,0	0,97690	18,5	0,97317	22,0
0,98459	11,6	0,98058	15,1	0,97679	18,6	0,97306	22,1
0,98447	11,7	0,98047	15,2	0,97668	18,7	0,97295	22,2
0,98435	11,8	0,98036	15,3	0,97657	18,8	0,97285	22,3
0,98424	11,9	0,98025	15,4	0,97646	18,9	0,97274	22,4
0,98412	12,0	0,98014	15,5	0,97636	19,0	0,97263	22,5
0,98400	12,1	0,98003	15,6	0,97626	19,1	0,97252	22,6
0,98388	12,2	0,97992	15,7	0,97616	19,2	0,97241	22,7
0,98377	12,3	0,97981	15,8	0,97605	19,3	0,97230	22,8
0,98365	12,4	0,97970	15,9	0,97595	19,4	0,97219	22,9
0,98354	12,5	0,97959	16,0	0,97584	19,5	0,97208	23,0
0,98342	12,6	0,97948	16,1	0,97574	19,6	0,97197	23,1
0,98330	12,7	0,97937	16,2	0,97563	19,7	0,97185	23,2
0,98318	12,8	0,97926	16,3	0,97553	19,8	0,97174	23,3
0,98307	12,9	0,97915	16,4	0,97542	19,9	0,97163	23,4
0,98296	13,0	0,97905	16,5	0,97531	20,0	0,97152	23,5
0,98285	13,1	0,97894	16,6	0,97521	20,1	0,97141	23,6
0,98274	13,2	0,97883	16,7	0,97511	20,2	0,97130	23,7
0,98263	13,3	0,97872	16,8	0,97500	20,3	0,97118	23,8
0,98251	13,4	0,97862	16,9	0,97489	20,4	0,97107	23,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,97096	24,0	0,96695	27,5	0,96270	31,0	0,95802	34,5
0,97084	24,1	0,96683	27,6	0,96257	31,1	0,95788	34,6
0,97073	24,2	0,96671	27,7	0,96244	31,2	0,95774	34,7
0,97062	24,3	0,96660	27,8	0,96231	31,3	0,95759	34,8
0,97051	24,4	0,96648	27,9	0,96218	31,4	0,95745	34,9
0,97040	24,5	0,96636	28,0	0,96206	31,5	0,95731	35,0
0,97028	24,6	0,96624	28,1	0,96193	31,6	0,95717	35,1
0,97017	24,7	0,96612	28,2	0,96180	31,7	0,95702	35,2
0,97006	24,8	0,96601	28,3	0,96167	31,8	0,95688	35,3
0,96994	24,9	0,96588	28,4	0,96154	31,9	0,95673	35,4
0,96984	25,0	0,96576	28,5	0,96141	32,0	0,95659	35,5
0,96974	25,1	0,96565	28,6	0,96128	32,1	0,95645	35,6
0,96961	25,2	0,96553	28,7	0,96115	32,2	0,95630	35,7
0,96950	25,3	0,96541	28,8	0,96101	32,3	0,95616	35,8
0,96938	25,4	0,96529	28,9	0,96088	32,4	0,95601	35,9
0,96927	25,5	0,96517	29,0	0,96075	32,5	0,95587	36,0
0,96916	25,6	0,96505	29,1	0,96062	32,6	0,95572	36,1
0,96904	25,7	0,96493	29,2	0,96049	32,7	0,95558	36,2
0,96893	25,8	0,96480	29,3	0,96035	32,8	0,95543	36,3
0,96881	25,9	0,96468	29,4	0,96022	32,9	0,95528	36,4
0,96870	26,0	0,96456	29,5	0,96009	33,0	0,95513	36,5
0,96858	26,1	0,96444	29,6	0,95995	33,1	0,95499	36,6
0,96847	26,2	0,96432	29,7	0,95982	33,2	0,95484	36,7
0,96835	26,3	0,96419	29,8	0,95968	33,3	0,95469	36,8
0,96824	26,4	0,96407	29,9	0,95955	33,4	0,95455	36,9
0,96812	26,5	0,96395	30,0	0,95941	33,5	0,95440	37,0
0,96800	26,6	0,96383	30,1	0,95927	33,6	0,95425	37,1
0,96789	26,7	0,96370	30,2	0,95914	33,7	0,95410	37,2
0,96777	26,8	0,96357	30,3	0,95900	33,8	0,95394	37,3
0,96766	26,9	0,96345	30,4	0,95887	33,9	0,95379	37,4
0,96754	27,0	0,96333	30,5	0,95873	34,0	0,95364	37,5
0,96742	27,1	0,96320	30,6	0,95859	34,1	0,95349	37,6
0,96730	27,2	0,96308	30,7	0,95845	34,2	0,95334	37,7
0,96719	27,3	0,96295	30,8	0,95830	34,3	0,95318	37,8
0,96707	27,4	0,96283	30,9	0,95816	34,4	0,95303	37,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,95288	38,0	0,94728	41,5	0,94124	45,0	0,93472	48,5
0,95272	38,1	0,94711	41,6	0,94106	45,1	0,93453	48,6
0,95257	38,2	0,94695	41,7	0,94088	45,2	0,93434	48,7
0,95241	38,3	0,94678	41,8	0,94070	45,3	0,93414	48,8
0,95226	38,4	0,94662	41,9	0,94052	45,4	0,93395	48,9
0,95210	38,5	0,94645	42,0	0,94034	45,5	0,93376	49,0
0,95194	38,6	0,94628	42,1	0,94015	45,6	0,93357	49,1
0,95179	38,7	0,94611	42,2	0,93997	45,7	0,93337	49,2
0,95163	38,8	0,94594	42,3	0,93979	45,8	0,93318	49,3
0,95148	38,9	0,94577	42,4	0,93961	45,9	0,93298	49,4
0,95132	39,0	0,94560	42,5	0,93943	46,0	0,93279	49,5
0,95116	39,1	0,94543	42,6	0,93924	46,1	0,93260	49,6
0,95100	39,2	0,94526	42,7	0,93906	46,2	0,93240	49,7
0,95084	39,3	0,94509	42,8	0,93887	46,3	0,93221	49,8
0,95068	39,4	0,94492	42,9	0,93869	46,4	0,93201	49,9
0,95052	39,5	0,94475	43,0	0,93850	46,5	0,93182	50,0
0,95037	39,6	0,94458	43,1	0,93831	46,6	0,93162	50,1
0,95021	39,7	0,94440	43,2	0,93813	46,7	0,93142	50,2
0,95005	39,8	0,94423	43,3	0,93794	46,8	0,93122	50,3
0,94989	39,9	0,94405	43,4	0,93776	46,9	0,93102	50,4
0,94973	40,0	0,94388	43,5	0,93757	47,0	0,93082	50,5
0,94957	40,1	0,94371	43,6	0,93738	47,1	0,93063	50,6
0,94941	40,2	0,94353	43,7	0,93719	47,2	0,93043	50,7
0,94924	40,3	0,94336	43,8	0,93701	47,3	0,93023	50,8
0,94908	40,4	0,94318	43,9	0,93682	47,4	0,93003	50,9
0,94892	40,5	0,94301	44,0	0,93663	47,5	0,92983	51,0
0,94876	40,6	0,94283	44,1	0,93644	47,6	0,92963	51,1
0,94860	40,7	0,94266	44,2	0,93625	47,7	0,92943	51,2
0,94843	40,8	0,94248	44,3	0,93606	47,8	0,92922	51,3
0,94827	40,9	0,94230	44,4	0,93587	47,9	0,92902	51,4
0,94811	41,0	0,94213	44,5	0,93568	48,0	0,92882	51,5
0,94794	41,1	0,94195	44,6	0,93549	48,1	0,92862	51,6
0,94778	41,2	0,94177	44,7	0,93530	48,2	0,92842	51,7
0,94761	41,3	0,94159	44,8	0,93510	48,3	0,92821	51,8
0,94745	41,4	0,94142	44,9	0,93491	48,4	0,92801	51,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,92781	52,0	0,92057	55,5	0,91300	59,0	0,90507	62,5
0,92761	52,1	0,92036	55,6	0,91278	59,1	0,90484	62,6
0,92740	52,2	0,92015	55,7	0,91255	59,2	0,90461	62,7
0,92720	52,3	0,91993	55,8	0,91233	59,3	0,90438	62,8
0,92700	52,4	0,91972	55,9	0,91210	59,4	0,90415	62,9
0,92679	52,5	0,91951	56,0	0,91188	59,5	0,90392	63,0
0,92659	52,6	0,91930	56,1	0,91166	59,6	0,90369	63,1
0,92639	52,7	0,91908	56,2	0,91143	59,7	0,90346	63,2
0,92619	52,8	0,91887	56,3	0,91121	59,8	0,90323	63,3
0,92598	52,9	0,91865	56,4	0,91098	59,9	0,90300	63,4
0,92578	53,0	0,91844	56,5	0,91076	60,0	0,90276	63,5
0,92557	53,1	0,91823	56,6	0,91053	60,1	0,90253	63,6
0,92536	53,2	0,91801	56,7	0,91031	60,2	0,90230	63,7
0,92516	53,3	0,91780	56,8	0,91008	60,3	0,90207	63,8
0,92496	53,4	0,91758	56,9	0,90986	60,4	0,90184	63,9
0,92475	53,5	0,91737	57,0	0,90963	60,5	0,90161	64,0
0,92454	53,6	0,91715	57,1	0,90941	60,6	0,90137	64,1
0,92434	53,7	0,91694	57,2	0,90918	60,7	0,90114	64,2
0,92413	53,8	0,91672	57,3	0,90896	60,8	0,90091	64,3
0,92393	53,9	0,91651	57,4	0,90873	60,9	0,90067	64,4
0,92372	54,0	0,91629	57,5	0,90851	61,0	0,90043	64,5
0,92351	54,1	0,91607	57,6	0,90828	61,1	0,90020	64,6
0,92330	54,2	0,91586	57,7	0,90805	61,2	0,89997	64,7
0,92309	54,3	0,91564	57,8	0,90782	61,3	0,89973	64,8
0,92288	54,4	0,91543	57,9	0,90759	61,4	0,89950	64,9
0,92267	54,5	0,91521	58,0	0,90736	61,5	0,89926	65,0
0,92247	54,6	0,91499	58,1	0,90714	61,6	0,89902	65,1
0,92226	54,7	0,91477	58,2	0,90691	61,7	0,89879	65,2
0,92205	54,8	0,91455	58,3	0,90666	61,8	0,89855	65,3
0,92184	54,9	0,91433	58,4	0,90645	61,9	0,89831	65,4
0,92163	55,0	0,91410	58,5	0,90622	62,0	0,89807	65,5
0,92142	55,1	0,91388	58,6	0,90599	62,1	0,89784	65,6
0,92121	55,2	0,91366	58,7	0,90576	62,2	0,89760	65,7
0,92099	55,3	0,91344	58,8	0,90553	62,3	0,89736	65,8
0,92078	55,4	0,91322	58,9	0,90530	62,4	0,89713	65,9

D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v	D 20°C/20°C	% v/v
0,89689	66,0	0,89401	67,2	0,89109	68,4	0,88814	69,6
0,89665	66,1	0,89376	67,3	0,89085	68,5	0,88789	69,7
0,89641	66,2	0,89352	67,4	0,89061	68,6	0,88765	69,8
0,89617	66,3	0,89328	67,5	0,89036	68,7	0,88740	69,9
0,89593	66,4	0,89304	67,6	0,89012	68,8	0,88715	70,0
0,89569	66,5	0,89280	67,7	0,88987	68,9	0,88690	70,1
0,89545	66,6	0,89255	67,8	0,88963	69,0	0,88665	70,2
0,89521	66,7	0,89231	67,9	0,88938	69,1	0,88640	70,3
0,89497	66,8	0,89207	68,0	0,88913	69,2	0,88615	70,4
0,89473	66,9	0,89183	68,1	0,88889	69,3	0,88590	70,5
0,89449	67,0	0,89158	68,2	0,88864	69,4	0,88565	70,6
0,89425	67,1	0,89134	68,3	0,88839	69,5	-	-