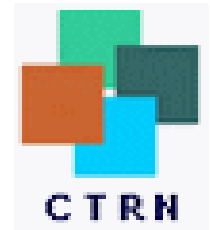




UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola

*Área de Processamento e Armazenamento
de Produtos Agrícola*



Estudo do Aproveitamento do Lactossoro de Coagulação Enzimática para Fermentação e Produção de Aguardente

POR:

Isanna Menezes Florêncio

ORIENTADORES:

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Profa. Dra. Eliane Rolim Florentino



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola

*Área de Processamento e Armazenamento
de Produtos Agrícola*



Isanna Menezes Florêncio

***Estudo do Aproveitamento do Lactossoro de Coagulação
Enzimática para Fermentação e Produção de Aguardente***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola

CAMPINA GRANDE – PB
(Novembro, 2008)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

F632e

2008 Florêncio, Isanna Menezes.

Estudo do aproveitamento do lactossoro de coagulação enzimática para fermentação e produção de aguardente / Isanna Menezes Florêncio. — Campina Grande, 2008.

71f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais.

Referências.

Orientadores: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Profª Dra. Eliane Rolim Florentino.

1. Soro de Queijo. 2. Extração das Proteínas. 3. Processo Fermentativo. 4. Bebida Destilada. I. Título.

CDU – 637.344(043)

UFCG - BIBLIOTECA - CAMPUS I	
478	15-02-031



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA



PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

ISANNA MENEZES FLORÊNCIO

ESTUDO DO APROVEITAMENTO DO LACTOSSORO DE COAGULAÇÃO
ENZIMÁTICA PARA FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE AGUARDENTE

BANCA EXAMINADORA

PARECER



Dr. Fábio Luiz Honorato da Silva – Orientador

Aprovado



Dra. Eliane Rolim Florentino – Orientadora

Aprovada



Dra. Josivanda Palmeira Gomes – Examinadora

APROVADO



Dra. Alfredina dos Santos Araújo – Examinadora

Aprovada

NOVEMBRO - 2008

Tudo é do pai

Toda honra e toda glória

É dele a vitória

Alcançada em minha vida

(Pe. Fábio de Melo)

*A meus pais, Antônio Fernando e Veronica Ivone,
cujos exemplos de vida, amor, fé e coragem
são minha fortaleza*

e a Deus,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho, dando-me força, coragem, prudência, paciência e discernimento para chegar a esta nova etapa de minha vida.

A meus pais, Antônio Fernando e Verônica Ivone, pelo amor, apoio, paciência e amizade, meu pilar de sustentação e aconchego. Agradeço-lhes também pela educação, embora não tenha dado, em muitos momentos, o valor merecido; mas hoje sei, que tudo que sou devo aos valores e limites repassados por vocês.

A meu irmão, Saulo José, pela compreensão nas horas críticas, principalmente no estresse do dia-a-dia, e pela força, estendendo-me a mão quando eu mais precisava.

A minha irmã, Fernanda Andréa, pelo apoio e a cresça que tanto me fortaleceu; ao meu lindo sobrinho, Víctor Henrique, que conseguia me fazer sorrir mesmo nas horas mais estressantes.

Ao meu namorado, Igor Veloso, que me entendeu e me ajudou a acreditar que sou capaz de mudar o mundo, se necessário.

Ao meu orientador, Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, que sempre esteve pronto a sanar todas as minhas dúvidas e também pela confiança.

À minha orientadora, Dra. Eliane Rolim Florentino que, além de ser a pessoa responsável pelo meu sucesso, também foi eleita uma segunda mãe, pela ajuda, compreensão e amizade.

A todos que fazem parte do LEB (Laboratório de Engenharia Bioquímica), em especial a Alberto, que sempre esteve à disposição para me ajudar; a Mércia, sempre muito prestativa; a Aleksandra e Clóvis, dois amigos que nunca mediram esforços para me ajudar; a Marcelo, sempre muito atencioso; a Bruno, a Sulamy e Skaymenn, que sempre me passaram muito carinho; enfim, a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a realizar este sonho.

Sem me esquecer, é claro, de todos que torceram por minha vitória na Universidade Estadual da Paraíba, em especial a Wanda Izabel, que sempre me fez sentir capaz, e a Fátima Nascimento, pelo carinho.

Aos amigos e colaboradores, em especial a duas pessoas: Rayviglimar e Magno, pela ajuda e compreensão.

A Luiz, químico industrial da Indústria de Laticínios Cariri, pelo fornecimento do soro de queijo utilizado no trabalho.

Aos que fazem parte da Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em especial á minha turma (Leila, Dyalla, Izabel, Tailândia, Marcos, Alberto, França, Niedja, Karla, Katycilania, Celeida, Dayana) e aos professores Dra. Maria Elita, Dr. Mário Eduardo, Dra. Josivanda Palmeira e Dr. Juarez, obrigada por tudo.

A minha coordenadora, Josivanda Palmeira Gomes, pela ajuda, compreensão, amizade e paciência; enfim, aos que fazem parte da coordenação, Dona Rivanilda, Dona Aparecida e Elaine.

À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), através da COPEAG, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio à pesquisa e ao incentivo financeiro.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Objetivos	4
1.1.1 – Objetivos gerais	4
1.1.2 – Objetivos específicos	4
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – Queijo	5
2.1.1 - Componentes do queijo	5
2.1.2 - Classificação dos queijos	6
2.1.2.1 – Porcentagem de gordura	6
2.1.2.2 – Processo de coagulação	7
2.1.2.3 – Maturação	7
2.1.3 - Queijo “Tipo Coalho”	7
2.2 - Soro de queijo	8
2.3 – Lactose	10
2.4 - Proteínas do soro de queijo	11
2.5 – Separação das proteínas do soro	12
2.5.1 – Precipitação das proteínas por acidificação do soro aquecido	12
2.6 – Fermentação alcoólica	13
2.6.1 – Agentes da fermentação alcoólica	14
2.6.2 – Tipos de fermento	15
2.7 – Bebidas alcoólicas	16
2.7.1 – Bebidas destiladas	16
2.7.2 – Aguardentes	17
2.8 – Planejamento experimental	20
2.9 – Estado da arte	20
2.9.1 – Soro de queijo	20
2.9.2 – Fermentação alcoólica	22
2.9.3 – Aguardente	24

3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Matéria-prima	27
3.2 – Caracterização do soro	27
3.2.1 – Acidez	27
3.2.2 – Gordura	27
3.2.3 – pH	27
3.2.4 – Proteína	28
3.2.5 – Sais minerais (cinzas)	28
3.2.6 – Lactose	28
3.2.7 – Extrato seco total (E.S.T.)	28
3.3 – Precipitação das proteínas do soro	28
3.4 – Ensaio de fermentação alcoólica	28
3.4.1 – Microrganismo	28
3.4.2 – Chaptalização	29
3.4.3 – Planejamento fatorial para a fermentação alcoólica realizada em biorreator	29
3.4.4 – Cinética da fermentação alcoólica realizada em biorreator (ampliação de escala)	30
3.4.5 – Métodos analíticos	31
3.4.5.1 – Teor alcoólico	31
3.4.5.2 – Açúcares redutores totais (ART)	31
3.4.5.3 – Concentração celular	31
3.4.5.4 – pH	31
3.4.5.5 – Acidez total, acidez fixa e acidez volátil	31
3.4.5.6 – Sólidos solúveis totais (°Brix)	32
3.4.5 – Percentual de conversão, produtividade e parâmetros cinéticos fermentação alcoólica	32
3.4.6 – Centrifugação do fermentado	33
3.5 – Destilação (produção do aguardente)	33
3.5.1 – Bidestilação	33
3.5.2 – Tridestilação	34
3.5.3 – Análises realizadas	34
3.5.3.1 – Polarografia	34
3.5.3.2 – Cromatografia	34
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 – Caracterização do soro de queijo de coagulação enzimática	36
4.3 – Separação das proteínas	38
4.4 – Ensaio da fermentação alcoólica	39
4.4.1 – Cinética da fermentação alcoólica	43

4.5 – Destilação (produção da aguardente)	55
5 – CONCLUSÕES	61
6 – PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	63
7 – LITERATURA CITADA	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 4.1	Gráfico de Pareto para a % conversão	41
Figura 4.2	Superfície de resposta para a % conversão	42
Figura 4.3	Histograma dos valores de % conversão para os 11 ensaios realizado	43
Figura 4.4	Comportamento do ART durante a fermentação alcoólica	44
Figura 4.5	Comportamento de crescimento celular durante a fermentação alcoólica	45
Figura 4.6	Comportamento da produção de etanol durante a fermentação alcoólica	46
Figura 4.7	Comportamento dos sólidos solúveis durante a fermentação alcoólica	47
Figura 4.8	Comportamento do pH durante a fermentação alcoólica	48
Figura 4.9	Comportamento da acidez total do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado	49
Figura 4.10	Comportamento da acidez fixa do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado	49
Figura 4.11	Comportamento da acidez volátil do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado	50
Figura 4.12	Comportamento do crescimento celular no reator 1	52
Figura 4.13	Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 1	52
Figura 4.14	Comportamento do crescimento celular no reator 2	53
Figura 4.15	Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 2	53
Figura 4.16	Comportamento do crescimento celular no reator 3	54
Figura 4.17	Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 3	54
Figura 4.18	Cinética da tridestilação para produção de aguardente de soro de queijo	58

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Tabela 2.1	Padrões para a produção de aguardente	18
Tabela 3.1	Valores reais e codificados das variáveis de entrada	29
Tabela 3.2	Matriz do planejamento fatorial completo 2^2	29
Tabela 3.3	Valores reais e decodificados das variáveis de entrada	30
Tabela 3.4	Matriz de planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela	30
Tabela 4.1	Média dos resultados das análises físico-químicas do soro de queijo “Tipo Coalho” de uma industrial de laticínio localizado no Cariri paraibano	36
Tabela 4.2	Médias dos componentes do soro de queijo desproteinizado	38
Tabela 4.3	Condições dos ensaios do planejamento experimental	39
Tabela 4.4	ANOVA (Análise de variância) para o modelo linear	39
Tabela 4.5	Condições dos ensaios do planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela	40
Tabela 4.6	ANOVA (Análise de variância) para o modelo quadrático	41
Tabela 4.7	Valores dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica	50
Tabela 4.8	Valores coletados do destilado com separação de frações cabeça (10%), coração (80%) e cauda (10%)	55
Tabela 4.9	Análises físico-químicas e dos componentes voláteis e alcoóis superiores da aguardente destilada	56
Tabela 4.10	Valores coletados do tridestilado com separação de frações cabeça, coração e cauda	58
Tabela 4.11	Análises físico-químicas e dos componentes voláteis e alcoóis superiores da aguardente tridestilada	59

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto resultante da fabricação do queijo ou da extração da caseína e contém, aproximadamente, metade dos sólidos presentes no leite. O aproveitamento do soro de queijo é uma maneira de minimizar os problemas causados pela disposição inadequada deste soro, tornando-se matéria-prima bastante interessante na fabricação de inúmeros produtos, entre eles a aguardente. O objetivo deste trabalho foi a produção de aguardente (um produto muito consumido no Brasil) utilizando-se, como substrato, o soro de queijo, tornando-se uma alternativa para as pequenas e médias indústrias de laticínio. A matéria-prima utilizada foi o soro de queijo “Tipo Coalho”, produzido em indústria de laticínio do Cariri paraibano, coletado e acondicionado de maneira que não alterasse sua composição. O soro foi caracterizado e desproteínizado pelo método ácido térmico, para conhecimento de seus componentes, como: sais minerais, proteínas, lactose e extrato seco total. A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 6000 mL contendo 1000 mL de soro desproteínizado, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial) e se adicionando, ao meio, sacarose, por saber que a *S. cerevisiae* não sintetiza a B-galactosidase, enzima capaz de hidrolisar a lactose, significando que o soro se apresenta, essencialmente, como fonte de sais minerais e aminoácidos necessários ao processo fermentativo. Realizou-se um estudo para verificar as influências das variáveis de entrada (concentração inicial de sacarose e concentração inicial de inóculo) sobre a resposta porcentagem de conversão utilizando-se um planejamento fatorial, através do qual se notou que o melhor valor encontrado foi de 76,14% de conversão no experimento em que foram acondicionados 130 g/L de sacarose e 1,8 g/L de inóculo. Uma ampliação da escala na qual a fermentação alcoólica foi acompanhada durante 44 horas, foi realizada através das seguintes determinações: pH, acidez (total, fixa e volátil), açúcares redutores totais, teor de sólidos solúveis, etanol e concentração celular. Deste processo fermentativo se obtiveram 15 L de fermentado, que foi centrifugado e destilado em alambique de cobre com volume útil de 20 L, dividido em frações (cabeça – 10%, coração – 80% e cauda – 10%). O destilado teve aspecto esbranquiçado (turbidez) sendo necessária uma nova destilação (bidestilação); o produto obtido foi diluído e reconduzido ao alambique, cujo processo de bidestilação não obteve resultado diferente do destilado; realizou-se, então uma tridestilação, seguindo-se o mesmo procedimento da bidestilação, do qual resultou uma aguardente límpida. Nas análises físico-químicas realizadas foram observadas, tanto da aguardente destilada como da tridestilada, uma proporção elevada de carbamato de etila e álcoois superiores; no entanto, os outros componentes secundários (ésteres totais, aldeídos totais, furfural, álcool metílico, acroleína, álcoois séc-butílico e n-butílico, cádmio, chumbo e cobre) estão abaixo dos padrões exigidos pela Legislação Brasileira. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o uso do soro de queijo é visivelmente promissor para a produção de aguardente, tornando-se oportuno um estudo mais detalhado para minimizar os

componentes indesejáveis, como o carbamato de etila e a soma da concentração dos álcoois superiores.

Palavras-chave: soro de queijo, extração das proteínas, processo fermentativo, bebida destilada

ABSTRACT

Cheese whey is a sub-product resulting from cheese production or from the extraction of casein and it contains approximately half of the solids present in milk. The usage of cheese whey is a way of minimizing the problems caused by its inadequate disposal, making this a highly interesting raw material in the manufacturing of innumerable products, and among them, a type of white-rum. The objective of this research was the production of this white-rum (a product which is much consumed in Brazil), using cheese whey as substrate, making it an alternative for small and medium-sized dairy industries. The ingredient used was the whey from a curdled type of fresh cheese produced in a dairy industry in the semi-arid region of the Brazilian state of Paraíba. This whey was collected and packaged in a way that wouldn't alter its composition. The whey was characterized, de-proteinized by the thermal acid method, in order to know its components, such as: minerals, proteins, lactose and total dry extract. Fermentation was performed in 6000 L Erlenmeyer containing 1000 L of de-proteinized whey, utilizing *Saccharomyces cerevisiae* yeast (commercial ferment), adding sucrose to the mean, knowing that *S. cerevisiae* doesn't synthesize B-glycosidase, an enzyme capable of hydrolyzing lactose, which means that the whey presents itself essentially as a source of necessary minerals and amino acids necessary to the fermentative process. A study to verify the influences of the input variables (initial concentration of sucrose and initial concentration of innocuous) over the conversion response was performed, using an experimental planning method, observing that the best value found was of 76.14% of conversion in the experiment in which 130 g/L of sucrose and 1.8 g/L of innocuous were added. An increase in the scale in which the alcoholic fermentation was followed up during 44 hours was performed through the following determinations: pH, acidity (total, fixed, and volatile), total reducible sugars, soluble solid content, of ethanol and cellular concentration. From this fermentative process, 15 liters of ferment were obtained and it was centrifuged and distilled in a 20 L. copper distillery, being divided into fractions (head – 10%, heart – 80% and tail – 10%). The distilled product had a whitened aspect (clouded) and another distillation was necessary (bi-distillation). The product obtained was diluted and reintroduced to the distillery. The bi-distillation process didn't have a different result from the original distillation, so a tri-distillation was performed following the same process as the bi-distillation, and this produced limpid white-rum. In the physical-chemical analyses performed, both for the distilled white-rum and for the tri-distilled rum, a high proportion of ethyl carbamate and superior alcohols were observed, however the other secondary components (total esters, total aldehydes, furfural, methyl alcohol, acrolein, sec-butyl and n-butyl alcohols, cadmium, lead, and copper) are below the standards required by the Brazilian Legislation. The results obtained in the present paper show that the use of cheese whey is visibly promising for the production of white-rum. A more detailed study is necessary to minimize

the undesirable components such as ethyl carbamate and the sum of the concentration of superior alcohols.

Key words: cheese whey, protein extraction alcoholic fermentation, white- rum.

1. INTRODUÇÃO

O soro de queijo, tecnicamente intitulado “lactosoro”, é um subproduto resultante da fabricação de queijo ou da extração da caseína e contém, aproximadamente, metade dos sólidos presentes no leite, incluindo proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e alguma gordura. As proteínas do lactosoro possuem um elevado valor nutricional, devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais e apresentam conformações globulares compactas que lhes confere propriedades funcionais próprias (BEHMER, 1991).

Na produção do queijo, para cada 1 kg são necessários 10 L de leite, no caso 9 L de soro são extraídos nesse processo. A composição química do soro de queijo apresenta em média de 6,9% de sólidos totais, sendo 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,1% de ácido láctico (resultante da fermentação da lactose) (SANTOS & FERREIRA, 2001; RICHARDS, 2002).

O reaproveitamento do soro de queijo é alternativa para minimizar os problemas causados pela inadequada disposição deste soro, tornando-se matéria-prima bastante interessante na fabricação de inúmeros produtos, entre elas a aguardente.

O termo aguardente é uma denominação comum a todas as bebidas em cujo processo de obtenção estejam incluídas uma etapa de fermentação alcoólica e outra de destilação do fermentado. São bebidas fortes, de fácil conservação, de uso geral e universal, com teores alcoólicos variando de 38 a 54 °GL. Comercialmente, é comum a graduação de 41 °GL. Os gostos e aromas são diversos assim como as matérias-primas de que são obtidas mas o efeito de seu uso é o mesmo (CARDOSO, 2001). Sua história no Brasil remonta aos primórdios do século XV, quando os portugueses que aqui se estabeleceram implantaram os primeiros núcleos de povoamento e trouxeram a nossa matéria-prima, a cana-de-açúcar, objetivando a produção de açúcar. A origem da cachaça está na garapa, um subproduto da produção de açúcar, que se obtém a partir da espuma que se forma na caldeira em que se purifica o caldo de cana que era colocada ao relento, em cochos de madeira, para alimentar os animais. Esta garapa fermentada tornou-se conhecida por cagaça e passou a ser fornecida aos escravos para que pudessem suportar melhor a pesada carga de trabalho nos canaviais, porém tiveram a idéia de destilar a cagaça nascendo, assim, à cachaça ou "vinho", da cana-de-açúcar, cujos registros apontam a descoberta, feita por acaso entre 1532 e 1548, na Capitania de São Vicente (NOVAES, 2002).

As primeiras destilarias de cachaça surgiram nos séculos XVI e XVII com o nome de "casas de cozer méis", que se multiplicaram rapidamente pela facilidade de já existirem

engenhos para produção de açúcar e rapadura. Por volta de 1819, a aguardente no Brasil já era considerada um dos principais produtos da economia brasileira e dos que mais contribuíam com impostos, beneficiando principalmente Portugal, melhorando as técnicas de produção. A cachaça era exaltada por todos como uma ótima bebida e consumida até em banquetes palacianos; tornou-se, assim, a bebida dos brasileiros que, por amor à Pátria, recusavam o vinho, especialmente os procedentes de Portugal, e faziam questão de brindar com cachaça (CARDOSO, 2001).

Atualmente, várias destilarias produzem, no País, cachaças de excelente qualidade; ressalta-se que, quase toda a produção é feita em destilarias independentes dos antigos engenhos e das atuais usinas de fabrico de açúcar, além dos incontáveis alambiques de pequeno porte, espalhados em todo o território. O Brasil é o maior consumidor, cujos grandes produtores visam sobretudo ao mercado nacional, ou seja, dos 1,3 bilhão de litros produzidos anualmente, só 20 milhões são exportados. A produção artesanal se dá em alambiques de cobre enquanto a industrial (devido ao maior volume de produção) se utiliza de coluna de destilação, geralmente de aço inox (VENTURINI FILHO, 2005).

São centenas, talvez milhares, de marcas. Minas, Ceará e Pernambuco possuem, juntos, mais de mil marcas, muitas com controle de qualidade e embalagens dignas dos melhores Whiskers. Tal empenho dos fabricantes conquistou o público feminino, abriu o comércio internacional e a cachaça interna ganhou o mundo, ocupando um dos primeiros lugares em termos de produção e consumo de bebidas destiladas (RIBEIRO, 1997).

Na fabricação de aguardente, a Paraíba ocupa lugar privilegiado, com crescimento contínuo; trata-se de não apenas produtor mas também um mercado consumidor buscando sempre alternativas para a produção e matéria-prima adequada fazendo com que vários estudos sejam realizados nesta área; contudo o soro de queijo, que até então era desperdiçado, poderá ser reutilizado extraindo-se a proteína, fermentando o líquido restante e se destilando para fabricação da bebida autenticamente brasileira a aguardente.

Ante o exposto se busca, com esta pesquisa, estudar técnicas de aproveitamento do soro de coagulação enzimática que, desproteinizado, ainda é rico em carga orgânica, sais minerais, açúcares e contém traços de proteínas e gordura; sua proteína foi retirada podendo ser secada e destinada para estudos posteriores e o líquido resultante foi utilizado como meio para processo fermentativo visando à produção de aguardente. Na fermentação alcoólica se empregou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* adicionando-se, porém, sacarose ao soro, como fonte de carbono, uma vez que a levedura não apresenta o sistema lactase permease, bem como a β -galactosidase, enzima capaz de hidrolisar a lactose à galactose e glicose, tornando-a incapaz de fermentar a lactose diretamente para etanol, caso em que o soro representa, essencialmente, fonte de sais minerais e vitaminas necessárias no

processo fermentativo os quais não só contribuem para a melhoria do meio ambiente (pelo tratamento do resíduo soro) mas insere valor agregado e, conseqüentemente, ganho às indústrias de queijo.

1.1 – Objetivos

1.1.1 – Objetivo geral

Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática para fermentação e produção de aguardente.

1.1.2 – Objetivos específicos

- Caracterizar, físico-quimicamente, o soro de queijo de coalho produzido por uma indústria de laticínios localizada no Cariri Paraibano.
- Desproteínização do soro de queijo pelo método ácido térmico.
- Fermentação do soro de queijo desproteínizado utilizando-se o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae*.
- Destilação do fermentado em alambique de cobre.
- Estudar cineticamente a produção da aguardente tridestilada.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Queijo

O queijo é um dos alimentos mais antigos preparados que a história da humanidade registra. Em épocas pré-históricas, muito antes que o homem soubesse ler ou escrever, um legendário mercador, viajante da Arábia, atravessando uma agreste secção montanhosa da Ásia; depois de uma áspera subida sob sol causticante, já cansado, fez uma pausa para restaurar as forças e se alimentar. Tinha trazido, como alimento, tâmaras secas e, dentro de um cantil feito de estômago seco de carneiro, certa quantidade de leite de cabra, mas quando ele levou aos lábios o cantil para sorver o leite, somente um líquido fino e aquoso escorreu de seu interior; curioso, o lendário viajante cortou o cantil e viu, para sua surpresa, que o leite tinha se transformado em uma coalhada branca, não muito desagradável ao paladar de um homem faminto. O coalho existente no estômago parcialmente seco do carneiro, havia coagulado o leite e o resultado desta operação química foi o queijo (ALBUQUERQUE, 2006).

Queijo é “um produto de maturação da coalhada que se obtém pela coagulação enzimática ou ácida do leite integral, parcialmente ou totalmente desnatado, com ou sem adição de corante ou sal, suficientemente libertado do soro” definição segundo o 1º Congresso de Lacticínios de Genebra, em 1917 (ABREU, 2005).

Conforme GRANDI (1983) a fabricação de queijo é o método de transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade. Neste processo não há conversão de cem por cento da matéria-prima leite, no produto queijo. Seu rendimento pode variar entre 8,5 e 20% em função da consistência do queijo (DUMAIS *et al*, 1991) produzindo, assim, além do queijo, um derivado denominado soro de leite. Em termos de volume e em função das técnicas utilizadas na produção, pode-se produzir entre nove a doze litros de soro, com média de dez litros para cada quilo de queijo produzido (SOTTIEZ, 1985; RICHARDS, 1997).

2.1.1 – Componentes do queijo

Os principais componentes do queijo são: água, gordura, proteínas, lactose, ácido láctico, cloretos de sódio e sais diversos (resíduo mineral fixo) presentes em diferentes proporções e com finalidades específicas. A variação na composição do queijo se deve a dois fatores: se a quantidade de água for reduzida haverá um aumento nos teores dos outros componentes e, se ocorrerem modificações do processo na estrutura dos componentes, transformando-os como no caso da lactose e das proteínas que se vão modificando

gradativamente com o decorrer da maturação, a lactose será transformada em ácido lático e as proteínas em outros componentes nitrogenados (ABREU, 2005).

De acordo com ABREU (2005) cada constituinte do queijo tem sua função específica e segue os principais constituintes e suas atividades essenciais.

Água: Propicia condições para as reações químicas e biológicas características do queijo, proporciona umidade necessária para o crescimento de micro-organismos (bactérias) e exerce influência direta no “flavor” (sabor e aroma), na cor e na consistência do queijo.

Gordura: Têm influência no sabor, é responsável pela textura, contribui para a coloração amarela e é fonte de calorias e de betacaroteno.

Proteínas: No caso do queijo, o destaque maior é da caseína que aprisiona os glóbulos de gordura, logo após a precipitação, mantém uma pequena quantidade do soro na massa e dá consistência e firmeza ao queijo.

Lactose: Fornece substrato necessário à produção de ácido lático, que previne o crescimento de micro-organismos indesejáveis, liberta os sais de cálcio indispensáveis à coagulação do leite e ajuda na remoção da água da massa do queijo, por meio da remoção de cálcio do paracaseinato de cálcio; também favorece a produção de mecanismo de defesa (Streptococcus, Lactococcus) com a produção de antígenos, como a lisina e a lisozima.

Sais: Têm função importante no desenvolvimento de certos micro-organismos e importância nutricional para o consumidor.

2.1.2 - Classificação dos queijos

Os queijos podem ser classificados em função da porcentagem de gordura, do processo de coagulação, da natureza (leite de vaca, leite de ovelha, leite de cabra e leite de búfala), da extensão de maturação e consistência da massa.

2.1.2.1 – Porcentagem de gordura

Quanto à porcentagem de gordura, os queijos podem ser classificados como (ABREU, 2005):

Queijo gordo: Mais de 40% de gordura.

Queijo meio gordo: Entre 25 e 45% de gordura.

Queijo magro: Entre 15 e 25% de gordura.

Queijo desnatado: Menos de 15% de gordura.

2.1.2.2 – Processo de coagulação

Quanto ao processo de coagulação, os queijos podem ser classificados como (FLORENTINO, 2006):

Coagulação enzimática: Obtida empregando-se um complexo de enzimas denominadas coalho. As principais enzimas presentes neste complexo são a Renina (Quimosina) e a Pepsina; por exemplo: Queijo Prato e suas variedades, Queijo Minas e suas variedades, Queijo Edam, Queijo Gouda, Queijo Parmesão, Queijo Mussarela, Queijo de Coalho etc.

Coagulação ácido microbiana: Coagulação obtida pela formação de ácido láctico produzido pela fermentação bacteriana, sem adição de qualquer agente coagulante; por exemplo: Cottage-cheese, petit-suisse, queijo de manteiga etc.

Coagulação ácido térmico: Obtida pela ação do calor mais ácido que associados provocam a precipitação da proteína; por exemplo, ricota e suas variedades.

Fusão: Obtido pela ação de um sal fundente e calor; por exemplo: requeijão.

2.1.2.3 – Maturação

Quanto ao tempo de maturação, os queijos podem ser classificados como (ABREU, 2005):

Queijo fresco: Sem processo de maturação.

Queijo de maturação rápida: 20 a 40 dias de maturação.

Queijo de maturação média: 2 a 3 meses de maturação.

Queijo de maturação longa: Mais de 3 meses de maturação.

2.1.3 - Queijo “Tipo Coalho”

O queijo de coalho é um produto bastante consumido, principalmente no Nordeste brasileiro, produzido de forma artesanal por produtores rurais e pequenas empresas; ele é

obtido por coagulação enzimática utilizando-se, na maioria das vezes, leite cru, de massa crua prensado ou não, salgado e não maturado (LIMA *et al.*, 2000; NASSU *et al.*, 2002).

Devido às precárias condições de processamento apresenta uma composição físico-química bastante variada, de acordo com a matéria-prima utilizada não havendo nenhum tipo de padronização do leite nem das etapas de processamento levando a um produto final de baixa qualidade, fatores que variam em função de cada fabricante (LIMA, 2000; NASSU & BORGES, 2002).

Apesar da grande importância sócioeconômica do queijo de coalho para a região Nordeste, muitas vezes este produto é elaborado sem que os padrões higiênico-sanitários sejam respeitados. Inúmeras pesquisas realizadas nesta região evidenciam as más condições durante o processo produtivo do queijo de coalho (BENEVIDES & TELLES, 2002; MARQUES *et al.*, 2007). Desta forma, seu consumo pode oferecer riscos à saúde pública (FLORENTINO & MARTINS, 1999).

Por não contar com uma tecnologia apropriada que venha a contribuir para a otimização do processo de fabricação e beneficiamento da qualidade do produto, torna-se necessário que o processo tradicional de fabricação se adapte à evolução das técnicas queijeiras, através de modificações comumente já empregadas na tecnologia de outros queijos por, obviamente, promover sua descaracterização que, obtida tradicionalmente do leite cru, é possuidora de grande popularidade (BENEVIDES & TELLES, 2002).

2.2 - Soro de queijo

O soro do leite, tecnicamente intitulado “lactosoro”, é um subproduto resultante da fabricação de queijo ou da extração da caseína. Segundo ABREU (2005), constitui a porção ou fase aquosa do leite, resultante da dessoragem do coágulo e pode ser caracterizado como um líquido amarelo-esverdeado; dependendo do tipo de queijo, pode possuir sabor ligeiramente ácido ou doce. Cerca de 85 a 95% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos resultam em soro (10 litros de leite produzem aproximadamente 1 kg de queijo e 9 litros de soro), o qual contém aproximadamente metade dos sólidos do leite incluindo-se nesta proporção, o melhor do leite como proteínas solúveis, nitrogênio não protéico, sais minerais, vitaminas e, sobretudo, a lactose.

Nos países europeus e nos Estados Unidos, o soro é usado na alimentação humana, enquanto no Brasil ele ainda é subutilizado sendo, muitas vezes, destinado para alimentação animal. O pior destino que se lhe dá, é o descarte no meio ambiente. Esses

fatos são importantes quando se analisa que cerca de 1 bilhão de pessoas nos países em desenvolvimento vivem em situação de pobreza e, portanto, com deficiências nutricionais (SANTOS & FERREIRA, 2001).

São constantes os esforços para aproveitamento de resíduos agroindustriais em todo o mundo. Em particular, o soro do leite, pela abundância de produção, características nutricionais e elevada capacidade poluente, tem sido, há tempo, motivo de vários estudos (SILVA, 2000). Faz-se necessário, porém, o estudo de formas para conservá-lo e utilizá-lo, minimizando problemas, tanto de ordem ambiental como nutricional, em benefício da fauna, flora, animais domésticos e do próprio homem, utilizando-se o soro como alimento de alto valor nutricional.

Na grande maioria das vezes o soro é considerado rejeito indesejável da fabricação de queijos e não como importante fonte de vários componentes alimentícios e matéria-prima para elaboração de inúmeros produtos. Sob esta ótica não se dispensa um tratamento adequado ao soro sendo, na maioria das vezes, simplesmente estocado em locais sem maiores cuidados, até que se efetive o seu descarte (ABREU, 2005).

Quando o soro é considerado resíduo industrial e despejado junto com o resíduo das indústrias de laticínios, pode significar a duplicação do sistema de tratamento, pois possui DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) entre 25.000 e 80.000 mg/L. Por apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais de tratamento biológico é dificultada (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

No Brasil, os queijos tiveram consumo recorde nos últimos anos, que continua em ascensão (RICHARDS, 2002). Aliado a este aumento está associada a necessidade de se criar alternativas para a utilização do soro, principalmente pelos laticínios de pequeno e médio portes.

A produção de queijos no Brasil está em torno de 450 mil toneladas/ano correspondendo a 4.500.000 toneladas de soro de queijo. O soro possui, em sua composição média, 6,9% de sólidos totais, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,1% de ácido láctico resultante da fermentação da lactose. Desta forma, este volume equivale a aproximadamente 24.300 toneladas de sais minerais, 36.450 toneladas de proteínas, 12.150 toneladas de gordura e 202.500 toneladas de lactose demonstrando que o problema relacionado à poluição e ao desperdício de fontes de nutrientes é bem mais sério do que se imagina, significando que o descarte do soro sem um tratamento eficiente não é só um crime previsto por lei mas, também, é rejeitar um

alimento que possui alta qualidade nutricional (COSTA, 1995; SANTOS & FERREIRA, 2001; RICHARDS, 2002).

Através de vários processos o soro pode ser secado e utilizado como alimento ou aditivo alimentar ou, ainda, ser convertido em produtos químicos, combustíveis e outros produtos através da fermentação. Um dos maiores obstáculos da utilização do soro é a grande quantidade de lactose presente, a qual contribui para sua baixa solubilidade, baixo poder adoçante e sua pobre digestibilidade quando utilizado como alimento. A lactose também é pouco fermentável quando comparada com outros açúcares (Yang & Okos citado por CARMINATTI, 2001).

2.3 – Lactose

A lactose pertence à série dos dissacarídeos, sendo constituída por uma molécula de galactose e outra de glicose, unidas entre si por uma ligação glicosídica β -1,4, somente hidrolisada por β -galactosidase (lactase) (ABREU, 2005).

Este açúcar é encontrado no leite de todos os mamíferos, em diferentes teores além de responsável pelo sabor levemente adocicado (BEHMER, 1991).

Uma das desvantagens da ingestão de lactose é que não é facilmente digerida por uma parte da população humana. No intestino humano, a lactose é, em geral, hidrolisada pela enzima lactase, porém esta enzima não está presente em todas as pessoas, de modo que a ingestão de lactose pode levar à sua fermentação no intestino humano, gerando distensões, desconfortos e, em alguns casos, diarreia (CARMINATTI, 2001).

Segundo CARMINATTI (2001), a obtenção da lactose a partir do soro é feita envolvendo tipicamente a remoção de proteínas (por coagulação ou ultrafiltração), a evaporação sob vácuo, a refrigeração seguida de mais evaporação, a indução à cristalização por sementeira, a centrifugação para remoção dos cristais e a secagem até pó em secador de leite fluidizado. Em geral, aproximadamente 50% da lactose são recuperados, enquanto o líquido resultante pode ser vendido como soro em pó deslactosado.

Alguns problemas são encontrados quando se utiliza o soro como substrato para a fermentação alcoólica como, por exemplo, o número limitado de micro-organismos capazes de metabolizar diretamente a lactose com produção de etanol bem como o fato desses micro-organismos serem inibidos por concentrações moderadas do substrato (glicose) e do produto (etanol).

2.4 - Proteínas do soro de queijo

As proteínas do soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, tais como: ovos, leite, carne bovina e soja. O Índice de Eficiência de Proteínas (IEP) do soro é de 3,2, o IEP se baseia em uma escala que varia de 0 a 3,5 e permite avaliar a qualidade das proteínas, ou seja, quanto mais elevado o valor IEP melhor a qualidade da proteína. Desta forma, o IEP das proteínas do soro permite considerá-los excelentes do ponto de vista nutricional (SHAHID *et al.*, 1999). Os aminoácidos essenciais respondem por aproximadamente 60% do teor protéico total do soro, contendo níveis extraordinariamente elevados de leucina e lisina além de constituírem boa fonte de aminoácidos contendo enxofre, tais como cisteína e metionina (BURRINGTON, 2000).

Quase todos os aminoácidos presentes no soro tipo doce superam as doses diárias mínimas de nutrientes recomendados pela organização mundial de saúde (OMS) e pela Food Agricultural Organization (FAO) tanto para crianças como para adultos (MING, 2000).

Como ingredientes em alimentos funcionais, o uso de proteínas do soro está aumentando, tal como ocorre também com a capacidade tecnológica da indústria para produzir concentrados de, proteínas de soro, isolados de proteínas séricas totais; até agora, de acordo com USDEC (2002), esses produtos vêm sendo comercializados como ingredientes, com, funções tecnológicas ou características nutritivas gerais. As qualidades nutritivas do soro são conhecidas há bastante tempo e consideradas, hoje, um dos componentes alimentícios mais adequados as dietas de culturistas de atletas que buscam aumentar a massa muscular.

Ainda pela USDEC (2002), estudos sobre os efeitos fisiológicos específicos das proteínas do soro, está sendo realizados em seu conjunto, ou de proteínas individuais, para sua utilização como produtos funcionais, na nutrição humana.

Seus benefícios para a saúde fazem das proteínas do soro um dos produtos mais importantes no crescente mercado de ingredientes alimentares. Uma das razões para sua crescente participação neste mercado é a excepcional capacidade de servir como veículo para cálcio, sendo que a interação proteína-mineral potencializa a biodisponibilidade não somente do cálcio mas, também, do fósforo; além disso, a combinação cálcio-proteína aumenta a solubilidade do cálcio facilitando a manutenção deste mineral em solução. Outros fatores significativos para a utilização das proteínas do soro se referem às suas propriedades funcionais, como: emulsificação, alta solubilidade, gelificação, formação de espumas, capacidade de reter água e viscosidade. Proteínas do soro são, na sua forma

original, estruturas globulares de cadeia, muito específicas quanto à sua solubilidade em uma faixa de pH de 3,5 - 5,5 e também estáveis em processamento em alta temperatura. A desnaturação e pequena perda de solubilidade ocorrem quando as proteínas são submetidas a temperatura superiores a 60°C e uma solução com valores de pH de 4,6 – 6,0 (MING, 2000). Assim, a extração/recuperação das proteínas do soro é alternativa tanto para minimizar os problemas causados pela inadequada disposição do soro como para se obter um aglomerado protéico que represente um alimento de baixo custo. O aproveitamento deste aglomerado protéico tem significativa aplicabilidade, sobretudo nas fazendas e queijeiras do Nordeste brasileiro, como alimentação alternativa na sua utilização na substituição parcial ou total das proteínas da carne e dos derivados da soja, como ingredientes para substituir alimentos de alto valor calórico, como maionese, margarina e molhos em geral e, ainda, em sobremesas, pães, bolos, biscoitos, sorvetes, além da ricota e seus derivados (FLORENTINO, 2006).

2.5 – Separação das proteínas do soro

Existem vários métodos de separação das proteínas do soro; atualmente, a obtenção dessas proteínas se realiza basicamente, por tratamento térmico, separação por membranas e por precipitação.

A ultrafiltração, a osmose inversa e a eletrólise têm sido cada vez mais utilizadas na indústria alimentícia de todo o mundo visando à obtenção de proteínas *in natura*; entretanto, esses processos são caros devido à alta tecnologia de suas membranas e às pressões altíssimas utilizadas em sua operações (RICHARDS, 2002).

Agentes floculantes, como polifosfato sódico, hexametáfosfatosódico, diversos sais férricos e vários polieletrólitos, são eficientes em termos de precipitação porém impróprios para a indústria alimentícia.

O tratamento térmico é um procedimento simples e bastante utilizado e consiste, basicamente, na combinação do calor e ajuste de pH até o ponto isoelétrico das proteínas, através de um ácido orgânico (SINGH, 2004).

2.5.1 – Precipitação das proteínas por acidificação do soro aquecido

A identificação de alternativas para um aproveitamento adequado do soro de leite é de fundamental importância em função de sua qualidade nutricional, do volume e do poder poluente. Dentre as alternativas podem ser citados o uso do soro *in natura* para alimentação animal, fabricação de ricota, fabricação de bebida láctea, concentração, produção de soro em pó, separação das proteínas e lactose com posterior secagem, as quais

constituem formas de valorização deste derivado láctico contribuindo, ao mesmo tempo, para a melhoria do meio ambiente proporcionando ganho às indústrias (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

A coagulação do soro pode ser realizada por acidificação direta com adição de um ácido orgânico ao soro aquecido. O fenômeno que ocorre na coagulação ácida é diferente daquele que se dá na coagulação enzimática. Sabe-se que as proteínas têm múltiplas cargas situadas ao longo da cadeia protéica. Assim, quando há excesso de um único tipo de carga a proteína apresenta uma estrutura aberta devido, em parte, à repulsão existente entre os sítios de uma mesma carga (LEMAN & KINSELLA, 1989). Por outro lado, quando o pH da solução envolvida se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas (4,6), as cargas elétricas das partículas coloidais se unem formando o coágulo ou gel. Isto se deve à ação conjunta do calor e ácido aumentando a taxa de colisão entre as partículas desidratando parcialmente as proteínas. Deste modo, a diminuição do pH é suficiente para acelerar a precipitação com formação de flocos ou grãos (RAPACCI & VAN DENDER, 1997).

A coagulação completa das proteínas do soro aquecido depende das forças ativas de coesão, adesão e hidratação, aplicadas às partículas protéicas, o que é bastante influenciado pela quantidade de ácido adicionado. Por outro lado, com a elevação da temperatura a carga elétrica líquida das proteínas é reduzida e o sistema atinge o equilíbrio final quando as proteínas se precipitam. Além disso, quando a temperatura é alta ocorre um aumento na taxa de colisão das partículas, o que facilita a precipitação do coágulo (SINGH, 2004).

Pela ação do calor são rompidas as ligações que asseguram as estruturas secundárias e terciárias das moléculas, sendo que o rearranjo das moléculas desnaturadas provoca a insolubilidade das proteínas. Deste modo, o lactossoro diminui o teor protéico na razão direta do grau de desnaturação térmica; entretanto, a desnaturação pode não comprometer o valor nutritivo da proteína láctea e hoje se acredita que a proteína desnaturada seja melhor digerida, visto a maior exposição das cadeias peptídicas à ação das enzimas proteolíticas (SILVA & ALMEIDA, 2004).

2.6 – Fermentação alcoólica

A possibilidade de oxidação do etanol é a base da utilização da fermentação alcoólica como combustível no Brasil. Na produção industrial do álcool carburante é utilizada a fermentação de melão de cana-de-açúcar por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). A fermentação alcoólica de extratos de malte e de macerados de uvas e de vários outros frutos tem sido utilizada há muitos séculos, para o preparo de diferentes bebidas alcoólicas (BARBOSA & TORRES, 1998).

As bebidas alcoólicas são tão antigas quanto a humanidade e numerosas como suas etnias. Fenícios, Assírios, Babilônios, Hebreus, Egípcios, Chineses, Germanos, Gregos e Romanos as mencionaram e cada povo praticamente tem as suas a partir das fontes naturais próprias de açúcares e amiláceos, como frutas, cana, milho, trigo, arroz, batata, centeio, aveia, cevada e mesmo raízes e folhas. Atualmente se entende por fermentação alcoólica, um conjunto de reações bioquímicas provocadas por micro-organismos chamados leveduras, normalmente em cultura pura com levedo selecionado, que atacam fundamentalmente os açúcares transformando-os em álcool etílico e gás carbônico, além de outros produtos secundários como glicerol, ácido succínico e outros ácidos orgânicos, com liberação de energia (AQUARONE, 1983).

Há uma importância primordial com a qualidade e a origem da matéria-prima, com o micro-organismo a ser utilizado (conforme a bebida, muda as espécies e até o gênero), com o preparo do mosto e, em sua grande maioria, também com armazenamento do produto final; todos esses itens são fundamentais para confirmação do produto.

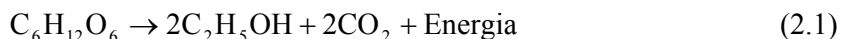
2.6.1 – Agentes da fermentação alcoólica

Alguns produtos comercialmente valiosos resultam da quebra de substratos pelos micro-organismos utilizados em processos de degradação industrial capazes de converter uma grande proporção do substrato para o produto desejado; por outro lado, devem ter características estáveis, crescer rápida e vigorosamente e não serem patogênicos (PELCZAR JR *et al.*, 1996).

As leveduras, como os bolores, são fungos mas deles se diferenciam por se apresentarem, usual e predominantemente, sob a forma unicelular. Uma levedura típica consta de células ovais que se multiplicam assexuadamente, em geral por brotamento ou gemulação. Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente que os bolores; também são mais eficientes na realização de alterações químicas em virtude da sua maior relação área/volume. A maioria das leveduras não vive no solo mas se adaptou a ambientes com alto teor de açúcares, tal como néctar das flores e a superfície de frutas. As leveduras fermentativas vêm sendo exploradas pelo homem há milhares de anos, na produção de cerveja e do vinho e na fermentação do pão embora somente no século XIX tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por esses processos (PELCZAR JR *et al.*, 1996).

Segundo FLORENTINO (2006), a fermentação alcoólica ocorre devido ao fato das células de levedo produzirem a energia que lhes é necessária para sobreviver, através de dois fenômenos de degradação da matéria orgânica: da respiração, que necessita do oxigênio do ar ou da fermentação que ocorre na ausência de oxigênio do ar. A composição

do açúcar foi determinada por Gay-Lussac e é ainda de sua autoria a Equação (2.1) que descreve a fermentação alcoólica:



ou seja, 180g de glicose resultam em 92g de álcool etílico e 88g de CO₂. A proporção de etanol contida no vinho é medida em grau alcoólico, segundo o princípio de Gay-Lussac.

AQUARONE *et al.* (2001), a levedura *Saccharomyces* é aeróbia facultativo, tendo a habilidade de ajustar-se metabolicamente tanto em condições de aerobiose como anaerobiose, dependendo exclusivamente das condições ambientais em que a levedura se encontra, isto é, os produtos finais da metabolização do açúcar. No processo fermentativo enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, sendo seu produto de excreção sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose; já em condições de aerobiose podem ser oxidados metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa.

A levedura utilizada no processo deve apresentar determinadas características que garantem o rendimento fermentativo. A massa de células para se iniciar a fermentação é denominada *pé-de-cuba*, *pé-de-fermentação*, *levedo alcoólico* ou *fermento* e deverá estar ativa e em quantidade adequada para que o processo ocorra de modo satisfatório (VENTURINI FILHO, 2005).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada na fermentação alcoólica não apresentando, porém, o sistema lactase permease nem a enzima β-galactosidade que é capaz de hidrolisar a lactose em galactose e glicose (FLORENTINO, 2006).

2.6.2 – Tipos de fermento

Conforme VENTURINI FILHO (2005) denomina-se fermento a suspensão de células de levedura suficientemente concentrada, de modo a garantir a fermentação de um volume de mosto em condições econômicas.

Os fermentos mais empregados na prática são (VENTURINI FILHO, 2005):

Fermento natural ou selvagem: Constituído de células de levedura que já estão naturalmente adaptadas ao ambiente. Vivem na superfície dos colmos da cana-de-açúcar. Pelo fato de não terem sofrido alterações genéticas programadas ou melhoramentos, são chamadas leveduras naturais, nativas ou selvagens e , apresentam, comumente, pequena tolerância ao álcool, pouco superando outros micro-organismos contaminantes.

Fermento prensado: Formado por uma massa sólida, contendo um aglomerado de células no estado sólido da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que é fermento alcoólico por excelência. Este fermento pode ser conservado em geladeira.

Fermento misto: Este tipo de fermento consiste na associação do fermento natural ou selvagem e do prensado; neste caso se empregam de 10 a 20 g de fermento prensado por litro de mosto.

Fermento seco (granulado): Este fermento dispensa refrigeração, apresenta uma concentração de células três vezes maior que o fermento prensado, razão pela qual requer menor quantidade de fermento possibilitando início mais rápido da fermentação.

2.7 – Bebidas alcoólicas

Um dos resultados da fermentação alcoólica é a bebida que, segundo AQUARONE *et al.* (1983), é definida, no Brasil, como um produto refrescante, aperitivo ou estimulante destinado à ingestão humana no estado líquido, sem finalidade medicamentosa e contendo mais de meio grau Gay-Lussac de álcool etílico. As bebidas alcoólicas são geralmente classificadas em dois grandes grupos: fermentadas e destiladas, todas obtidas por fermentação sendo as destiladas aquelas em que o mosto fermentado sofre algum processo de destilação.

2.7.1 – Bebidas destiladas

Bebidas destiladas são as obtidas por destilação de vinhos de frutas, de fermentados de grãos, tubérculos e raízes, de diversas substâncias açucaradas, como caldo de cana-de-açúcar e de subprodutos da indústria de açúcar, de agave, de mel (AQUARONE *et al.*, 1983).

Cada substância líquida se compõe de uma rede tridimensional de bilhões de moléculas mantidas próximas por uma energia específica de ligação. Quando o líquido é aquecido a rede absorve energia térmica, modificando o equilíbrio das forças de ligação entre as moléculas, cujo resultado é que uma parcela se desprende e passa ao estado de vapor incorporando-se à atmosfera. No caso da água, ao atingir seu ponto de ebulição a energia absorvida é suficiente para romper a totalidade das ligações entre as moléculas. Se a temperatura for mantida, a água líquida acabará passando para o estado de vapor (MAIA & CAMPELO, 2005).

Segundo MAIA & CAMPELO (2005), quando se aquece uma mistura de substâncias líquidas a proporção entre as moléculas de cada substância que passa ao estado de vapor é diferente da pré-existente no estado líquido. No caso de uma mistura de etanol e água, principais componentes líquidos do vinho da cana e de mostos fermentados, os vapores são mais ricos em etanol, cujo ponto de ebulição é 78,5°C (em pressão atmosférica), refletindo uma energia de ligação menor que a da água. Este é o princípio do processo de destilação.

De acordo com o Decreto 4.851, de 2 de outubro de 2003, bebidas destiladas são o conhaque, o pisco, a grapa ou bagaceira, o arac, a aguardente de fruta, o uísque, o rum, a tequila, a aguardente de melação ou cachaça e a aguardente de cana ou caninha. A aguardente terá a denominação da matéria-prima de sua origem (BRASIL, 2003).

2.7.2 – Aguardentes

Segundo AQUARONE *et al.* (1983), as aguardentes, chamadas *spirits* em inglês, *spiritueux* ou de *eaux-de-vie* em francês, *acquaviti* em italiano e de *schnaps* em alemão – são bebidas alcoólicas obtidas por destilação de um líquido contendo álcool etílico. O teor do álcool do líquido original varia mas, quase, sempre todo ele é separado pela destilação, operação, em que, inevitavelmente, são destiladas algumas substâncias que acompanham o álcool, e são chamadas impurezas; elas contribuem para conferir, aos diferentes destilados, suas características de aroma e sabor, que são modificadas ou intensificadas pela maturação ou envelhecimento em tonéis de madeira, sob condições adequadas. Aguardentes são bebidas fortes, de fácil conservação, de época e região de origem duvidosas mas de uso geral e universal. Os gostos e os aromas são diversos, as matérias-primas são inúmeras, porém o efeito do uso é o mesmo.

A aguardente de cana-de-açúcar (cachaça) é a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, com uma produção anual estimada em cerca de 1.500.000.000 litros, ou seja, cerca de 10 litros per capita. São aproximadamente 70.000.000 de doses consumidas diariamente entre as 18 e 21 horas. É produzida de forma pulverizada por centenas e centenas de pequenos fabricantes que comercializam regionalmente seus produtos (CRISPIM, 2000).

Segundo BRASIL (1997), a aguardente tem que seguir os padrões contidos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Padrões para a produção de aguardente

Substância	Norma (mg/100 mL de álcool anidro)
Acetaldeído	Máximo 30
Acetato de etila	Máximo 200
Metanol	**Máximo 700
N propanol*	
Iso butanol*	
N butanol*	***Máximo 3
Iso amílico*	
Álcoois superiores (*)	***Máximo 360
Acidez volátil em ácido acético	Máximo 150
% etanol (v/v)	38 – 54 °GL
Soma dos**** componentes secundários	Mínimo 200 Máximo 650

Fonte: Brasil (1997)

**** DECRETO nº 2.314, DE 4 DE SETEMBRO DE 1997.** No destilado alcoólico simples de origem agrícola o teor de furfural não deverá ser superior a cinco miligramas; o álcool metílico não deverá ser superior a duzentos miligramas, com exceção do proveniente de mosto com polpa de frutas fermentadas ou bagaço de uva, cujo limite máximo será setecentos miligramas, todos considerados por cem mililitros do destilado, expressos em álcool anidro.

***** Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005** do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

****** Art 85.** Os coeficientes de congêneres dos destilados, bebidas destiladas e retificadas, não previstos neste Regulamento, quando necessário, serão estabelecidos em ato administrativo complementar.

Parágrafo único. **DECRETO nº 2.314, DE 4 DE SETEMBRO DE 1997.** Art. 85. **Parágrafo único.** Entende-se como coeficiente de congêneres ou componentes voláteis não-álcool, ou substâncias voláteis não-álcool, ou componentes secundários não-álcool ou, ainda, impurezas voláteis não-álcool, a soma de acidez volátil expressa em ácido acético, aldeídos, expresso em acetaldeído, ésteres, expresso em acetato de etila, álcoois superiores,

expressos pelo somatório dos mesmos, e furfural, todos expressos em miligramas por cem mililitros de álcool anidro.

A produção de cachaça, tal como de aguardente, na Paraíba, tem crescido continuamente visto que, no ano de 2007, o aumento foi em torno de 20% (CAVALCANTI, 2007), evidenciando que o Estado, além de ser um consumidor deste produto, é também um produtor em ascensão, havendo, com isto, a necessidade do conhecimento dos componentes presentes na aguardente, tais como:

Álcoois superiores: São compostos formados pelo metabolismo de aminoácidos presentes no meio fermentado, pelas leveduras (CLETO & MUTTON, 2004).

Aldeídos: São co-produtos normais da fermentação alcoólica, cuja formação é resultante da ação de leveduras durante os estágios preliminares do processo de fermentação tendendo a desaparecer nas etapas finais, desde que o mosto sofra uma pequena aeração (Yokoya, F. citado por BARCELOS *et al.*, 2007).

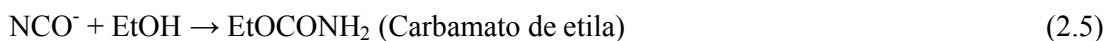
Ésteres: São compostos importantes para formação do “flavour” da bebida e é formado principalmente durante o processo de maturação e envelhecimento (BARCELOS *et al.*, 2007).

Furfural: É um aldeído formada pela desidratação das pentoses e hexoses; deve ser minimizado pois confere, à aguardente, aroma penetrante e enjoativo (MAIA & CAMPELO, 2006).

Cobre: Este composto é proveniente da dissolução do carbonato básico de cobre que se forma no interior do alambique e, principalmente, nas partes internas da serpentina, sendo importante em pequenas quantidades pois retira os odores desagradáveis, porém em elevadas concentrações é indesejável por ser prejudicial à saúde humana (ISIQUE *et al.*, 1998; BARCELOS *et al.*, 2006).

Carbamato de etila: A formação do carbamato de etila se dá através da redução do íon Cu(II) a íon Cu(I) e com a formação de cianogênio seguido de seu desproporcionamento, ocorre a formação de íons cianato, como mostrado nas Equações 2.2, 2.3 e 2.4; logo, os íons cianato por reação com etanol produzem o carbamato de etila, conforme a Equação 2.5 (Taki *et al.* citado por ANDRADE-SOBRINHO *et al.*, 2002)





2.8 – 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. Neste contexto se considera que desenvolver produtos e processos através de procedimentos de tentativa e erro, conforme registros do início do século passado foi, de fato, importante naquele momento; no entanto, a forte competitividade, a difusão da tecnologia, e a competência e a responsabilidade dos pesquisadores atuais, inviabilizam tais procedimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A falta de planejamento é muitas vezes, a causa do insucesso de uma investigação; porém raros são os pesquisadores que pensam em estatística antes de realizar seus experimentos. Em geral, eles costumam achar que em, uma análise dos seus dados, não importa como tenham sido obtidos e, eventualmente, levará sua pesquisa a bom termo (BARROS NETO *et al.*, 1996).

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

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura (BARROS NETO *et al.*, 1996).

2.9 – Estado da arte

2.9.1 – Soro de queijo

SILVA & HERNAN-GOMEZ (2000) secaram, em secador por aspersão, proteínas do soro fermentado pela *Kluyveromyces fragilis*, e avaliaram a qualidade protéica através de análise aminoacídica. Os resultados indicaram alto nível de lisina e baixos níveis de metionina e valina em comparação com as proteínas do ovo mencionadas pela FAO (Food Agricultural Organization). Verificou-se que a qualidade da proteína seca do soro fermentado apresentou-se inferior à caseína (proteína do leite).

CARMINATTI (2001) trabalhou com lactose presente no permeado do soro de leite, hidrolizando-a em um reator a membrana (PVDF-DMF) com alta porosidade, utilizando lactase *Kluyveromyces lactis* Marxilact L-5000. O grau de hidrólise foi determinando para diversas condições operacionais de temperatura (30, 35, 40, 45 e 50°C), pH (4, 5, 6 e 7) e concentração de enzima (400, 1250 e 2000mg.L⁻¹). Obtiveram-se conversões entre 90 e 100% para temperaturas entre 30 e 40°C, pH 6 e concentração de enzima de 1250mg.L⁻¹. A hidrólise da lactose do soro de leite foi comparada utilizando-se reator operando em batelada e reator a membrana, sendo as condições operacionais as mesmas (temperatura 40°C, pH 6 e concentração de enzima de 1250mg.L⁻¹). Constatou-se que o reator a membrana é mais eficiente, com conversão de 92% da lactose em glicose e galactose, contra 82% do reator operando em batelada.

GIROTO & PAWLOWSKY (2001) enfatizaram o reaproveitamento do soro de leite no aspecto nutricional, ambiental e econômico visto que no estado do Paraná os laticínios utilizavam 19,4% desse soro para a produção de bebidas lácteas, podendo ainda ser explorados 80,6%. Esses mesmos laticínios poderiam chegar a substituir, em média, 36,5% das importações brasileiras.

SIQUEIRA (2002) caracterizou quatro tipos de soro de queijo (prato, minas frescal, minas padronizado e mussarela) relatando que não foram observadas diferenças significativas entre os quatro tipos de soro de queijo, com valores de pH variando de 6,16 a 6,35, acidez titulável de 11,43 a 12,21°D, extrato seco total de 5,36 a 6,68g/100g, gordura de 0,65 a 0,80/100g, proteína de 1,24 a 1,48/100g, lactose de 2,61 a 2,99/100g e teor de umidade de 93,32 a 94,24g/100g.

CAPITANE *et al.* (2005) objetivando a recuperação e o fracionamento das proteínas do soro de queijo de fabricação industrial do tipo minas frescal por meio da técnica de coacervação e utilização do polissacarídeo carboximetilcelulose sódica (CMC) com concentrações de 0,1% a 0,9% CMC p/v obtiveram, ao utilizar os valores de pH 3, precipitação das proteínas totais (PT/CMC); de pH 4, precipitação da β -lactoglobulina (β -Lg/CMC) e de pH 3,2, precipitação de maior proporção de α -La/CMC), em que os coacervados foram separados por aplicação de força centrífuga e caracterizados em relação à composição centesimal e perfil eletroforético. Verificou-se o maior rendimento no fracionamento da β -lactoglobulina, com 86% de recuperação dessa classe de proteína do soro desnatado.

FLORENTINO (2006) investigou formas para o aproveitamento do soro resultante da fabricação de queijos por coagulação enzimática. As proteínas foram retiradas pelo método ácido térmico e pela coagulação/floculação com quitosana, sendo o primeiro método mais vantajoso; ela estudou, também, o processo de fermentação acética e

fermentação alcoólica utilizando as leveduras *Kluyveromyces lactis* ATCC 5698 e a *Saccharomyces cerevisiae* em que a primeira não obteve resultados, motivo pelo qual foi feita a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* com adição de sacarose, em 30 °C e agitação de 180 rpm durante 12 h, sendo acompanhada 48 h, apresentando um teor alcoólico de 7-8 °GL. Após o processo de fermentação alcoólica foi inoculada com *Acetobacter aceti* CCT 0190 para a fermentação acética a 30 °C. As condições que apresentaram maior potencial para a fermentação acética foram: aeração 1,0v.v.m.; agitação de 50rpm e 25% de inóculo, atingindo acidez volátil de 5,2g de ácido acético/100mL após 240 h de cultivo, apresentando um rendimento de 72%.

FLORÊNCIO *et al.* (2007a) demonstraram, caracterizando o soro de queijo tipo coalho de queijeiras artesanais da zona rural da cidade de Montadas, na Paraíba, o alto índice protéico e de lactose, lançado no meio ambiente. No seu estudo foram encontrados: valor de 1,7% de proteína, aproximadamente 50% das proteínas presentes no leite; para a lactose, valores de 4,13%, que correspondem a 0,47% do leite integral; pelo pH (6,59) foi considerado um soro doce; foram evidenciados ainda, alta concentração de sais minerais (0,55%), extrato seco total (6,71%) e gordura (0,3%); no entanto, o soro poderia ser aproveitado para várias formulações.

2.9.2 – Fermentação alcoólica

BORTOLINI *et al.* (2001) estudando o comportamento das fermentações alcoólicas e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*), sendo os mostos preparados em 6 tratamentos: suco de kiwi natural (T1); suco de kiwi e nutrientes (T2); suco de kiwi e sacarose até 18 °Brix (T3); suco de kiwi a 18 °Brix, e nutrientes (T4); suco de kiwi e sacarose até 22 °Brix (T5) e suco de kiwi a 22 °Brix e nutrientes (T6) ressaltam que a fermentação alcoólica ocorreu a 28 °C, com inóculo de 10⁶UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae*. Na fermentação acética se utilizaram apenas os tratamentos 1, 3 e 5, visto que a adição de nutrientes não influenciou a produção de etanol. Na fermentação acética, foram utilizados gerador vertical (PG) a temperatura ambiente e fermentador submerso (OS) a 25 °C, com agitação de 500rpm e fluxo de oxigênio de 0,05vvm, com volume de trabalho de 2 litros. Os rendimentos da fermentação alcoólica variaram entre 38,65 e 47,23%, com eficiências de 75,62 e 92,41% e produtividade entre 0,74 e 2,0 g/L.h. Os valores de pH foram maiores ao final da fermentação alcoólica nos mostos com menores concentrações de açúcares totais (T1 e T2). Na fermentação acética pelo PG, a composição dos mostos não aumentou a produtividade; por outro lado, pelo OS os mostos com concentrações de etanol superiores foram mais produtivos. Os vinagres obtidos pelo OS produziram, em 12 h, entre 1,00 e 1,78% (p/v) de ácido acético, com rendimentos variando entre 93,24 e 98,34% e produtividade entre 0,83 e 1,73g/L.h. A análise sensorial através do teste de

ordenação, indicou que os vinagres de kiwi obtidos pelo PG foram superiores, com índices de aceitabilidade acima de 70%.

CORAZZA *et al.* (2001) trabalhando com a preparação e caracterização do vinho de laranja utilizaram um fermentador caseiro e, como levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*, acompanhando todo o processo fermentativo, que durou 153 h, com temperatura variando de 27 a 32 °C. Obteve-se, ao término da fermentação, um vinho de 10,6 °GL, com pH de 3,2 e com um resíduo de 7,0 °Brix, avaliando ainda que o sabor e a qualidade da bebida fermentada de laranja são comparáveis aos do vinho de uva.

ANDRIETTA *et al.* (2003) visando determinar a influência da velocidade de alimentação de substrato em processos de produção de etanol em batelada alimentada, realizaram 3 ensaios em reator de bancada com diferentes tempos de enchimento (1, 2 e 3 horas) utilizando como substrato meio sintético à base de sacarose e extrato de levedura. O micro-organismo utilizado foi a cepa da levedura Y904. As concentrações de etanol e células no inóculo foram, respectivamente, de 30 e 85 g/L e o pH de 2,0. Amostras foram recolhidas em intervalos de uma hora durante o ensaio, e delas foram analisadas: sacarose, glicose, frutose e concentração de etanol por cromatografia líquida e células por método gravimétrico, em que os resultados indicaram que o rendimento em etanol é afetado pelo tempo de enchimento, diminuindo linearmente com o mesmo. A produtividade foi pouco afetada pela velocidade de enchimento obtendo-se valores de 9,02, 9,75 e 10,06 g/L nos 3 tempos de enchimento (1, 2 e 3 horas).

SILVA *et al.* (2003) trabalharam com a extração dos açúcares existentes nas vagens e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para a obtenção de aguardente utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo teve por finalidade servir de parâmetros para a produção de aguardente e verificaram que o melhor processo de extração dos açúcares das vagens de algaroba é quando elas são diluídas na proporção de 1:2 (1 kg de vagem/2 kg de água) e submetidas a uma pressão de 50 kgf/cm² com prensagem manual ou a 250 kgf/cm² com prensa automática. Constatou-se que no processo fermentativo do caldo da algaroba o melhor teor de sólidos solúveis médio se encontra entre 18 e 20 °Brix restando ainda um valor residual de açúcares não fermentáveis de 2 °Brix.

SOUZA *et al.* (2006) estudaram a fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando alguns parâmetros, visando à otimização na produção de etanol, em relação à temperatura, pH, agitação, nutrientes, concentração de leveduras, concentração de enzima (lactase) e a concentração de substrato soro. A temperatura de 30 °C e pH de 4,5, foi usada em ensaios conduzidos com 60g de soro, 0,4g de enzima e 30g de inoculo em 1 L de meio e obtiveram uma

produtividade de etanol em torno de 2,39g/L.h e rendimento de 90,01%, quando então, para 90g de soro, 0,4g de enzima e 70g de inóculo, a melhor produtividade atingiu 3,66g/L.h e o rendimento 93,9% sendo o menor tempo de fermentação 8 horas; desconsiderou-se a agitação uma vez, neste caso, não influenciou nos resultados.

TORRES NETO *et al.* (2006) obtiveram, no seu estudo cinético e de caracterização do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale L.*) um produto fermentado suave por possuir teores de açúcares residuais acima de 20g/L e teor de álcool etílico de 11,5% (v/v), sendo sua acidez total final do fermentado de 7,2 (g/L), estando dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, que é de 3,3 a 7,8g/L.

2.9.3 – Aguardente

ANDRADE-SOBRINHO *et al.* (2002) aplicaram a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, na determinação de carbamato de etila em bebidas fermento-destiladas, em razão de que 188 amostras foram analisadas (126 cachaças, 37 tiquira, 6 grapas e 19 Wísques) observando-se que, pelo monitoramento do íon m/z 62, é possível identificar e quantificar o carbamato de etila sem problemas de co-eluições com outros compostos presentes na cachaça. Nas 126 amostras analisadas de cachaça apenas 21% obtiveram teores de carbamato de etila $\leq 0,0150 \text{ mg.L}^{-1}$.

COUTINHO (2003) estudando os aspectos da evolução do mercado da cachaça observou que, através do Programa Brasileiro para o Desenvolvimento da Cachaça (PBDAC), o setor aguardenteiro vem concentrando esforços para promover a cachaça nos mercados nacional e internacional, evidenciando que o mercado de cachaça apresenta significativo crescimento, especialmente o internacional, no qual o volume de exportação, embora ainda pequeno, vem apresentando aumento médio de 10% ao ano.

PEREIRA *et al.* (2003) com o intuito de avaliar os compostos secundários de aguardentes provenientes de várias localidades do Estado de Minas Gerais, coletaram 45 amostras aleatoriamente e as conduziram ao Laboratório de Análise Físico-Química de Aguardente (LAFQA) da UFLA. Pelos resultados, verificaram-se diferenças altamente significativas entre as amostras analisadas para acidez volátil, ésteres, aldeídos e alcoóis superiores. De todas as amostras analisadas sete apresentaram excesso de alcoóis superiores, duas de aldeído e três de acidez volátil; portanto, 24,44% das aguardentes se encontraram fora dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (1997).

BARCELOS *et al.* (2006) analisaram o carbamato de etila e outros componentes em cachaças de diferentes regiões de Minas Gerais, coletaram 13 amostras de três

diferentes regiões do estado (Zona da Mata – ZM; Sul de Minas – SM e Vale do Jequitinhonha – JEQ) para quantificar alcoóis superiores, furfural, cobre e carbamato de etila. As regiões analisadas apresentaram diferença significativa quanto aos teores de álcool superiores, furfural, cobre e carbamato de etila. O teores de carbamato de etila (média de 645,18 µg/L) foram preocupantes para a região do Vale do Jequitinhonha já que o controle deste composto é imprescindível para comercialização do produto.

MOUCHREK FILHO *et al.* (2006) descrevem a produção e o processamento de aguardente obtida de abacaxi (*Ananás comosus L., Merrill*), por meio de processamento adaptado das metodologias já existentes e a investigação das propriedades organolépticas e físico-químicas para fins de controle de qualidade do produto obtido. Utilizou-se suco de abacaxi extraído mecanicamente, com correção do pH (4,5) e dos sólidos solúveis (16°Brix) e adição de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando a fermentação finalizou foi realizou-se a destilação obtendo-se uma aguardente de densidade 0,940 g/L, teor de álcool etílico de 49°GL, pH de 4,0, sólidos solúveis de 15°Brix; todos esses valores estão dentro dos padrões de identidade e qualidade para bebidas alcoólicas fermento-destiladas estipulados pela Lei nº 5.823 de 14 de novembro de 1972 e Legislação Complementar do Ministério da Agricultura e Abastecimento.

BARCELOS *et al.* (2007) avaliaram os teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale de Jequitinhonha. Analisaram-se 52 amostras de cachaça produzidas artesanalmente das 3 regiões; apenas as mostras da região do Vale do Jequitinhonha apresentaram maior concentração de carbamato de etila; para os outros componentes secundários, grau alcoólico, alcoóis superiores, ésteres, metanol, furfural e cobre, as concentrações encontradas para a região da Zona da Mata apresentaram valores intermediárias entre o Sul de Minas e o Jequitinhonha, representando uma faixa de transição entre essas duas regiões.

DANTAS *et al.* (2007) avaliando a influência da velocidade de destilação na análise físico-química de aguardente de cana-de-açúcar, observaram que as três velocidades de destilação (0,70, 1,10 e 1,50 L.min⁻¹) analisadas na produção de aguardente não apresentaram diferenças significativas estatisticamente entre si, a nível de 95% de confiança, mas se observou também, que a soma dos componentes secundários nas aguardentes submetidas às três diferentes velocidades de destilação, indicaram níveis dentro do estabelecido pela legislação brasileira sobre a bebida.

VILELA *et al.* (2007) com o objetivo de determinar a composição físico-química de cachaças artesanais produzidas no sul do Estado de Minas Gerais e suas misturas, analisaram os teores de etanol, acidez volátil, aldeídos, cobre, ésteres, alcoóis superiores

totais e metanol, além dos alcoóis propanol-1, isobutanol e 3-metil-butanol-1. Os resultados mostraram o perfil peculiar desta bebida com teores satisfatórios de alcoóis superiores, ésteres e aldeídos. O teor de cobre apresentou-se preocupante já que algumas amostras excederam o limite de 5 mg.L⁻¹. A produção de misturas também foi estudada apresentando-se como alternativa viável para os produtores e para as cooperativas.

DANTAS *et al.* (2008) avaliaram 8 amostras, química e físico-quimicamente, de cachaças produzidas no estado da Paraíba verificando descumprimento dos padrões exigidos pela Legislação Brasileira; apenas uma amostra se encontrava dentro desses padrões, sendo o cobre o principal contaminante presente em excesso, estando também em concentrações elevadas o furfural e a acidez volátil.

FLORÊNCIO *et al.* (2008) trabalharam com a produção de aguardente a partir do caldo do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor (L.) Moench*) e concluíram que a fermentação foi realizada em batelada com 10% de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae*), em caldo de sorgo extraída, dos colmos limpos e dos colmos com folhas, com uma média de teor de sólidos solúveis de 12,1 – 11,6°Brix e teores de ART de 9,66 – 9,81%. Após o período de fermentação, 72 horas, obteve-se um fermentado com teor alcoólico de 5°GL (%v/v). A destilação do fermentado durou 3 horas e 38 minutos, realizadas as separações das frações: cabeça (38°GL), coração (43°GL) e cauda (8,2°GL).

ROCHA *et al.* (2008) avaliaram, físico-quimicamente, a aguardente do fruto da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* MILL), observando teor alcoólico de 46,2°GL (%v/v), dentro, portanto, dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, assim como todos os outros componentes secundários (acetaldeído, acetona, acetato de etila, metanol, N propanol, isobutanol, alcoóis superiores, acidez total em ácido acético, acidez volátil, cádmio, cobre, chumbo) e constataram, assim, uma produção viável da aguardente do fruto da palma forrageira de boa qualidade.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta o material e as metodologias aplicadas nas diversas etapas desenvolvidas no estudo.

3.1 – Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste estudo foi o soro resultante da produção de queijo “Tipo Coalho” fabricado em indústria de laticínio localizada na zona rural da cidade de Caturité, PB (Cooperativa Agropecuária do Cariri Ltda). Após ser coletado e refrigerado, o soro foi armazenado em recipientes plásticos e transportado para o Laboratório de Engenharia Bioquímica da Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

3.2 – Caracterização do soro

A caracterização do soro foi realizada em duas etapas: soro *in natura*, visando conhecer os componentes presentes no mesmo e depois da operação de extração das proteínas totais, através das seguintes determinações:

3.2.1 – Acidez

Determinada através do método Dornic, que se baseia na titulação do soro com a solução Dornic (N/9), empregando-se a fenolftaleína como indicador do ponto final da titulação. O resultado foi expresso em Graus Dornic (°D) que corresponde a 1 mL de solução de NaOH 0,1N consumido na titulação, equivalendo a 0,0090g de ácido láctico (BRASIL, 2006).

3.2.2 – Gordura

Determinada empregando-se o método volumétrico de Gerber, que consiste na separação da gordura através da centrifugação após a digestão do material protéico com o ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O método se baseia na leitura direta da porcentagem de gordura na escala do butirômetro de Gerber (BRASIL, 2006).

3.2.3 – pH

Determinado com um pHmetro digital (BRASIL, 2006).

3.2.4 – Proteínas

Determinadas utilizando-se o método de BRADFORD (1976).

3.2.5 – Sais minerais (cinzas)

Quantificados por gravimetria após incineração em forno de mufla a 550°C. O método se fundamenta na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado a 525°C, com destruição da matéria orgânica, sem decomposição apreciável dos constituintes do resíduo mineral ou por perda de volatilização (BRASIL, 2006).

3.2.6 – Lactose

Determinada através do método volumétrico com licor de Fehling. Determina-se o teor de lactose no soro através da redução do ácido cúbrico a ácido cuproso (BRASIL, 2006).

3.2.7 – Extrato seco total (E.S.T.)

Determinado pelo método padrão de estufa, 105°C, durante 24 horas (BRASIL, 2006).

3.3 – Precipitação das proteínas do soro

Após a caracterização do soro as proteínas presentes no lactossoro foram extraídas através do método ácido térmico, seguindo-se metodologia utilizada por FLORENCIO *et al.* (2008a).

Inicialmente o soro foi aquecido a 90°C e seu pH reduzido para 4,6, utilizando-se ácido cítrico; após a obtenção do floculado, o soro foi mantido em repouso até atingir temperatura ambiente e o aglomerado protéico retirado por filtração, seguindo-se a mesma metodologia empregada por FLORENTINO (2006).

3.4 – Ensaio de fermentação alcoólica

3.4.1 – Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial) da marca Fleischman, com 70% de umidade, obtido em supermercados da cidade de Campina Grande, PB.

3.4.2 – Chaptalização

A chaptalização é a etapa do processo em que se adiciona, ao mosto, a sacarose, para se obter um produto com a graduação alcoólica dentro das especificações da Legislação Brasileira (BRASIL 1997). A chaptalização é realizada, em geral, quando o meio não tem quantidade suficiente de açúcares.

3.4.3 – Planejamento fatorial para a fermentação alcoólica realizada em biorreator

Com o objetivo de avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada (sacarose e inóculo) sobre a resposta (rendimento) realizou-se um planejamento fatorial, em que na Tabela 3.1 estão expostos os níveis reais e codificados das variáveis independentes de entrada para o planejamento fatorial 2^2 , fato observado na Tabela 3.2, que totaliza 7 experimentos, sendo 4 distintos e 3 no ponto central. Os níveis das variáveis independentes de entrada foram propostos através de observações na literatura.

Variável 1 – Sacarose (g/L) e Variável 2 – Inóculo (g/L)

Tabela 3.1 – Valores reais e codificados das variáveis de entrada

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Sacarose (g/L)	100	130	160
Inóculo (g/L)	3	6	9

Tabela 3.2 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2

Experimentos	Variável 1	Variável 2
1	- (100 g/L)	- (3 g/L)
2	+ (160 g/L)	- (3 g/L)
3	- (100 g/L)	+ (9 g/L)
4	+ (160 g/L)	+ (9 g/L)
5	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)
6	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)
7	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)

Observou-se, com o término do planejamento fatorial simples, que apenas a média dos resultados se apresentou estatisticamente significativa a nível de 95% de confiança utilizando-se o programa Statistic 5.0. Partindo desta análise, realizou-se uma decodificação do modelo para que a extrapolação dos valores, verificando-se se o modelo, fosse estatisticamente significativo; com isto foi acrescentada a configuração estrela, que

adiciona 4 novos experimentos ao planejamento ficando uma matriz de planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela, totalizando 11 experimentos. A Tabela 3.3 mostra os níveis do modelo descodificado e a Tabela 3.4 apresenta a nova matriz com todos os experimentos.

Tabela 3.3 – Valores reais e descodificados das variáveis de entrada

Variáveis	Nível $-a$ (-1,4142)	Nível -1	Nível 0	Nível +1	Nível $+a$ (+1,4142)
Sacarose (g/L)	38	100	130	160	222
Inóculo (g/L)	1,8	3	6	9	10,2

Tabela 3.4 – Matriz de planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela

Experimentos	Variável 1	Variável 2
1	- (100 g/L)	- (3 g/L)
2	+ (160 g/L)	- (3 g/L)
3	- (100 g/L)	+ (9 g/L)
4	+ (160 g/L)	+ (9 g/L)
5	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)
6	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)
7	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)
8	-1,4142 (38 g/L)	0 (6 g/L)
9	+1,4142 (222 g/L)	0 (6 g/L)
10	0 (130 g/L)	-1,4142 (1,8 g/L)
11	0 (130 g/L)	+1,4142 (10,2 g/L)

Concluído o planejamento experimental utilizou-se o experimento que apresentou melhor rendimento para o estudo cinético e ampliação da escala para uma destilação posterior.

3.4.4 – Cinética da fermentação alcoólica realizada em biorreator (ampliação de escala)

Inicialmente, o reator com capacidade de 20 L (em triplicata) foi alimentado com 15 litros de soro desproteínizado e adicionadas as composições definidas (níveis das variáveis de entrada) para o experimento que obteve melhor rendimento. Foram estudados os efeitos das variáveis controladas (entrada) sobre a cinética fermentativa. Amostras em tempos regulares (2 em 2 horas) eram coletadas para acompanhar o aumento do teor alcoólico, redução dos açúcares redutores, aumento da concentração de células, variação da acidez acética e pH (estudo cinético da fermentação alcoólica).

3.4.5 – Métodos analíticos

3.4.5.1 – Teor alcoólico

Determinado através da leitura direta em ebuliômetro, que mede a porcentagem alcoólica (°GL – Graus Gay Lussac).

3.4.5.2 – Açúcares redutores totais (ART)

O método para obtenção de ART se baseia na redução do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Com o aquecimento a solução se torna alaranjada e é lida através do equipamento espectrofotômetro a 540nm.

$$ART = Abs \times F \times V_{diluição} \times 5 \quad (3.1)$$

desde:

ART - teor de açúcares redutores totais

Abs - absorbância

F - fator da solução (1,5773)

V_{diluição} - volume da diluição da amostra

5 - soma das resultantes das soluções de 1mL HCl 2N, 3mL de NaOH 1N e 1mL da amostra.

3.4.5.3 – Concentração celular

Adotou-se, na determinação da concentração celular, o método de massa seca (TRÍBOLI, 1989). A massa seca foi determinada pela diferença entre o peso final e o peso inicial e expresso em g/L. As determinações foram feitas em duplicata.

3.4.5.4 – pH

Para o pH foi adotado o método do item 3.2.3.

3.4.5.5 – Acidez total, acidez fixa e acidez volátil

As concentrações de acidez total e acidez fixa foram determinadas pelo método de titulação volumétrica seguindo-se a metodologia proposta por BRASIL (2005). Obteve-se a acidez volátil pela diferença entre a acidez total e a acidez fixa.

3.4.5.6 – Sólidos solúveis totais (°Brix)

Realizou-se a leitura através do equipamento chamado refratômetro (BRASIL 2005).

3.4.5 – Percentual de conversão, produtividade e parâmetros cinéticos fermentação alcoólica

O percentual de conversão e a produtividade (g/L.h) para produção da bebida fermentada de lactosoro foram calculados através das Equações 3.2 e 3.3, respectivamente.

$$\% \text{ conversão} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f) \times 0,511} \quad (3.2)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{P}{t} \quad (3.3)$$

em que:

P_f - concentração de etanol experimental final

P_i - concentração de etanol experimental inicial

P - concentração de etanol experimental

S_f - concentração final do substrato

S_i - concentração inicial do substrato

t - tempo de fermentação (h)

Calculou-se, através da Equação 3.4, o parâmetro cinético $Y_{P/S}$ (rendimento de produto) e, através da Equação 3.5, o $Y_{X/S}$ (rendimento de biomassa):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (3.4)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (3.5)$$

sendo:

S_f - concentração final de substrato (g/L)

S_i - concentração inicial de substrato (g/L)

P_f - concentração final de produto (g/L)

P_i - concentração inicial de produto (g/L)

X_f - concentração final de biomassa (g/g)

X_i - concentração inicial de biomassa (g/g)

$Y_{p/s}$ (rendimento do produto) - quantidade de produto formado em relação à quantidade de substrato limitante consumido;

$Y_{p/s}$ (rendimento de biomassa) - quantidade de biomassa formada em relação à quantidade de substrato limitante consumido.

3.4.6 - Centrifugação do fermentado

O fermentado foi centrifugado em centrífuga da marca Excelsa II, modelo 206 BL com velocidade de 3000 rpm (rotação por minuto) e colocado em cubetas de 100mL totalizando 400mL para cada 5 min de centrifugação com o objetivo da separação dos sólidos em suspensão no meio.

3.5 – Destilação (produção do aguardente)

Primeiro se mediu o volume do fermentado a ser destilado e se analisou a concentração inicial de etanol, além de um cálculo de concentração para saber a quantidade teórica total de destilado, com a concentração alcoólica desejada.

A destilação foi realizada em um alambique de cobre, capacidade de 20 litros úteis chapa 18, rebatido, polido e envernizado, blindado em solda de cobre e solda neutra, coluna modelo deflegmador, termômetro, flanges, tampão em bronze e uma serpentina de resfriamento em cobre adaptada a uma caixa de cobre polida e rebatida, cujo aquecimento foi feito por chama direta no qual se abriu, de início, a entrada de vinho no alambique até que o fermentado oriundo do reator fosse transferido para o alambique por gravidade, ocupando aproximadamente 2/3 da sua capacidade total; em seguida, o ebulidor foi fechado, aquecido moderadamente por chama direta através de um queimador semi-industrial a gás butano, dando início ao processo de destilação.

A condução operacional do processo destilatório, foi desenvolvida, basicamente controlando-se o nível da carga de produto a ser destilado no alambique, a temperatura de ebulição do álcool e a pressão da base do tacho; a partir daí, os vapores hidroalcoólicos começaram a ascender através do capitel do alambique, indo até o sistema de condensação; esses vapores, ao chegarem ao condensador da serpentina, foram resfriados até atingir a temperatura média de 25 °C, cujo destilado foi coletado com separação das frações cabeça (10%), coração (aguardente) (80%) e cauda (10%).

3.5.1 – Bidestilação

Na primeira etapa da destilação se percebeu a presença de precipitados com uma leve coloração azulada saindo do alambique, provavelmente pela alta concentração de impurezas observando-se, com isto, a necessidade de se realizar uma bidestilação, que

seria uma maneira de melhorar a qualidade da aguardente, motivo pelo qual se diluiu a fração coração com uma quantidade de água destilada e destilou-se normalmente observando-se a intensidade do fogo e a vazão da destilação.

3.5.2 - Tridestilação

Na segunda etapa da destilação ainda se notou a presença de impurezas que deixaram o destilado turvo, só que nesta nova etapa apresentou cor esbranquiçada; mesmo assim, foi notória a necessidade de se realizar uma tridestilação, para o que se diluíram todas as frações, seguindo-se o procedimento realizado na bidestilação.

3.5.3 – Análises realizadas

Realizaram-se análises por técnicas de polarografia para determinação dos íons cádmio, chumbo e cobre, e por cromatografia de substâncias secundárias da aguardente, tais como acetaldeído, acetato de etila, metanol, N propanol, iso butanol, N butanol, iso amílico, álcoois superiores, acidez volátil em ácido acético, % etanol (v/v) e soma dos componentes secundários, a fim de se confrontar com a legislação vigente (BRASIL, 1997).

3.5.3.1 – Polarografia

As concentrações dos íons cádmio, chumbo e cobre presentes nas amostras de cachaça foram quantificadas por técnica de polarografia ASV (Anodic Stripping Voltammetry) utilizando-se um polarógrafo modelo POL 150, acoplado a uma célula de mercúrio modelo MDE 150, ambos da marca Radiometer – Analytical. O polarógrafo é conectado a um microcomputador PC com sistema operacional Windows 95[®], onde se utiliza o programa Trace Master X9737-2.03, da Radiometer, para a realização das medições experimentais. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Eletroquímica da Universidade Federal de Campina Grande.

3.5.3.2 – Cromatografia

Analizou-se a bebida destilada para determinar a concentração de álcoois superiores e voláteis e confrontá-los com a Legislação Brasileira (BRASIL, 1999). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso da marca Varian CP – 3380, com padrão do ITEP (Instituto Tecnológico de Pernambuco), com concentrações de: aldeídos de etila: 4,96 mg/100mL; metanol: 2,73 mg/100mL; n-propanol: 6,03 mg/100mL; isobutanol: 4,42 mg/100mL; nbutanol: 3,16 mg/100mL; isoamílico : 3,20 mg/100mL. O cromatógrafo estava equipado a uma coluna capilar de fundo oco CP - Wax 57CB, nas seguintes

condições operacionais: Temperatura de 180, 250 e 6 – 120 °C para injetar, detector e coluna, respectivamente. Utilizou-se hidrogênio como gás de arraste com velocidade de 20 mL/40 s. As análises foram realizadas no ITEP – Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos e de Bebidas Alcoólicas (LABTOX) em Recife, Pernambuco.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos e sua discussão. O trabalho foi dividido em 4 etapas, em que a primeira etapa do trabalho envolveu a caracterização do soro de queijo de coagulação enzimática de uma indústria da região, para definição dos componentes físico-químicos a fim de avaliar seu potencial e viabilidade, após extração das proteínas, para ser utilizado como meio para produção de aguardente; a segunda etapa englobou a separação das proteínas do soro através do método Ácido Térmico, enquanto a terceira etapa envolveu ensaios de fermentação alcoólica utilizando o soro após a extração das proteínas, como fonte de nutrientes com acompanhamento da cinética de produção de etanol em processo descontínuo e a utilização de um planejamento estatístico para definição das condições mais adequadas para a produção de etanol; por fim, a quarta etapa foi a destilação do fermentado para obtenção da aguardente.

4.1 – Caracterização do soro de queijo de coagulação enzimática

A constituição de matérias-primas depende do material de origem, da manipulação e do tratamento entre outros fatores. Para o soro de queijo, em especial, vai depender do clima, da manipulação e do processo para fabricação do queijo ou extração da caseína. Para a utilização do soro de queijo “Tipo Coalho” sua caracterização foi realizada com a finalidade de conhecer os componentes presentes no mesmo visando utilizá-lo como substrato para a fermentação alcoólica.

As médias dos resultados das análises físico-químicas efetuadas no soro resultante do queijo “Tipo Coalho”, proveniente de uma indústria de laticínio localizada na zona rural da cidade de Caturité, são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Média dos resultados das análises físico-químicas do soro de queijo “Tipo Coalho” de uma industrial de laticínio localizado no Cariri paraibano

Componentes	Média dos resultados
pH	6,34 ± 0,54
Acidez (°D)	11,00 ± 1,16
Gordura (%)	0,33 ± 0,06
Lactose (%)	4,25 ± 0,05
Extrato seco total (%)	6,43 ± 0,08
Sais minerais (%)	0,60 ± 0,01
Proteína (%)	1,25 ± 0,06
Extrato seco desengordurado (%)	6,10 ± 0,11
Umidade (%)	93,57 ± 0,08

Observando-se os resultados da Tabela 4.1, verifica-se que os teores encontrados para pH (6,34), sais minerais (0,60%) e lactose (4,25%), estão próximos aos indicados por FLORENTINO (2006) que trabalhou com soro de queijo “Tipo Coalho” de queijeria artesanal; analisando-se os valores de extrato seco total (6,43%), gordura (0,33%) e proteína (1,25%), evidencia-se que o método de produção do queijo “Tipo Coalho” com obtenção do subproduto soro de queijo, é mais eficiente em queijeiras industriais visto que há uma padronização em seu processo diminuindo, assim, a perda de rendimento.

A acidez (11°D) encontrada no soro *in natura* está próxima à da média dos valores observados por FLORENCIO *et al.* (2007a), quando caracterizaram o soro de queijo de coagulação enzimática, de produção artesanal (9 °D) da zona rural da cidade de Montadas, PB.

Segundo MORA (1990) o soro doce tem valores de pH entre 6,10 – 6,60; logo, verifica-se que o valor de 6,34 está dentro dessa faixa indicando a possibilidade do uso deste soro como ingrediente para várias formulações, inclusive a fermentação. Valores semelhantes foram encontrados por FLORENTINO (2006) e por FLORENCIO *et al.* (2007a).

A proteína encontrada no leite está em torno de 3,5 a 3,6% (BEHMER, 1991). O teor de 1,25% observado no soro de queijo “Tipo Coalho”, representa aproximadamente 35% das proteínas totais do leite que, muitas vezes, é inaproveitada.

Considerando-se a média da lactose encontrada no leite (4,6%) nota-se uma diferença de 0,35% do valor da mesma encontrada no soro (4,25%); segundo FLORENCIO *et al.* (2007a) pode ser resultante da retenção da lactose na caseína do queijo e da hidrólise dos micro-organismos lácticos; também encontrada por DOMINGUES *et al.* (1999) em Lisboa, Portugal, uma concentração de lactose elevada (4,8%), analisando novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo representando mais do que a média encontrada no leite da região paraibana.

Ainda de acordo com a Tabela 4.1, o teor de gordura (0,33%) se encontra dentro da média dos queijos de coagulação enzimática produzidos em escala industrial adotando-se técnicas apropriadas (0,2 a 0,5% de gordura) (FURTADO, 1991).

O valor do extrato seco total (6,43%) está bem próximo ao encontrado por FURTADO (1991) que foi 6,34%, valor médio obtido normalmente na produção de queijo de coagulação similar produzido com técnicas apropriadas.

4.3 – Separação das proteínas

Utilizou-se, neste trabalho, o método ácido térmico para separação das proteínas do soro de queijo, que se baseia na adição de ácido orgânico para baixar o pH até o ponto isoelétrico das proteínas e adição de calor (90°C), sendo escolhida como melhor temperatura por FLORENTINO (2006). A proteína foi separada por filtração.

A Tabela 4.2 apresenta a caracterização do soro de queijo após a remoção da proteína através do método ácido térmico.

Tabelas 4.2 – Médias dos componentes do soro de queijo desproteínizado

Componentes	Média dos resultados
pH	5,10 ± 0,10
Gordura (%)	Traços
Lactose (%)	3,60 ± 0,27
Extrato seco total (%)	4,43 ± 0,02
Sais minerais (%)	0,50 ± 0,27
Proteína (%)	0,33 ± 0,16

Com a média dos resultados do soro de queijo desproteínizado há, ainda, alta concentração de lactose no soro (3,6%). Com a remoção das proteínas, nota-se uma redução de 73,60% da existente no soro *in natura*. O pH (5,10) ainda se encontra dentro da faixa esperada visto que pode ser reduzido para utilização do soro na fermentação alcoólica (4,0 – 4,5).

Observa-se, na análise da Tabela 4.2, que após a precipitação das proteínas pelo método ácido térmico ocorreu uma remoção quase que total da sua gordura, embora com resultado satisfatório, visto que a gordura não seria necessária no processo fermentativo além de que é um dos compostos que mais poluem nas indústrias de laticínio, quando o soro é descartado sem tratamento prévio. Valores semelhantes obteve FLORENTINO (2006) quando utilizou a mesma temperatura e o mesmo método na precipitação comprovando, com isto, a eficiência na absorção do método ácido térmico.

Para a lactose (3,6%) houve decréscimo (15,29%) do valor encontrado no soro *in natura*, sendo possivelmente, à retenção da lactose no aglomerado protéico. Valores semelhantes foram encontrados por FLORENTINO (2006). Comparando-se com os resultados obtidos por FLORÊNCIO *et al.* (2008a), verifica-se uma redução significativa visto que o mesmo, trabalhando com desproteínização do soro de queijo “Tipo Coalho” artesanal, obteve uma remoção de 22%.

4.4 – Ensaios da fermentação alcoólica

Os profissionais de diferentes formações têm buscado cada dia mais otimizar os produtos, minimizar custos e tempo, maximizar rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos; com todas essas finalidades vem crescendo a busca de técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

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

Para a produção de etanol foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (comercial), fermento da marca Fleischmann. Os ensaios foram realizados em biorreatores acompanhando o processo por 48 horas, com adição de sacarose e inóculo em diferentes porcentagens, como mostram os dados da Tabela 4.3, seguindo-se o planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais e estabelecendo como variável resposta a % de conversão.

Tabela 4.3 – Condições dos ensaios do planejamento experimental

Experimentos	Sacarose (S)	Inóculo (I)	% Conversão
1	- (100 g/L)	- (3 g/L)	70,77
2	+ (160 g/L)	- (3 g/L)	72,57
3	- (100 g/L)	+ (9 g/L)	52,79
4	+ (160 g/L)	+ (9 g/L)	47,42
5	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	54,10
6	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	50,65
7	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	47,80

Tabela 4.4 – ANOVA (Análise de variância) para o modelo linear

	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	609,502	3	203,167	9,493
Resíduo	64,207	3	21,402	
Falta de ajuste	128,415	1		
Erro puro	192,622	2		
Total	673,709	6		
R ² (%)	71,409			
F tabelado 0,95, 3,3				9,280

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Statistica 5,0, e se constatando que apenas a média se apresentou estatisticamente significativa para 95% de confiança, como mostra a Equação 4.1.

$$\% \text{ Conversão} = 56,585 \pm 3,029 - 0,893 \pm 4,007 \text{ S} - 10,782 \pm 4,007 \text{ I} - 1,792 \pm 4,007 \text{ SI}$$

Eq. 4.1

Partindo-se desta análise, verificou-se a necessidade da ampliação dos níveis das variáveis de entrada aplicando-se uma configuração estrela ao planejamento já existente, ficando um planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela, totalizando 11 experimentos, como mostrado na Tabela 4.6.

Tabela 4.5 – Condições dos ensaios do planejamento fatorial $2^2 + 3$ pontos centrais + configuração estrela

Experimentos	Sacarose (S)	Inóculo (I)	% Conversão
1	- (100 g/L)	- (3 g/L)	70,77
2	+ (160 g/L)	- (3 g/L)	72,57
3	- (100 g/L)	+ (9 g/L)	52,80
4	+ (160 g/L)	+ (9 g/L)	47,42
5	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	54,10
6	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	50,65
7	0 (130 g/L)	0 (6 g/L)	47,80
8	-1,4142 (38 g/L)	0 (6 g/L)	74,06
9	+1,4142 (222 g/L)	0 (6 g/L)	55,01
10	0 (130 g/L)	-1,4142 (1,8 g/L)	76,14
11	0 (130g/L)	1,4142 (10,2 g/L)	56,09

Estão apresentados na Tabela 4.7 os valores da ANOVA para o modelo de 2ª ordem para 95 % de confiança.

Tabela 4.6 – ANOVA (Análise de variância) para o modelo quadrático

	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	1098,177	5	219,64	7,098
Resíduo	154,71	5	30,942	
Falta de ajuste	0	-		
Erro puro	154,710	5		
Total	1252,928	10		
R ² (%)	87,652			
F tabelado _{0,95,5,5}				5,050

O F calculado foi 7,098 e o F tabelado_{0,95,5,5} (RODRIGUES & IEMMA, 2005) foi 5,05 observando-se que o modelo é estatisticamente significativo para 95% de confiança pois a razão entre F calculado e F tabelado foi 1,40; segundo BARROS NETO *et al.* (1996) para que o modelo tenha validade estatística, de acordo com o Teste F, o valor da razão F calculado em relação a F tabelado deve ser acima de 1,0. O modelo codificado está apresentado na Equação 4.2, com os coeficientes estatisticamente significativos em negrito. Observa-se que o modelo apresenta os coeficientes com seus erros padrão.

$$\% \text{Conversão} = \mathbf{50,85} \pm \mathbf{3,71} - 3,8151 \pm 1,967 S - \mathbf{8,9344} \pm \mathbf{1,967} L - 1,795 \pm 2,781 SL + 5,7338 \pm 2,341 S^2 + \mathbf{6,5238} \pm \mathbf{2,341} L^2 \quad \text{Eq. 4.2}$$

A Figura 4.1 apresenta o gráfico de Pareto com nível de 95% de confiança para a estimativa dos efeitos.

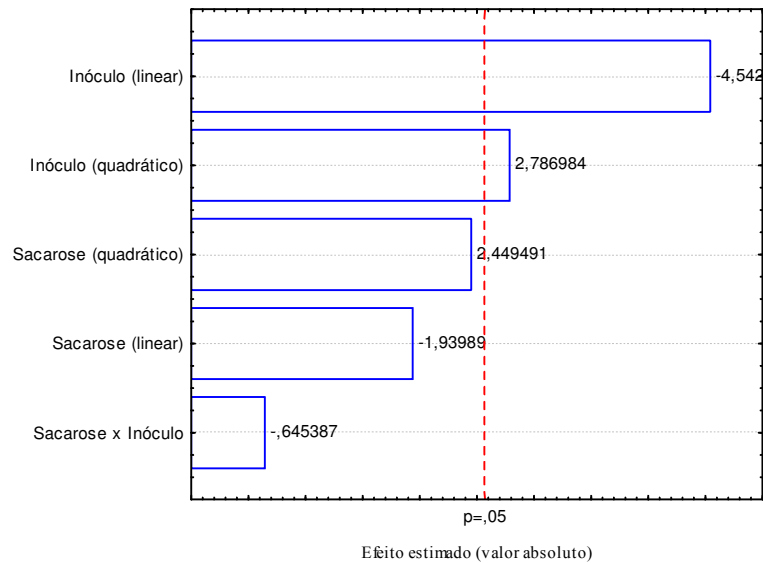


Figura 4.1 - Gráfico de Pareto para % conversão

Verifica-se, analisando-se a Figura 4.1, que os efeitos da concentração de inóculo, tanto para o efeito principal como o quadrático, se mostram estatisticamente significativos.

A Figura 4.2 apresenta a superfície de resposta gerada pelo programa Statistica 5,0 com base na variável dependente % conversão.

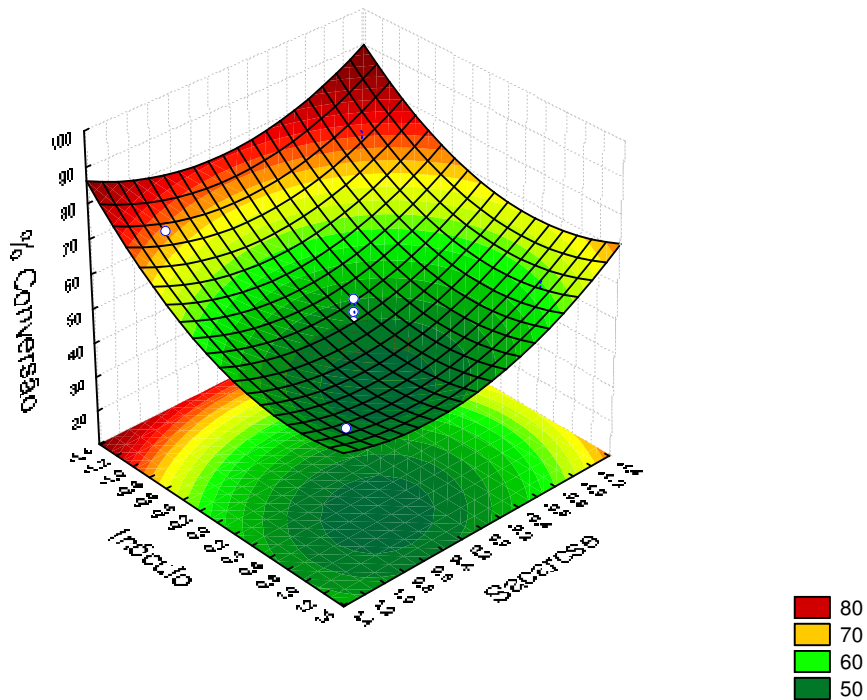


Figura 4.2 - Superfície de resposta para a % conversão

Analisando-se a superfície de resposta (Figura 4.2) tem-se que, fixando-se o valor da concentração de inóculo abaixo de 6 g/L para qualquer valor de concentração inicial de sacarose, a % conversão é máxima para o processo em estudo.

Os valores do rendimento estão representados na Figura 4.3.

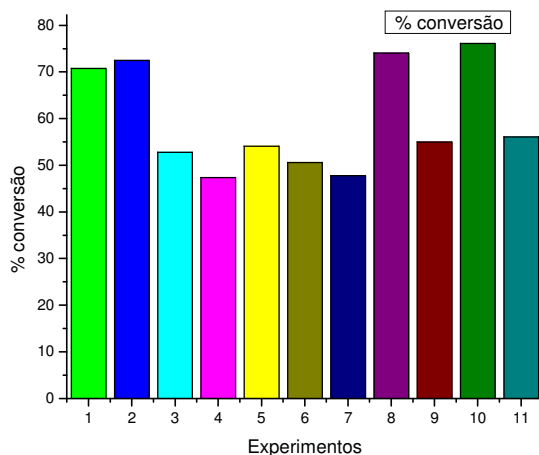


Figura 4.3 - Histograma dos valores de % conversão para os 11 ensaios realizados

De acordo com a Figura 4.3, o experimento que obteve maior % conversão foi o ensaio 10 (76,14%), utilizando-se 130 g/L de sacarose e 1,8g/L de inóculo; a partir deste

estudo fez-se o acompanhamento cinético, durante 44 horas, do fermentado. Em trabalho no qual se empregou o suco do kiwi (BORTOLINI *et al.*, 2001) com adição da *Saccharomyces cerevisiae* obteve-se % conversão de 38,65 % com consumo de 9,16 % de sacarose.

4.4.1 – Cinética da fermentação alcoólica

A cinética foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. Utilizaram-se 3 reatores de 20 litros cada um, alimentados individualmente com 15 litros de soro de queijo desproteínizado, nas condições do experimento de maior rendimento (130g/L de sacarose e 1,8g/L de inóculo). Realizaram-se 3 bateladas do experimento com as mesmas condições operacionais, buscando-se observar a reprodutibilidade dos dados experimentais.

A Figura 4.4 apresenta os perfis de decaimento do ART ao longo do tempo da fermentação alcoólica.

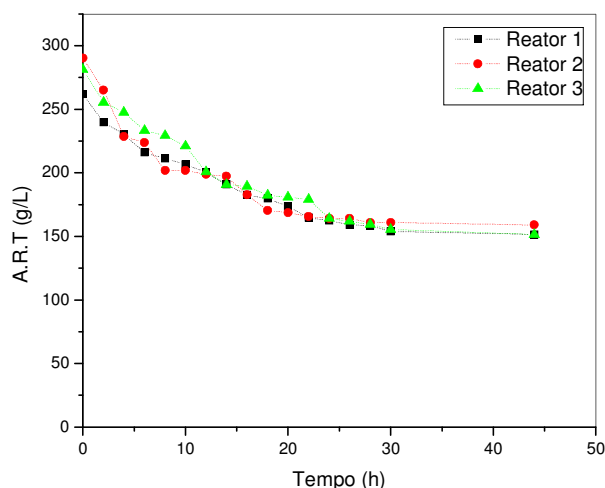


Figura 4.4 - Comportamento do ART durante a fermentação alcoólica

Observa-se que, nas primeiras 20 h, houve um decaimento quase que constante do substrato ficando estável em 25 h e se mantendo até o final da fermentação. Verifica-se um consumo de sacarose em média de 123,81 g/L, durante as 25 h de fermentação estendendo-se constante até o término, com 44 h de fermentação. Verifica-se uma boa reprodutibilidade dos dados notando-se que os perfis são semelhantes nos três reatores. FLORENTINO (2006) trabalhando com soro de queijo artesanal para fermentação alcoólica obteve um consumo de 66,81% da sacarose adicionada ao processo fermentativo, sendo este valor um pouco acima da média encontrada neste trabalho (44,56%) devido, possivelmente, à quantidade de sacarose adicionada ao meio (160 g/L).

A Figura 4.5 mostra o perfil de crescimento do micro-organismo ao longo do processo fermentativo.

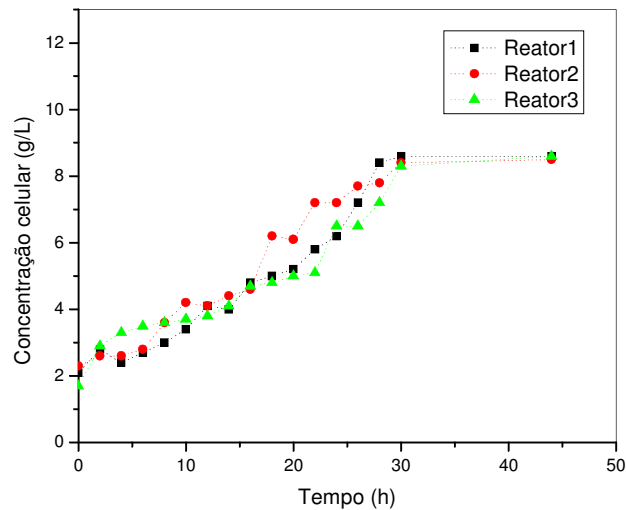


Figura 4.5 - Comportamento de crescimento celular durante a fermentação alcoólica

Na Figura 4.5 verifica-se que houve um crescimento uniforme da levedura estabilizando-se, porém, após 30 h de fermentação, quando já estava estável a graduação alcoólica (3,25°GL). TORRES NETO *et al.* (2006), adicionando 20 g/L de levedura no início da fermentação do suco do pedúnculo do caju, observaram um crescimento constante da levedura nas primeiras 15 h (38 g/L em massa seca). FLORENTINO (2006) acompanhando o crescimento celular durante 48 h de fermentação do soro de queijo, adicionando 3,95 g/L de inóculo, notou uma produção celular de 7,9 g/L, valor semelhante ao da média encontrada neste estudo (6,53 g/L).

A Figura 4.6 apresenta o perfil de produção de etanol ao longo do tempo de fermentação.

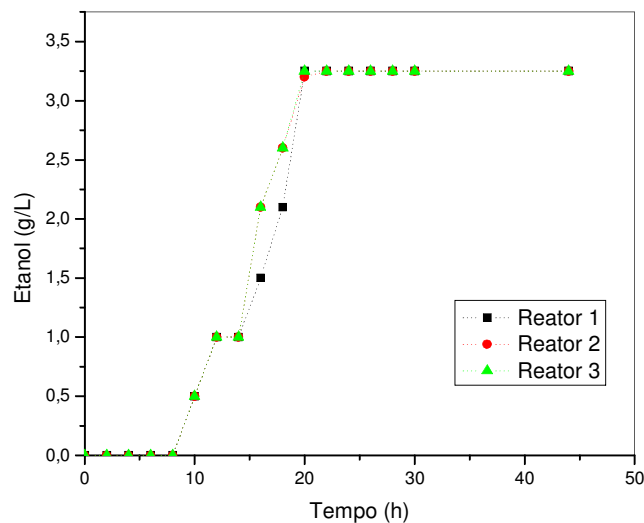


Figura 4.6 - Comportamento da produção de etanol durante a fermentação alcoólica

Para o produto (etanol) se constatou que nas primeiras 10 h da fermentação, não verificou produção de etanol devido, sem dúvida, à adaptação da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ao meio, começando a apresentar valores significativos de etanol após as 10 h, com aumento gradativo e se estendendo até as 20 h, quando então começou a estabilização e não se observou mudança relativa durante a continuação do processo fermentativo. ROCHA *et al.* (2008) ao fermentarem o caldo do figo-da-índia com um consumo de ART de 90 g/L, observaram graduação alcoólica de 6,4 °GL (%v/v); já ANDRADE *et al.* (2003) trabalhando com pupunha com um consumo de 23 g/L de ART, obtiveram um fermentado de 12,1 °GL, aproximadamente 4 vezes maior que o fermentado do soro de queijo. FLORENCIO *et al.* (2008b) fermentando o caldo do sorgo sacarino com uma média de entrada de ART na fermentação de 97,35 g/L, observaram teor alcoólico de 5 °GL (%v/v). FLORENTINO (2006), trabalhando com soro de queijo de coagulação enzimática de fabricação artesanal, realizou fermentação alcoólica utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* com adição inicial de 8,89 g/L de sacarose e 3,95 g/L de inóculo, obtendo 7°GL (v/v) de etanol.

Observa-se boa reprodutibilidade dos dados experimentais para os três reatores visto que os valores encontrados nesses reatores não apresentam grande diferença.

A Figura 4.7 indica o comportamento dos sólidos solúveis durante a fermentação alcoólica.

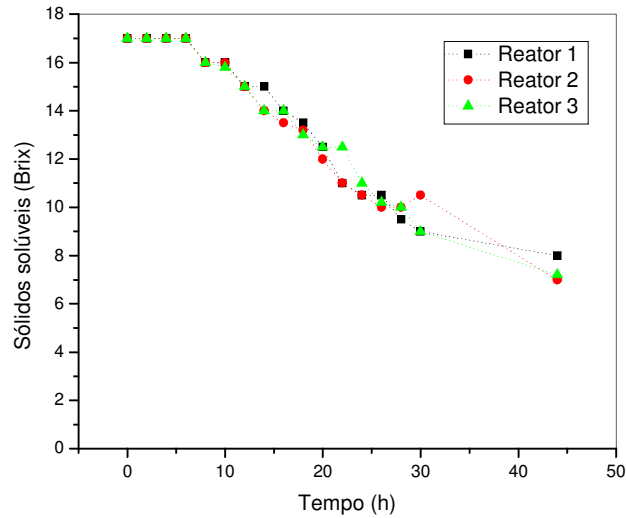


Figura 4.7 - Comportamento dos sólidos solúveis durante a fermentação alcoólica

Na fermentação alcoólica os sólidos solúveis (°Brix) apresentaram valores de decaimento rápido (17 – 6 °Brix em média), representados pela Figura 4.7, havendo boa reprodutibilidade dos dados experimentais visto que os três reatores seguiram a mesma variação. FLORÊNCIO *et al.* (2008b) trabalhado com sorgo sacarino obtiveram teor de sólidos solúveis de 12,1 e 11,6 °Brix (colmos limpos e colmos com folhas respectivamente) para o início da fermentação e ao término foi de 5 °Brix (para ambos). Na preparação e caracterização do vinho de laranja, CORAZZA *et al.* (2001) observaram redução de 26,5 – 8,0 °Brix, mas os valores dos sólidos solúveis decaíram durante todo o processo observando-se que houve uma diminuição média de 56% durante o processo de fermentação do vinho de laranja.

A Figura 4.8 apresenta o comportamento do pH durante a fermentação alcoólica.

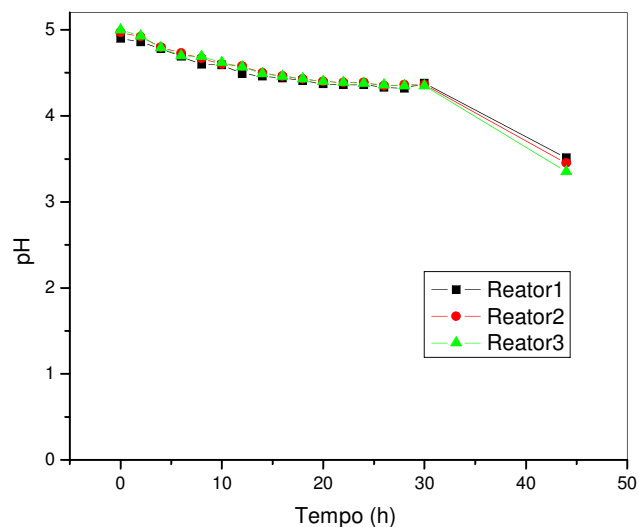


Figura 4.8 - Comportamento do pH durante a fermentação alcoólica

Para os valores encontrados de pH houve uma variação, embora pequena, sendo a esperada, visto que trabalhos de processos fermentativos em que se utilizou a *Saccharomyces cerevisiae*, também se encontraram valores relativamente próximos (FLORENTINO, 2006), observando-se o decaimento acentuado após 30 horas de fermentação. Valores semelhantes foram observados também por BORTOLINI *et al.* (2001), CORAZZA *et al.* (2001), ANDRADE *et al.* (2003), TORRES NETO *et al.* (2006) e FLORÊNCIO *et al.* (2008b) com 3,9; 3,33; 3,88; 3,5 e 4,5 respectivamente, ao término da fermentação; já FLORENTINO (2006) iniciou a fermentação do soro de queijo com adição da *Saccharomyces cerevisiae* com um pH de 5,92 e terminou a fermentação após 48 horas com pH de 4,18, valores superiores aos encontrados neste estudo.

Para as acidez (total, fixa e volátil) os valores encontrados estão nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11, respectivamente.

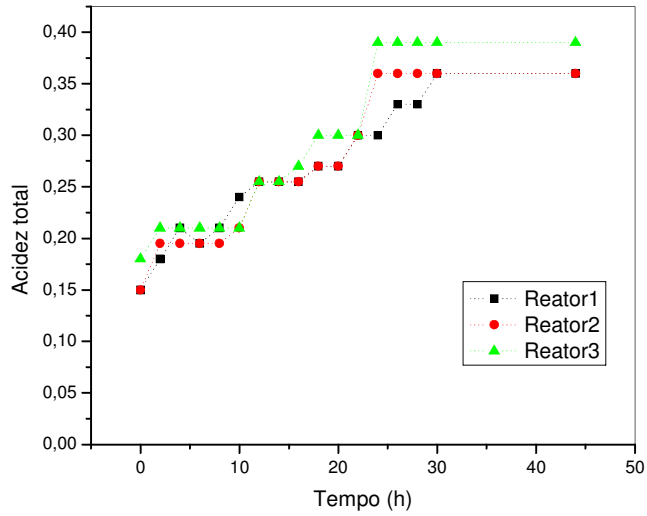


Figura 4.9 - Comportamento da acidez total do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado

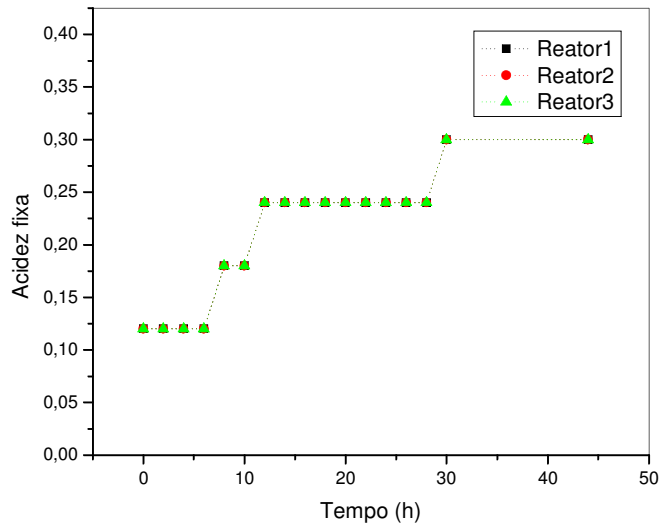


Figura 4.10: Comportamento da acidez fixa do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado

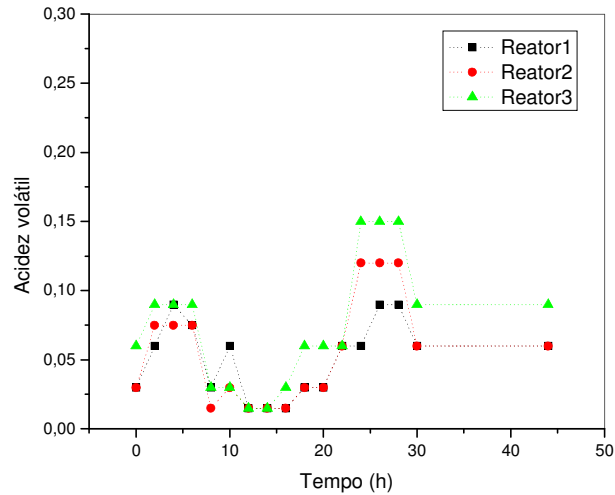


Figura 4.11: Comportamento da acidez volátil do processo de fermentação alcoólica expressa em gramas de ácido acético por 100 mililitros do fermentado

Nota-se, para os valores de acidez, que houve boa reprodutibilidade dos dados para os 3 reatores. Os valores encontrados para a acidez total estão dentro do esperado visto que, na literatura, também se encontram valores semelhantes, segundo CORAZZA *et al.* (2001) e TORRES NETO *et al.* (2006). Para a acidez volátil verifica-se uma variação nas primeiras 30 horas; resultados semelhantes foram encontrados por ROCHA *et al.* (2008). Portanto, para o fermentado de soro de queijo a acidez se encontra dentro da faixa considerada favorável à bebida.

Analisou-se a cinética de fermentação alcoólica em relação aos parâmetros cinéticos (eficiência, %conversão, produtividade, rendimentos de biomassa e produto), obtendo-se os seguintes valores, Tabela 4.7, considerando-se os tempos de 20 horas, para o reator 1, de 22 horas para o reator 2 e de 20 horas para o reator 3.

Tabela 4.7: Valores dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

Reatores	%Conversão	Produtividade (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)
1	56,85	1,282	0,291	0,0740
2	40,31	1,165	0,206	0,0498
3	49,86	1,282	0,254	0,0686
Média	49,01	1,243	0,250	0,0641

O reator que obteve melhor % conversão foi o 1 (56,85%); também se observou a melhor produtividade (1,282 g/L.h) igual ao reator 3. Em relação ao rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) e rendimento de produto ($Y_{P/S}$) os melhores valores foram do reator 1 mas,

em função da boa reprodutibilidade dos dados experimentais, a média dos parâmetros cinéticos está, em geral, bem próxima dos valores individuais de cada reator.

Com relação à produtividade, observa-se que, para o fermentado de figo-da-índia (ROCHA *et al.*, 2008) os valores foram bem semelhantes de 1,43 e 1,53 g/L.h; ainda se nota paridade no fermentado de suco de kiwi, em que BORTOLINI *et al.* (2001) encontraram produtividade na faixa de 0,738 – 2,001g/Lh. Valores semelhantes observados SILVA *et al.* (2007) trabalhando com fermentação do suco do caju, ao obterem uma produtividade de 1,43 g/Lh, enquanto ANDRIETTA *et al.* (2003) verificando a influência da velocidade de alimentação de substrato em processos de produção de etanol em batelada alimentada, conseguiram valores bem acima dos encontrados nas demais literaturas citadas, variando entre 9,02 a 10,06 g/L.h.

Analisando a % conversão, tem-se que os valores encontrados por ROCHA *et al.* (2008) no fermentado de figo-da-índia, estão bem acima (92,00–88,80) dos valores indicados neste trabalho (49,01); no entanto, os valores relatados por BORTOLINI *et al.* (2001) no fermentado do suco de kiwi estão abaixo (36,36%) da média encontrada.

De acordo com a Tabela 4.7, a média do rendimento em produto (Y_p/s) encontrada neste trabalho foi de 0,250 g/L, valor próximo de SILVA *et al.* (2007) estudando a produção do fermentado do suco de caju.

Para o rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$) o valor encontrado (0,0641 g/g) neste trabalho se encontra superior aos mencionados por ANDRIETTA *et al.* (2003) (0,0256 g/g) ao avaliarem da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e a produtividade dos processos de produção de etanol em batelada alimentada e por SILVA *et al.* (2007) (0,061 g/g) ao fermentarem o suco do caju para produção de etanol.

As Figuras 4.12, 4.14 e 4.16 apresentam o crescimento da concentração celular através do tempo, em cada reator (1, 2 e 3); já as Figuras 4.13, 4.15 e 4.17 apresentam o comportamento do logaritmo do crescimento celular através do tempo em cada reator utilizando-se apenas dos dados da fase log de crescimento.

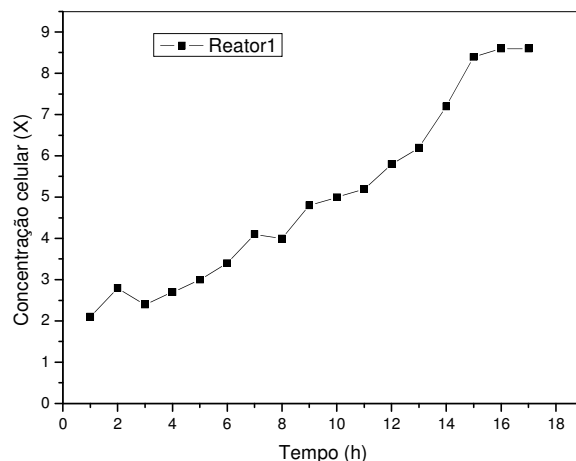


Figura 4.12 - Comportamento do crescimento celular no reator 1

Analisando-se a Figura 4.12, observa-se que a fase de crescimento celular ou fase log começa no tempo de 4 horas de fermentação estendendo-se até as 30 horas, quando ocorreu um crescimento quase que constante durante este processo.

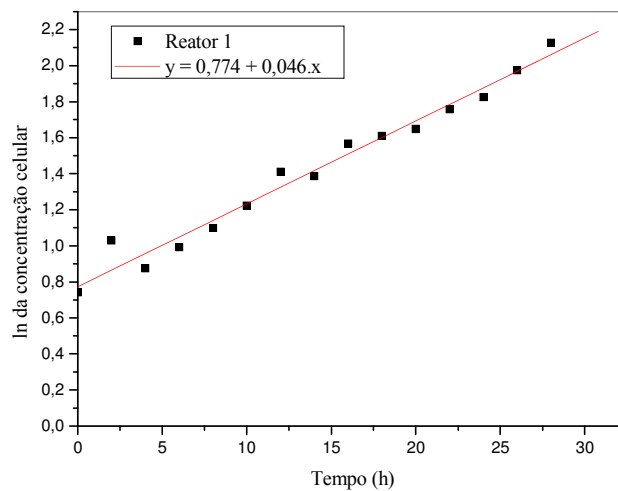


Figura 4.13 - Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 1

Ao se observar a Figura 4.13, verifica-se que a velocidade de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,046 \text{ h}^{-1}$ (coeficiente angular da reta).

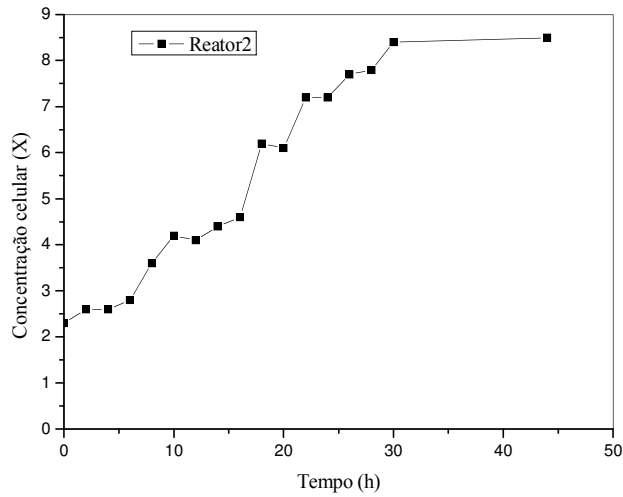


Figura 4.14 - Comportamento do crescimento celular no reator 2

Observa-se, na Figura 4.14, que a fase de crescimento celular se iniciou em 4 horas prolongando até as 30 horas.

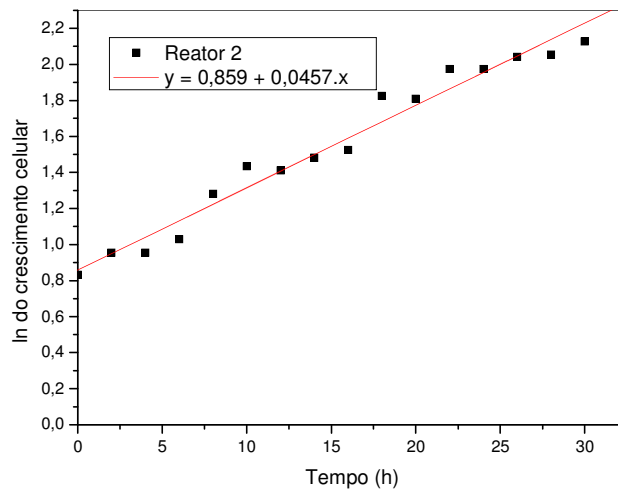


Figura 4.15 - Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 2

A velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o reator 2 foi de $0,0457 \text{ h}^{-1}$ (coeficiente angular da reta).

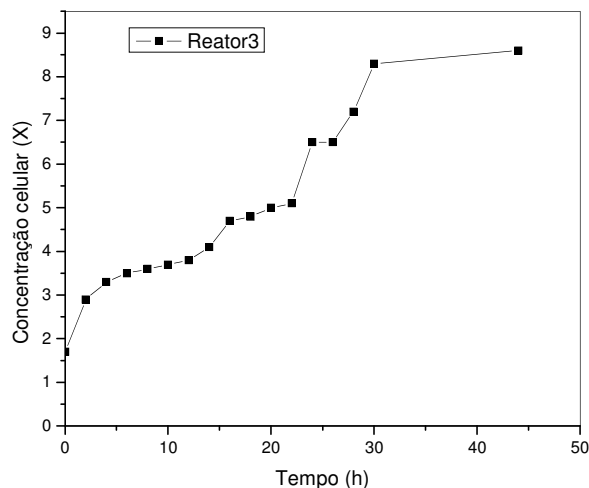


Figura 4.16 - Comportamento do crescimento celular no reator 3

Analisando-se a Figura 4.16, tem-se que a fase de crescimento celular ou fase log, começa no tempo de 2 horas de fermentação e se estende até as 30 horas, com um crescimento quase que constante durante este processo.

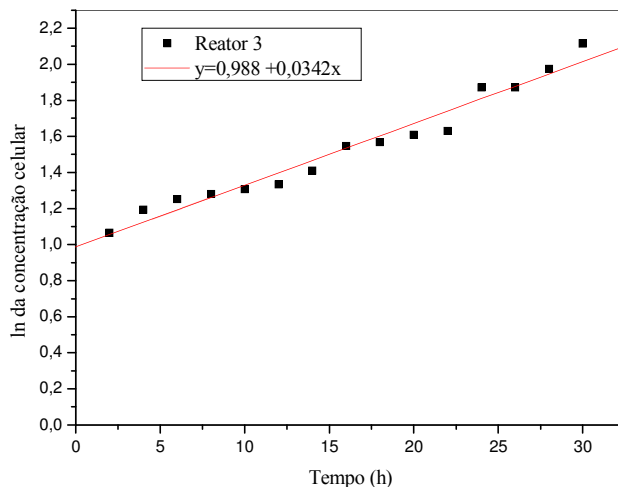


Figura 4.17 - Cálculo da taxa máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o processo fermentativo do reator 3

A velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o reator 3 foi de $0,034\text{h}^{-1}$ (coeficiente angular da reta).

Analisando-se as Figuras 4.13, 4.15 e 4.17, constata-se que a média da velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) é de $0,042\text{h}^{-1}$. SILVA *et al.* (2007) trabalhando com fermentação alcoólica do suco de caju com adição de 20g/L de inóculo

(*Saccharomyces cerevisiae*) no início do processo, obtiveram um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,16\text{h}^{-1}$. ANDRIETTA et al. (2003) estudando a avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e a produtividade dos processos de produção de etanol em batelada alimentada, com a adição de 20% de cepa da levedura Y904, chegaram a um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,45\text{h}^{-1}$. Analisando os valores encontrados na literatura conclui-se que a velocidade de crescimento celular do fermentado de soro de queijo foi baixa; provavelmente, o baixo valor de $\mu_{\text{máx}}$ no processo fermentativo foi devido à utilização da levedura comercial que não é adequada para a fermentação alcoólica.

4.5 – Destilação (produção da aguardente)

A destilação consiste em se aquecer um líquido até sua fervura, gerando vapores que, ao serem recondensados, constituirão um novo líquido, com teores mais altos dos componentes mais voláteis que o líquido original (MAIA & CAMPELO, 2006). Retirando-se frações do líquido destilado, os primeiros 10% constituem a cabeça, os 10% finais é a cauda e os 80% intermediários correspondem ao coração, que é a própria aguardente.

No processo de destilação realizado em alambique de cobre com capacidade de 20 L úteis, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Valores coletados do destilado com separação de frações cabeça (10%), coração (80%) e cauda (10%)

	Cabeça (10%)	Coração (80%) (Aguardente)	Cauda (10%)
Teor alcoólico (°GL)	45	41	24

Observa-se, na Tabela 4.8, uma diluição da fração cabeça em relação ao teor alcoólico visto que o esperado seria um valor acima de 65°GL (v/v) (MAIA & CAMPELO, 2006), podendo ter sido devido a resíduos deixados pela lavagem do alambique. Para a fração coração (aguardente) o teor alcoólico encontrado está dentro do previsto para bebidas destiladas de vinhos de frutas; já para a cauda, o valor encontrado está dentro do esperado, uma vez que muita impureza retida é eliminada no término da destilação.

Os resultados das análises físico-químicas da aguardente destilada de soro de queijo estão relacionados a seguir na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Análises físico-químicas e dos componentes voláteis e alcoóis superiores da aguardente destilada

Análises	Valor encontrado	Valor máximo permitido*
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	<1,0	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	8,0	30
Furfural, em mg/100mL de álcool anidro	<1,1	5
Soma dos alcoóis isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100mL de álcool anidro	492	360
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	0,3	20
Carbamato de etila, em µg/L	860	150
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	<0,9	5
Álcool séc-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,05	10
Álcool n-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,2	3
Cádmio, em mg/L de álcool anidro	0,018	-
Chumbo, em mg/L de álcool anidro	1,790	200
Cobre, em mg/L de álcool anidro	ND	5

*D.O.U. – Seção 1 – Edição Número 124 de 30/06/2005: MAPA, Instrução Normativa nº 13 de 29/06/2005
 ND = não detectado

Analisando-se a Tabela 4.9, conclui-se que o valor encontrado para a soma dos alcoóis isobutílicos, isoamílicos e n-propílico (492 mg/100mL de álcool anidro), está acima dos valores permitidos (360 mg/100mL de álcool anidro) devido, provavelmente, à presença de nitrogênio (proteína) no fermentado em função da não retirada total das proteínas do soro de queijo pelo método ácido térmico, fato que pode ser confirmado na Tabela 4.2, que apresenta concentrações de proteínas de $0,33 \pm 0,16\%$ no soro de queijo desproteínizado que foi o substrato na fermentação alcoólica. BARCELOS *et al.* (2007) estudando teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha, notaram que todos os valores encontrados para alcoóis superiores estavam dentro dos padrões permitidos. DANTAS *et al.* (2008) avaliando, química e físico-quimicamente, as cachaças produzidas no Estado da Paraíba, verificaram que as 8 amostras analisadas estavam de acordo com os valores permitidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005 do MAPA, para alcoóis superiores; ROCHA *et al.* (2008) avaliando físico-quimicamente a aguardente do fruto da palma forrageira, notaram um valor acima do máximo permitido (371,62 mg/100mL de álcool anidro).

Para o carbamato de etila o valor encontrado (860 $\mu\text{g/L}$) também está acima do valor máximo permitido (150 $\mu\text{g/L}$), devido, provavelmente, ao mesmo fato do encontrado para a soma dos álcoois superiores, ou seja, em virtude da presença de nitrogênio (proteína) no fermentado, em função da não retirada total das proteínas do soro de queijo pelo método Ácido Térmico, o que pode ser confirmado na Tabela 4.2, que apresenta concentrações de proteínas de $0,33 \pm 0,16\%$ no soro de queijo desproteínizado, tratando-se substrato na fermentação alcoólica. A presença de nitrogênio na fermentação do mosto, oriundo de uma ineficiência no processo de remoção de proteínas do soro de queijo, torna-se um fato preocupante visto que o carbamato de etila é um composto cancerígeno. ANDRADE SOBRINHO *et al.* (2002) analisando carbamato de etila em bebidas alcoólicas observaram que das 126 amostras de cachaça analisadas, 21% obtiveram resultados acima do máximo permitido. BARCELOS *et al.* (2007) verificando teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha, constataram que as cachaças das duas primeiras regiões (30,78 e 54,70 $\mu\text{g/L}$) estão dentro do valor máximo permitido (150 $\mu\text{g/L}$); já as cachaças do Vale do Jequitinhonha estão muito acima do valor máximo permitido (645,18 $\mu\text{g/L}$). Observando-se uma relação interessante, a maior concentração de carbamato de etila foi encontrada nas cachaças com menor teor de cobre, como referido pelos mesmos autores.

Segundo ANDRADE SOBRINHO *et al.* (2002) na formação de carbamato de etila nas bebidas destiladas está envolvida, em geral, a reação entre o etanol e precursores nitrogenados; a formação dos álcoois superiores, segundo CLETO & MUTTON (2004) pode estar relacionada com o metabolismo do aminoácido leucina pela levedura, no processo fermentativo. Conforme SOTTIEZ (1977) o aminoácido leucina está presente na proteína do soro de queijo em média de 14,00g/100g de soro.

Para todos os outros componentes analisados os resultados estão abaixo dos valores máximos permitidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005, do MAPA.

Com o objetivo de diminuir a turbidez (cor esbranquiçada) existente da aguardente de soro de queijo destilada realizou-se uma bidestilação, não se obtendo, porém, o sucesso desejado, ou seja, a aguardente continuou com a turbidez (na mesma cor esbranquiçada) da aguardente destilada, razão pela qual se realizou uma tridestilação, com acompanhamento cinético, com resultados satisfatórios, isto é, a aguardente tridestilada ficou límpida. A Figura 4.18 mostra a cinética da tridestilação para a produção de aguardente de soro de queijo.

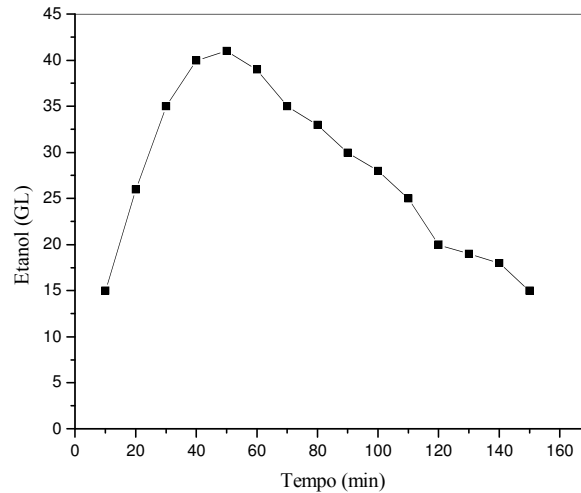


Figura 4.18 - Cinética da tridestilação para produção de aguardente de soro de queijo

Observa-se, na Figura 4.18, que os valores iniciais da tridestilação foram baixos, devido, talvez, à diluição resultante do processo de lavagem do alambique. A fração coração (aguardente) foi selecionada analisando-se os teores alcoólicos obtidos (acima de 39 °GL), e os pontos dos tempos 40, 50 e 60 min foram separados e chamados de aguardente tridestilada, a qual foi submetida à análise. Os valores coletados anteriores ao ponto de 40 min (teores alcoólicos abaixo de 39 °GL) foram considerados a fração cabeça e os valores coletados após o ponto de 60 min (teores alcoólicos acima de 41 °GL) foram considerados a fração cauda.

Na Tabela 4.10 se encontram os valores coletados do tridestilado com separação de frações cabeça, coração e cauda, de acordo com os valores obtidos na cinética.

Tabela 4.10 – Valores coletados do tridestilado com separação de frações cabeça, coração e cauda

	Cabeça	Coração (Aguardente - tridestilada)	Cauda
Teor alcoólico (°GL)	29	40	24,7

Analisando-se a Tabela 4.10, observa-se que houve uma diluição na fração cabeça (29°GL), quando o esperado é superior a 65°GL (MAIA & CAMPELO, 2006).

Os resultados das análises físico-químicas da aguardente tridestilada de soro de queijo estão relacionados a seguir na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Análises físico-químicas e dos componentes voláteis e álcoois superiores da aguardente tridestilada

Análises	Valor encontrado	Valor máximo permitido*
Ésteres totais, expressos em acetato de etila, em mg/100mL de álcool anidro	4,2	200
Aldeídos totais, em acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro	28	30
Furfural, em mg/100mL de álcool anidro	<1,1	5
Soma dos alcoóis isobutílicos, isoamílicos e n-propílico, em mg/100mL de álcool anidro	1078,0	360
Álcool metílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,5	20
Carbamato de etila, em µg/L	500	150
Acroleína, em mg/100mL de álcool anidro	<0,9	5
Álcool séc-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	<0,05	10
Álcool n-butílico, em mg/100mL de álcool anidro	2,0	3
Cádmio, em mg/L de álcool anidro	<0,018	-
Chumbo, em mg/L de álcool anidro	<1,790	200
Cobre, em mg/L de álcool anidro	ND	5

*D.O.U. – Seção 1 – Edição Número 124 de 30/06/2005: MAPA, Instrução Normativa nº 13 de 29/06/2005
 ND = não detectado

Como observado na aguardente destilada, na tridestilada também todos os componentes estão dentro dos valores máximos permitidos pela Instrução Normativa nº 13, de 29/06/2005, do MAPA, exceto o carbanato de etila e a soma dos álcoois superiores, em que o valor dos álcoois superiores aumentou 109,55% em relação ao valor encontrado no destilado (492 mg/100mL de álcool anidro), podendo ter ocorrido, com isto uma concentração desses componentes no processo de tridestilação; já o carbanato de etila sofreu uma diminuição de 41,86% do valor encontrado no destilado, com o que se constatou que não se tornou uma alternativa viável a tridestilação visto que ocorreu uma diminuição considerável para os valores de carbanato de etila embora não estando ainda dentro dos valores máximos permitidos; já para os álcoois superiores, houve um aumento considerável.

Considerando o teor de cobre na aguardente de soro de queijo destilada e na tridestilada, um dos principais contaminantes devido à utilização de destiladores de cobre, não foi detectada sua presença em nenhum dos procedimentos.

Analisando-se o teor de chumbo encontrado na aguardente destilada e na tridestilada, observa-se que o valor nas amostras analisadas (1,790 e <1,790 mg/L de álcool

anidro, respectivamente) está bem abaixo do máximo permitido pela legislação brasileira que é de 200 mg/L de álcool anidro.

O uso do soro de queijo é notoriamente promissor na produção de aguardente; mesmo assim, é oportuno um estudo mais detalhado para minimizar os componentes indesejáveis, como o carbamato de etila e a soma da concentração dos álcoois superiores.

5 – CONCLUSÕES

Avaliou-se, no presente trabalho, o aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática que, após a extração das proteínas, foi utilizado para o processo de fermentação alcoólica e posterior destilação para a produção de aguardente. Com os resultados deste estudo pode-se concluir que:

Quanto à caracterização do soro de queijo

- De acordo com a média do valor de pH encontrado no soro de queijo (6,34), ele é considerado tipo doce, possível de ser facilmente reaproveitado para várias formulações.
- O soro ainda é rico em proteínas e contém, em média, 35% das proteínas encontradas no leite, lactose de 4,25%, extrato seco total de 6,43% e sais minerais de 0,60%, significando tratar-se de um meio rico em nutrientes e com acidez média de 11 °D, sendo um valor de acidez baixo podendo ser facilmente utilizado na fermentação alcoólica.

Quanto à desproteínização do soro de queijo pelo método ácido térmico

- Na utilização do método ácido térmico ocorreu uma remoção de 73,60% das proteínas do soro de queijo comparadas com as do soro *in natura* focalizando, com isto, que o método é eficiente para a redução das proteínas.
- Embora em pequena proporção (15,29%), a lactose também foi reduzida pela utilização deste método, podendo ter ficado retida na proteína.
- A média do valor de pH (5,10), ainda esteve dentro do esperado visto que o soro ainda seria utilizado na fermentação alcoólica com variação de pH de 4,0–4,5.

Quanto à fermentação alcoólica

- O melhor percentual de conversão foi obtido ao se adicionar 130 g/L de sacarose e 1,8 g/L de inóculo, com valor de 76,14%.

Quanto à destilação do mosto fermentado de soro de queijo

- Excetuando-se o carbamato de etila e a soma dos álcoois superiores, a aguardente destilada de soro de queijo apresentou os outros parâmetros físico-químicos analisados abaixo do valor máximo permitido pela legislação brasileira.

- A quantidade de carbamato de etila e a soma de álcoois superiores foram devidas, provavelmente, à ineficiência na remoção da proteína do soro de queijo, que foi o meio utilizado para a fermentação alcoólica, pois a concentração de nitrogênio é precursora da produção dessas substâncias na fermentação alcoólica.

Quanto à conclusão geral do trabalho

- O soro de queijo apresenta-se como meio visivelmente promissor para a produção de aguardente, sendo necessário um estudo mais detalhado para minimizar os componentes indesejáveis, como o carbamato de etila e a soma da concentração dos álcoois superiores.

6 – PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da secagem da proteína do soro de queijo para utilização como suplemento alimentício.
- Estudo da fermentação acética do fermentado do soro de queijo para produção de vinagre.
- Estudar outros métodos mais eficientes para remoção das proteínas do soro de queijo buscando-se diminuir as concentrações de carbamato de etila e álcoois superiores no destilado, tornando a aguardente abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação brasileira.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. Leite e derivados – caracterização físico-química, qualidade e legislação. **Textos acadêmicos**. Universidade Federal de Lavras. Ed. Centro de editoração/FAEPE. 2005. 151p.

ANDRADE, J. S.; PANTOJA, L; MAEDA, R. N.. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes kunth*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, p.34-38. 2003.

ANDRADE SOBRINHO, L. G. de; BOSCOLO, M.; LIMA NETO, B. dos S.; FRANCO, D. W.. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1074-1077. 2002.

ANDRIETTA, S. R.; FERREIRA, E.; ANDRIETTA, M. da G. S. Avaliação da influência da velocidade de alimentação sobre o rendimento e produtividade dos processos de produção de etanol operando em batelada alimentada. In: SINAFERM. **Anais**. 2003.

ALBUQUERQUE, L. C. Queijos Industriais. **Ciência do Leite**. Disponível em:
<<http://www.cienciadoleite.com.br/queijosindustriais.htm>> Acesso em: 27 agosto 2006.

AQUARONE, E. Generalidades sobre bebidas alcoólicas. In: AQUARONE, E; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Engenharia Bioquímica**. Biotecnologia. v.5, São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda. 243p. 1983.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Engenharia Bioquímica**. Biotecnologia. 2.ed. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda. 300p. 1983.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Engenharia Bioquímica**. Biotecnologia. 1.ed. São Paulo. Ed. Edgard Blucher Ltda. 254p. 2001.

BARBOSA, H. R., TORRES, B. B.. **Microbiologia básica**. São Paulo. Ed. Atheneu, 216p. 1998.

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. das G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. dos. Análise de carbamato de etila e outros congêneres em cachaças de diferentes regiões de Minas Gerais. **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2006. Disponível em:
<<http://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T0210-2.pdf>>. Acesso em: 02 novembro 2008.

BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. das G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. dos. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: Zona da Mata, Sul de Minas e Vale do Jequitinhonha. **Química Nova**, v.30, n.4, p.1009-1011. 2007.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Editora da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, 299p. 1996.

BENEVIDES, S. A.; TELLES, F. J. S.. Características microbiológicas de armazenamento e de embalagem de queijo de “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza – CE. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p. 44-47. 2002

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 15 ed., São Paulo. Ed. Nobel. 320p. 1991.

BORTOLINI, F.; SANT’ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); comportamento dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, n.21, v.2, p.236-243. 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa da Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e ingredientes: métodos físico-químicos**. 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa da Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e ingredientes: métodos físico-químicos**. 2006.

BRASIL, Ministério da fazenda. Receita federal. **Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997**. Disponível em:
<<http://www.receita.fazenda.gov.br/Legislacao/Decretos/Ant2001/Ant1999/Dec231497.htm>> Acesso em: 30 out 2007.

BRASIL, Ministério da fazenda. Receita federal. **Decreto nº 4.851, de 02 de outubro de**

2003.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Decreto n. 2.314 de 04 de setembro de 1997.

BURRINGTON, K. J. Ingredientes para uma alimentação saudável. **Revista Leite e Derivados**. 8º catálogo brasileiro de produtos e serviços, p.10-21. 2000.

CAPITANE, C. D.; PACHECO, M. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHMIDT, F. L.. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, v.40, n.11, p.1123-1128. 2005.

CARDOSO, M. G. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 264p. 2001.

CARMINATTI, C. A.; **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Florianópolis. 2001. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

CARVALHO, J. C. M., SATO, S.; Fermentação descontínua. In: ADUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v. 2, 1 ed. Editora Edgard Blucher LTDA. São Paulo, 541p. 2001.

CAVALCANTI, C. Cachaça da Paraíba ganha mercado e safra cresce 20%. Jornal A União. 08 de fev. de 2007. Disponível em: http://www.auniao.pb.gov.br/v2/index.php?option=com_content&task=view&id=5330&Itemid=44. Acesso em: 20 out. 2008.

CLETO, F.V.G.; MUTON, M. J. R. Rendimento e composição das aguardentes de cana, laranja e uva com a utilização de lecitina no processo fermentativo. **Artigo: Ciência Agrotec.**, Lavras, v.28, n.3 p.578-584. 2004.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J.. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, v.24, n.4, p.449-452. 2001.

COSTA, R. C.; **Obtenção da lactose a partir de permeado de soro e queijo e permeado de leite**. Campinas. 1995. 75p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – UNICAMP.

COUTINHO, E. P. Aspectos da evolução do mercado da cachaça. **XXIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. Ouro Preto, MG. 2003. Disponível em: <http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGETP2003_TR0111_0600.pdf>. Acessado em: 02 novembro 2008.

CRISPIM, J. E.. **Manual da produção de aguardente de qualidade**. Ed. Livraria e editora agropecuária. 336p. 2000.

DANTAS, H. J.; VILAR, F. de A.; SILVA, F. L. H. da; SILVA, A. S. Avaliação da influência da velocidade de destilação na análise físico-química da aguardente de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, PB, v.9, n.2. p.101-109. 2007. Disponível em: <<http://www.deag.ufcg.edu.br/sbpa/rev92/art921.pdf>>. Acesso em: 02 novembro 2008.

DANTAS, H. J.; SILVA, F. L. H.; LIMA, E. E.; SILVA, A. S.; DANTAS, H. J.. Avaliação química e físico-química de cachaças produzidas no estado da Paraíba. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 17, 2008, Recife, PE. Anais... Recife: Mar Hotel, 2008. 1 CD-ROM.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo. Centro de Engenharia Biológica – IBQF, **Universidade do Minho**. Braga – Portugal. 1999. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3671/1/CNQA-C15-30%5B2%5D.PDF>>. Acessada em: 08 de setembro de 2008.

DUMAIS, R. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza Ed. Acribia, S.A., p. 249-296. 1991.

FLORÊNCIO, I. M.; ALVES, R. M.; RIBEIRO FILHO, N. M.; ARAÚJO, M. S.; SILVA, R. A. S.; ARAÚJO, A. dos S.; FLORENTINO, E. R.. Caracterização do soro de queijo “Tipo Coalho” proveniente de queijeiras artesanais da zona rural da cidade de Montadas – PB. In: **I Congresso Norte-Nordeste de Química**. Anais. Natal, RN. 2007.

FLORÊNCIO, I. M.; NUNES, L. de S.; RIBEIRO FILHO, N. M.; SILVA, R. A. dos S.; ARAÚJO, M. de S.; FLORENTINO, E. R. Remoção das proteínas do lactosoro utilizando o método ácido térmico. In: **II Congresso Norte-Nordeste de Química**. Anais. João Pessoa, PB. 2008a.

FLORÊNCIO, I. M.; RIBEIRO FILHO, N. M.; ROCHA, A. S.; SILVA, F. L. H. da; FLORENTINO, E.R.. Produção de aguardente a partir do caldo do sorgo sacarino

[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 17, 2008, Recife, PE. Anais... Recife: Mar Hotel, 2008b. 1 CD-ROM.

FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.43-48. 1999.

FLORENTINO, E. R. **Aproveitamento do soro de queijo de coagulação enzimática**. Natal. 2006. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – UFRN.

FURTADO, M. M. A arte e a ciência do queijo – 2º Edição, Editora Globo, São Paulo, SP. 1991.

GIROTO. J. M.; PAWLOWSKY U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n.10, p.43-46. 2001. Disponível em: <<http://www.brasilalimentos.com.br/BA/pdf/10/10%20-%20Laticinios.pdf>> Acesso em: 07 set. 2007.

GRANDI, J. G. Leite Fermentado, manteiga e queijo. In: AQUARONE, E. (Coord.) **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo. Editora Edgar Blucher Ltda., v.5, 243p. 1983.

LEMAN, J.; KINSELLA, J. E. Surface activity, fil formation and emulsifying properties of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.28, n.2, p.115-138. 1989.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed Edgard Blucher, v. 3. , p. 1-43. 2000.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. SEBRAE MG. SINDBEBIDAS. 129p. 2005.

MARQUES, S. C.; VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; ABREU, L. R. Tanques de resfriamento de leite: processo de higienização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes-Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, MG: Epamig, v.62, n.357, p.496-501. 2007.

MING, P. Propriedades nutricionais das proteínas de soro de leite. **Revista leite e Derivados**, v.9, n.52, p.64-68. 2000.

MORA, C. V. Effect of heting and elevated temperature storage on cheese whey. **Journal of Food Science**, v.55, n.4, p.1177-1179. 1990.

MOUCHREK FILHO, V. E.; NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK FILHO, J. E.; SANTOS, A. A.; GALVÃO, J. M. N.; ARAÚJO, M. A. M.; FERRAZ, L. R.F.. Produção e avaliação da qualidade da aguardente de abacaxi (*Ananás comosus* L., Merrill). **Higiene Alimentar**, v.20, n.139, p.54 – 60. 2006.

NASSU, R. T.; BORGES, M. F.; LIMA, J.R. Avaliação microscópica de queijo de coalho, queijo de manteiga e manteiga da terra produzidos nos estados do ceará e rio grande do norte. **Revista Higiene Alimentar**, v.16. n.99, p.57-60, 2002.

NOVAES, F. V. Processos fermentativos. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A.; **Aguardente de cana: produção e qualidade**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1992. p.37-42.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. São Paulo. Editora Makron Books. 2º Ed. v. 1. 524p. 1996.

PEREIRA, N. E.; CARDOSO, M. das G.; AZEVEDO, S. M. de; MORAIS, A. R. de; FERNANDES, W.; AGUIAR, P. M.. Compostos secundários em cachaças produzidas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.27. n.5. p.1068-1075. set/out 2003. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/27_5/art14.PDF>. Acesso em: 02 novembro 2008.

RAPACCI, M.; VAN DENDER, A. G. F. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requijão cremoso obtido por fermentação láctea e acidificação direta**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

RIBEIRO, J. C. G. M. **Fabricação artesanal de cachaça mineira**. Belo Horizonte. Perform, 1997. 72p.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. **Indústria de laticínios**. p.67-69, 1997.

RICHARDS, N. S. P. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Revista Food Ingredients**, n.17, p.20-24, 2002.

ROCHA, A. S.; SILVA, F. L. H. da; BARACHO, T. H. A.; SILVA, C. G. da; CANUTO, M. F. C. S. Avaliação físico-química da aguardente do fruto da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* MILL). In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 17, 2008, Recife, PE. **Anais...** Recife: Mar Hotel, 2008. 1 CD-ROM.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.. Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. 1 ed. Editora Casa do Pão. Campinas; SP. 326 p. 2005.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios**, v.56, n.321, p.44-50, 2001.

SHAHID, F.; ARACHCHI, J. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Food Science & Technology**, v.10 n. 2 p.37-51, 1999.

SILVA, C. A.; HERMAN-GOMEZ, R. C. Qualidade protéica do soro de leite fermentado pela levedura *Kluyveromyces fragilis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.515-520, 2000.

SILVA, C. G.; CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; BRAGA, M. E. D.; QUEIROZ, V. de S.. Extração e fermentação do caldo de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para obtenção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, PB, v.5, n.1, p.51-56, 2003.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Atrius** – Artigos para Download p.1-8, 2004.

SILVA, M. E.; TORRES NETO, A. B.; SILVA, W. B.; SILVA, F. L. H. da; SWARNAKAR, R.. Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.24, n.2, p.163-169. 2007.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2/3, p.111-119, 2004.

SIQUEIRA, I. M. C. S. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de quarto tipos de soro de queijo**. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, UFMG, n. 37, p. 31-35, 2000.

SIQUEIRA, I. M. C. S. Importância e utilização dos derivados de soro de queijo. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.37, p.31-35, 2002.

SOTTIEZ, P. Subprodutos derivados de la elaboration de los quesos. In: LUQUET, F. M.; **Leche y productos lacteos: Vaca, oveja, cabra**. Zaragoza: Ed. Acribia, v.2, p.287-317, 1977.

SOTTIEZ, P. Produtos derivados das Fabricações Queijeiras. p.397-436. In: LOUQUET, F. M. **O leite**. Portugal: 2º vol. Coleção Euroagro. Publicações Europa-américa, 1985.

SOUZA, K. M.; ANDRADE, A. C.; ARAÚJO, E. H. Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae*. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. **Anais**. 2006.

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H.da. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**. v.29, n.3, p. 489-492. 2006.

TRIBOLI, E. P. D. R.. Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica. 1989. 52f. **Apostila – Laboratório de Engenharia Bioquímica e de Alimentos**, Escola de Engenharia de Mauá, Instituto Mauá de tecnologia, São Caetano do Sul.

USDEC – U. S. DAIRY EXPORT COUNCIL. Ingredientes lácteos para uma alimentação saudável. **USDEC News**, v.2, n.4, p.1-3, 2000.

VENTURINI FILHO, W. G.. Aguardente. **Tecnologia de bebidas**. 1º Edição. Ed. Edgard Blucher. São Paulo. 2005. p. 485 – 524.

VILELA, F. J.; CARDOSO, M. das G.; MASSON, J.; ANJOS, J. P. dos. Determinação das composições físico-químicas de cachaças do sul de Minas Gerais e suas misturas. **Ciência Agrotecnologia**. Lavras. v. 31.n.4. p.1089-1094. 2007.