



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

QUÍMICA - LICENCIATURA

**UTILIZAÇÃO DO LACTOSSORO BOVINO COMO SUBSTRATO NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

GUILHERME PAVÃO GOMES

Foz do Iguaçu
2023

**UTILIZAÇÃO DO LACTOSSORO BOVINO COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

GUILHERME PAVÃO GOMES

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza (ILACVN) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Química.

Orientadora: Prof. Dr^a. Márcia Regina Becker

Foz do Iguaçu
2023

GUILHERME PAVÃO GOMES

**UTILIZAÇÃO DO LACTOSSORO BOVINO COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e Natureza (ILACVN) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dr^a. Márcia Regina Becker
UNILA

Prof. Dr^a. Marcela Boroski
UNILA

Prof. Dr^a. Paula Andrea Jaramillo Araujo
UNILA

Foz do Iguaçu, 31 de outubro de 2023.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor: Guilherme Pavão Gomes

Curso: Química Licenciatura Tipo de Documento	
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
(.....) tese	
(.....) CD/DVD – obras audiovisuais	
(.....)	

Título do trabalho acadêmico: UTILIZAÇÃO DO LACTOSSORO BOVINO COMO SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Nome do orientador(a): Prof. Dra. Márcia Regina Becker

Data da Defesa: 31/10/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

- Declaro que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declaro também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.
- Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declaro que obtive autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declaro que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, a Jesus, ao Arcanjo Miguel e a todos os seres de luz que me guardam e me protegem, tenho absoluta ciência que se não fosse pelo auxílio e amparo de vocês, este curso de graduação não seria finalizado.

A minha família, pelo apoio e amor incondicionais. Advindos de meu pai, Genésio Domiciano Gomes Júnior e minhas mães, Cristiani Pavão Gomes e Sandreani Lopes Gomes, minha mãe do coração que me apoia e ama desde a infância. Agradeço também aos meus irmãos Vinicius Lopes Domiciano Gomes e Gustavo Pavão Gomes, pelo companheirismo e apoio total.

A minha orientadora Márcia Regina Becker, pela total atenção, empenho e paciência para comigo durante o desenvolvimento e realização desta pesquisa.

As minhas melhores amigas, Franciele Natividade e Elizabeth Roberts que em tempos de crise se fizeram presentes em todos eles, que se tornaram família, irmãs que a vida me deu. Que me deram força e não me deixaram desistir nos momentos difíceis. A vocês, todo meu amor e carinho.

Aos amigos que a graduação me trouxe, Emilene de Carvalho Lourenço, Sabrina Kerkhoff, Aline Chechi da Silva e João Victor de Oliveira Campaner. A vocês, gratidão por todos os momentos felizes, de estudo e companheirismo, vocês fazem parte desta conquista! As amigas que o destino se encarregou de trazer, Sara Caroline e Thainá Cristina.

Ao Centro Estadual de Educação Profissional Manoel Moreira (Colégio Agrícola). Em especial ao James, servidor público do colégio que me forneceu lactossoro no decorrer desses 2 meses.

Ao Núcleo de Análises Físico-Químicas LTDA, por me permitir realizar análises da presente pesquisa em seus laboratórios. Aos técnicos de laboratório da UNILA, Eleandro Miguel da Silva e Paula Regina dos Santos, pelo empenho em tornar possível a realização desta pesquisa nos laboratórios de ensino.

A todos vocês, o meu eterno sentimento de gratidão!

Termino esta seção com o bordão que regeu o meu ano de 2023:

“E é isso, um beijo da Anitta”.

RESUMO

O lactossoro bovino, um subproduto da produção de queijos, possui alto teor de proteínas, minerais e lactose (glicídio redutor). No entanto, seu descarte inadequado impõe desafios ambientais devido à alta demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e ao significativo consumo de água em detrimento de seu descarte. A indústria de laticínios gera grandes volumes desse resíduo, causando impactos ambientais negativos quando este não é tratado de maneira adequada. Para mitigar essa questão, medidas incluem a valorização do lactossoro visando o aproveitamento de seus componentes, culminando no tratamento de efluentes e o uso na produção de energia. Essas abordagens visam a redução do impacto ambiental e a promoção da sustentabilidade na indústria de laticínios. O presente trabalho avaliou o potencial de produção de etanol a partir do resíduo de queijo minas frescal, lactossoro bovino, por meio da fermentação alcoólica de seus glicídios, previamente tratados com a enzima lactase. Para tal, se estabeleceu o controle de vários parâmetros, como monitoramento do pH do lactossoro *in natura*, além de determinar a concentração de açúcares redutores presentes no lactossoro, avaliar o consumo de açúcares durante todo o processo de fermentação pelo método de Lane-Eynon. Evidenciando o consumo total de glicídios redutores após os ciclos de fermentação. Os parâmetros avaliados foram a concentração de lactase utilizada e a concentração de levedura. Tendo como resultado, as melhores condições: concentração de 2,0007 g de fermento biológico *Saccharomyces cerevisiae*, 0,5 mL de lactase (5000 FCC ALU), a temperatura e tempo fixos de 30°C e 24 horas. Estas condições proporcionaram uma concentração máxima de 6% (v/v) de etanol.

Palavras-chave: lactossoro; fermentação; etanol; lactase; *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

El suero de leche bovino, un subproducto de la producción de quesos, tiene un alto contenido de proteínas, minerales y lactosa (un carbohidrato reductor). Sin embargo, su eliminación inadecuada plantea desafíos ambientales debido a la alta demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), así como al significativo consumo de agua en lugar de su desecho. La industria láctea genera grandes volúmenes de este residuo, lo que causa impactos ambientales negativos cuando no se trata adecuadamente. Para mitigar este problema, se han implementado medidas que incluyen la valorización del suero de leche con el objetivo de aprovechar sus componentes, lo que resulta en el tratamiento de efluentes y su uso en la producción de energía. Estos enfoques buscan reducir el impacto ambiental y promover la sostenibilidad en la industria láctea. Este trabajo evaluó el potencial de producción de etanol a partir del residuo de queso Minas fresco, suero de leche bovino, a través de la fermentación alcohólica de sus carbohidratos, previamente tratados con la enzima lactasa. Para ello, se controlaron varios parámetros, como el monitoreo del pH del suero de leche en su estado natural, además de determinar la concentración de azúcares reductores presentes en el suero de leche y evaluar el consumo de azúcares durante todo el proceso de fermentación mediante el método de Lane-Eynon. Se evidenció el consumo total de carbohidratos reductores después de los ciclos de fermentación. Los parámetros evaluados incluyeron la concentración de lactasa utilizada y la concentración de levadura. Como resultado, las mejores condiciones fueron una concentración de 2,0007 g de levadura biológica *Saccharomyces cerevisiae*, 0,5 mL de lactasa (5000 FCC ALU), con una temperatura y tiempo fijos de 30°C y 24 horas. Estas condiciones proporcionaron una concentración máxima de etanol del 6% (v/v).

Palabras clave: suero de leche; fermentación; etanol; lactase; *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Bovine whey, a byproduct of cheese production, has a high content of proteins, minerals, and lactose (a reducing carbohydrate). However, its improper disposal poses environmental challenges due to the high chemical oxygen demand (COD) and biochemical oxygen demand (BOD) as well as significant water consumption in lieu of its disposal. The dairy industry generates large volumes of this waste, causing negative environmental impacts when not adequately treated. To mitigate this issue, measures include valorizing whey to utilize its components, resulting in effluent treatment and its use in energy production. These approaches aim to reduce environmental impact and promote sustainability in the dairy industry. This study assessed the potential for ethanol production from the whey residue of Minas frescal cheese, bovine whey, through alcoholic fermentation of its carbohydrates, previously treated with the enzyme lactase. For this, various parameters were controlled, such as monitoring the pH of raw whey, determining the concentration of reducing sugars present in whey, and assessing sugar consumption throughout the fermentation process using the Lane-Eynon method. The total consumption of reducing carbohydrates was evident after fermentation cycles. The evaluated parameters included the concentration of lactase used and yeast concentration. The best conditions yielded a concentration of 2.0007 g of *Saccharomyces cerevisiae* yeast, 0.5 mL of lactase (5000 FCC ALU), with fixed temperature and time of 30°C and 24 hours. These conditions provided a maximum ethanol concentration of 6% (v/v).

Key words: whey; fermentation; ethanol; lactase; *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ranking dos estados com maior produção de leite em 2020.....	17
Figura 2 – Processo de fabricação do queijo minas frescal padrão	19
Figura 3 – Processo de hidrólise da sacarose	22
Figura 4 – Processo da conversão da glicose	23
Figura 5 – Estrutura química da lactose.....	24
Figura 6 – Hidrólise da lactose através da enzima β -galactosidase	25
Figura 7 – Delineamento do estudo de avaliação da concentração de etanol obtido a partir da fermentação alcoólica do lactossoro.....	27
Figura 8 - Fotografia dos reatores de fermentação.....	28
Figura 9 – Fotografia do frasco contendo lactossoro para análise.....	29
Figura 10 – Fotografia da amostra durante a titulação pelo método Lane-Eynon...	31
Figura 11 – Fotografia das amostras depois e antes da clarificação.	35
Figura 12 – Fotografia do refratômetro de etanol.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ALU	Lactase Activity Unit
AR	Açúcares Redutores
ATP	Adenosina trifosfato
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CIBiogás	Centro Internacional de Energias Renováveis
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FCC	Food Chemical Codex
GR	Glicídios redutores
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MRC	Material de referência certificado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	Potencial Hidrogeniônico
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 O LEITE, PRODUÇÃO E CONSUMO NO BRASIL	17
2.2 LACTOSSORO	18
2.2.1 Processo de obtenção	18
2.2.2 Problemática ambiental	20
2.3 ETANOL.....	21
2.3.1 Fermentação alcoólica.....	22
2.3.2 Fermentação alcoólica do lactossoro.....	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 METODOLOGIA.....	28
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	28
4.2 LOCAL DE COLETA E ESTUDO	29
4.3 CONFECÇÃO DOS REATORES.....	29
4.4 COLETA E AMOSTRAGEM DO LACTOSSORO	30
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	30
4.4.1 pH	30
4.4.2 Glicídios redutores em lactose.....	31
4.5 TRATAMENTOS E FERMENTAÇÃO DO LACTOSSORO	33
4.5.1 Hidrólise da lactose no lactossoro	33
4.5.2 Correção do pH do sistema	34
4.5.3 Ciclo de fermentação	34
4.5.4 Clarificação das amostras após fermentação	36
4.5.4 Determinação da concentração de etanol	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 ANÁLISE DE PH DO LACTOSSORO IN NATURA	38
5.1 GLICÍDIOS REDUTORES EM LACTOSE NO LACTOSSORO IN NATURA ..	38
5.2 GLICÍDIOS REDUTORES EM GLICOSE NO FERMENTADO	39
5.3 DETERMINAÇÃO DE ETANOL NOS FERMENTADOS	41
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O leite é reconhecido como uma das principais commodities agropecuárias globais, sendo consumido diariamente por bilhões de pessoas em todo o mundo, em uma variedade de produtos. Sua relevância se estende não apenas à esfera econômica, como uma fonte significativa de renda e subsistência para uma considerável parcela da população mundial, mas também como uma fonte essencial de nutrição para a saúde (EMBRAPA, 2019).

A produção de leite no Brasil no ano de 2020 totalizou o volume de 35,5 bilhões de litros, sendo o estado do Paraná, o segundo maior produtor do país, responsável por 13,09% da produção total (EMBRAPA, 2022).

O queijo é um produto derivado do leite, podendo ser encontrado tanto na forma fresca quanto maturada. Ele é obtido através da separação parcial do soro do leite, ou do leite reconstituído (seja integral, parcialmente desnatado ou completamente desnatado), assim como de soros lácteos. Sua formação ocorre devido à coagulação do leite por meio de diferentes agentes, como o coalho, enzimas específicas, bactérias apropriadas, ácidos orgânicos isolados ou em combinação, todos com qualidade adequada para consumo (MAPA, 1996).

Os queijos representam grande parte do mercado nacional de lácteos, se tornando o principal produto do leite, consistindo, aproximadamente 36% da produção (ABIQ, 2022). Desse modo, se estima que a produção de queijo no Brasil para o ano de 2020, tenha consumido cerca de 12,7 bilhões litros de leite.

No que tange a obtenção desse produto, aproximadamente 85% a 90% do volume de leite utilizado no processo de fabricação de queijo culmina na geração de soro (lactossoro), o qual contém aproximadamente a metade dos constituintes sólidos do leite, abrangendo proteínas, minerais, vitaminas e, notoriamente, a lactose (Sabioni et al., 2016).

Um fator preocupante que permeia toda a cadeia produtiva leiteira, é o potencial poluente do soro de leite. Sob uma perspectiva ambiental, seu descarte representa um desafio, uma vez que, devido à sua riqueza em nutrientes, resulta em uma significativa demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) quando descarregado em efluentes (Sabioni et al., 2016).

Ainda sobre seu caráter poluente, a indústria de laticínios possui consumo substancial de água e considerável produção de efluentes por unidade de produção. Na qual, atividades de limpeza e demais processos resultam na geração de um volume

considerável de resíduos com uma carga orgânica significativa, advinda do leite e seus derivados (Rohlfes et. al, 2011).

Atualmente existem inúmeras pesquisas acerca do reaproveitamento do soro de leite e a indústria alimentícia segue a frente e já inicia o reaproveitamento do soro de leite na própria indústria de queijos, onde o leite, ao passar pela coalha enzimática, dá origem ao soro doce, com alto teor de proteínas. Este resíduo, por sua vez, passa por outro processo de coalha, realizada por ácidos orgânicos, em sua maior parte, ácido cítrico, acrescido de solução de cloreto de sódio, de onde é obtida a coalhada, resultando no permeado de soro de leite, um resíduo menos carregado (EMBRAPA, 2022).

Em sinergia com a indústria de alimentos, o setor de energias renováveis também volta seus olhos para os resíduos lácteos, avaliando seu potencial de produção de energia. É crescente o número de produtores rurais que têm implantado plantas de biogás de pequeno porte, em que o lactossoro é utilizado como substrato líquido, acrescido de outros efluentes, como dejetos da suinocultura, aviários e bovinos (CIBiogás, 2023).

Outra matriz energética a ser explorada, é a alcooleira, haja vista que, o soro de leite é rico em açúcares especialmente em lactose, perfazendo uma concentração de 2 a 5%. Desse modo, objetiva-se, por meio deste trabalho, caracterizar o lactossoro bovino produzido pela Agroindústria do Colégio Agrícola de Foz do Iguaçu, em termos de glicídios redutores (G.R), e submetê-lo a fermentação anaeróbia fazendo uso da *Saccharomyces cerevisiae*, para posterior avaliação dos açúcares consumidos e concentração de etanol obtido. Para tal, serão avaliados e controlados parâmetros de concentração de inóculo (fermento biológico), adição de enzima lactase, temperatura e pH, visando evidenciar as melhores condições no processo.

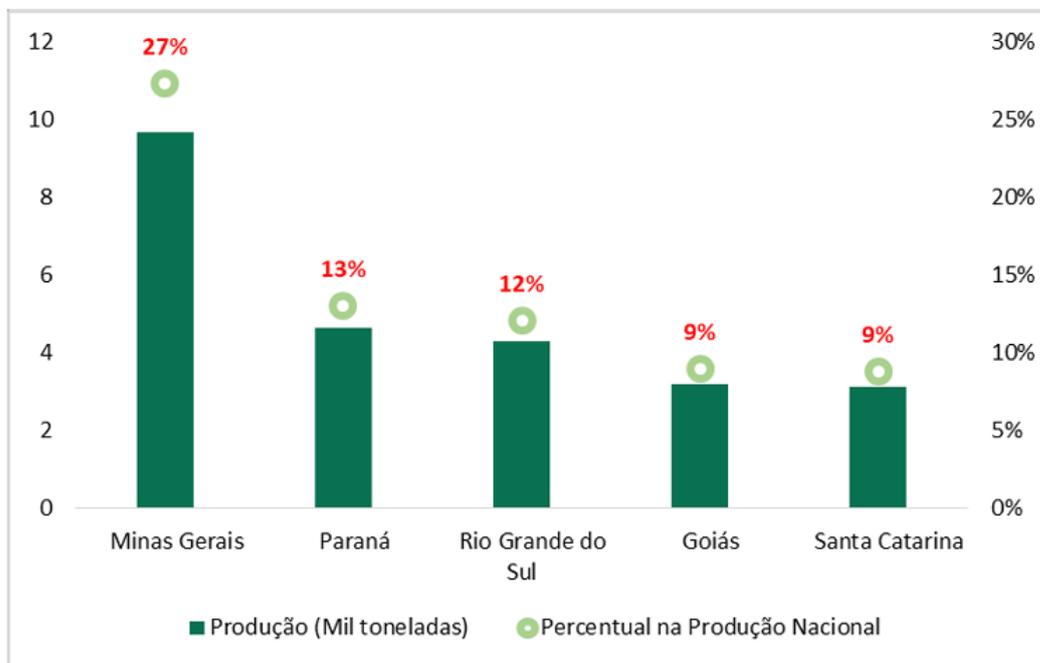
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O LEITE, PRODUÇÃO E CONSUMO NO BRASIL.

É definido como leite, o produto advindo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (MAPA, 2011). Trata-se de uma substância secretada pelas glândulas mamárias e é conhecido por ser um alimento altamente nutritivo, contendo vários componentes essenciais para o desenvolvimento de mamíferos.

No ano de 2020, a produção de leite no Brasil atingiu um total de 35,44 bilhões de litros, representando um aumento de 1,72% em comparação com 2019. Esse crescimento é notável, especialmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Santa Catarina (CNA-IBGE, 2020), conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1 – Ranking dos estados com maior produção de leite em 2020



Fonte: CNA-IBGE, 2020.

Se estendendo aos outros estados do Brasil, é notável a heterogeneidade na produção de leite do país, evidenciando a necessidade de tecnificação, melhoria no manejo e gestão. A análise dos números é uma ferramenta que contribui para uma abordagem territorial mais adequada (EMBRAPA, 2022).

A média mundial de consumo de leite é de 116,5 kg de leite per capita ao ano e essa taxa tem aumentado cerca de 1,2% em intervalos de um ano. No Brasil, a indústria de laticínios ocupa a segunda posição em importância dentro da indústria de alimentos. Em 2018, o consumo aparente per capita no Brasil foi de 166,4 litros por habitante, um valor que, embora ainda esteja abaixo do consumo observado em países desenvolvidos (que varia de cerca de 250 a 300 litros), representa um aumento significativo em comparação com o total consumido duas décadas atrás (EMBRAPA, 2019).

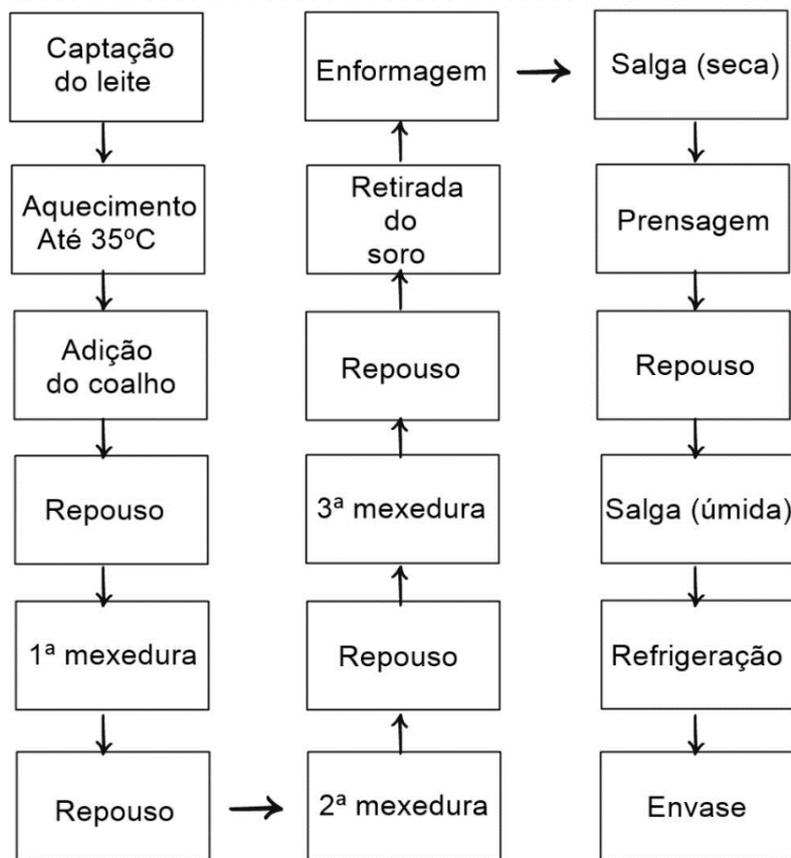
2.2 LACTOSSORO

O lactossoro ou soro de leite, é um coproduto da indústria de laticínios que representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijo ou da caseína. Apresenta-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (Alves et al., 2014; Guimarães et al., 2010; Giraldo-Zuñiga et al., 2004).

2.2.1 Processo de obtenção

O processo de obtenção do lactossoro é descrito pelo procedimento operacional padrão (POP) do queijo minas frescal padrão ou minas curado, implementado na Agroindústria do Centro Estadual de Educação Profissional Manoel Moreira (Colégio Agrícola de Foz do Iguaçu). POP este, que segue a Instrução Normativa nº 66, de 21 de julho de 2020 que define queijo minas padrão como o produto obtido por coagulação do leite, por meio de coalho, outras enzimas coagulantes apropriadas, ou com ambos, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas (MAPA, 2020). As etapas da fabricação dos queijos são descritas na Figura 2:

Figura 2 – Processo de fabricação do queijo minas frescal padrão



Fonte: O autor, 2023.

2.2.1.1 Lactossoro Doce

O lactossoro é derivado do processamento do queijo, onde a caseína se torna insolúvel ao atingir ponto isoelétrico pela ação enzimática da quimosina, presente no coalho, resultando em um líquido residual conhecido como soro doce. Alternativamente, pode ser produzido por meio de precipitação ácida, sendo denominado soro ácido. É importante observar que os soros obtidos por esses dois métodos distintos apresentam composições distintas. (Gusso, 2013; Pelegrine; Carrasqueira, 2008).

O lactossoro apresenta características que podem variar de acordo com alguns fatores, como, o processo de fabricação e a fonte do leite utilizado, que pode ser bovino, caprino e ovino. Em muitos casos, o volume de soro gerado pode corresponder a até 90% do volume de leite que é inicialmente utilizado no processo de fabricação de queijos e produtos similares (Soares; Vendramel; Souza, 2021). O soro possui uma composição rica em água, lactose, proteínas e minerais expressos na tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios de pH e composição do lactossoro doce.

Parâmetros	Valor médio
pH	6,5
Sólidos totais (%)	6,4
Proteínas (%)	0,8
Gordura (%)	0,50
Lactose (%)	2,0 a 5,0
Cinzas (%)	0,50
Ácido láctico (%)	0,05
Fósforo (%)	0,04
Cálcio (%)	0,05
Sódio (%)	0,15
Cloretos (%)	0,05
Potássio (%)	0,22

Fonte: Adaptado de Soares; Vendramel; Souza, 2021

A atividade humana, especialmente sua alimentação, impacta diretamente o meio ambiente, tanto na produção dos alimentos, na utilização excessiva de defensivos agrícolas, na destruição de habitats naturais para plantio ou atividade pecuária quanto no descarte de seus resíduos (Rohlfes et. al, 2011).

2.2.2 Problemática ambiental

Considera-se impacto ambiental qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam: I - a saúde, a segurança e o bem-estar da população; II - as atividades sociais e econômicas; III - a biota; IV - as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; V - a qualidade dos recursos ambientais (CONAMA, 1986).

Se estima que cerca 40% do soro de leite produzido no Brasil é descartado sem tratamento adequado, causando sérios impactos ambientais, devido a quantidades significativas de matéria orgânica em sua composição. Sendo válido ressaltar o seu alto valor de DQO, que possui um valor médio de 136.170,0 mgO₂.L⁻¹ (Leifeld; Marques, 2013).

De acordo com informações da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos, a produção anual de queijos no Brasil tem se mantido em torno de 540.000 toneladas por ano. Isso equivale à geração de aproximadamente 5,4 milhões de toneladas de soro de leite. Nesse contexto, a produção de bebidas lácteas e suplementos alimentares emergem como uma das principais alternativas aproveitamento do soro de leite (Rohlfes et. al, 2011).

2.3 ETANOL

Produto da fermentação de açúcares realizada por microrganismos, o etanol ou álcool etílico (nome comercial) dispõe de suma importância no mercado nacional e mundial. Essa substância desperta de modo crescente a atenção de pesquisadores, empresas e governos. Isso decorre das pressões de preços e perspectivas de esgotamento das fontes não-renováveis de combustíveis fósseis, assim como de preocupações de natureza ambiental, relacionadas à emissão de resíduos que comprometem o meio ambiente (BNDES, 2007).

Amplamente utilizado na indústria, esse composto orgânico se tornou indispensável na economia brasileira. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos, que, diferente da produção nacional, faz uso dos grãos de milho para obtenção de álcool, o que em termos de rendimento, se comparado a cana-de-açúcar, é menos eficiente, produzindo uma quantidade menor de etanol estimada em um terço (BNDES, 2007).

O mercado predominante para o etanol brasileiro ainda é o mercado interno. Mesmo com a crescente preocupação ambiental, não se espera um aumento substancial na demanda global por etanol. Pelo contrário, a tendência é de que os investimentos em veículos elétricos se intensifiquem. Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores mundiais de etanol, é provável que as importações brasileiras desse combustível aumentem a partir 2022 devido à eliminação das tarifas de importação (Vidal, 2022). A partir desse viés, se prevê o crescente aumento da indústria produtora de álcool e por sua vez, vê-se a necessidade de novas fontes para obtenção desse combustível.

2.3.1 Fermentação alcoólica

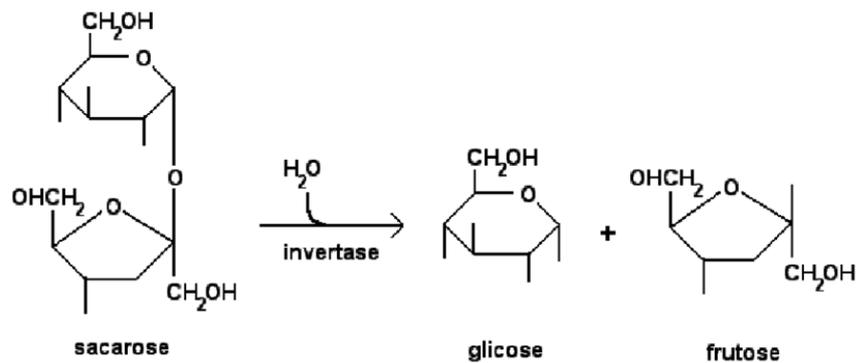
A fermentação alcoólica é um processo que ocorre dentro de microrganismos que têm a capacidade de transformar açúcares assimiláveis (um substrato oxidado) em etanol (um substrato reduzido). Isso acontece por meio de uma sequência de reações bioquímicas que são reguladas por enzimas. Durante esse processo, ocorre uma oxidação parcial do substrato, resultando na formação de um composto orgânico reduzido, tornando propícia a manutenção celular das leveduras (Cinelli, 2012).

Este processo é executado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, tendo como objetivo a produção de energia, na forma de ATP, que será empregada nas funções fisiológicas e ainda para o crescimento e reprodução do microrganismo. O álcool etílico produzido constitui somente um subproduto de excreção desse processo, entretanto, age como inibidor de micro-organismos competidores (Góes-Favoni et al.,2018).

Frequentemente, se utilizam micro-organismos do gênero *Saccharomyces*. Essas leveduras são micro-organismos facultativos, o que significa que podem realizar tanto a respiração através do metabolismo aeróbico, convertendo açúcares em água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2), quanto o metabolismo anaeróbico na ausência de oxigênio, resultando na produção de etanol (C_2H_6O), dióxido de carbono (CO_2), adenosina trifosfato (ATP) e calor. Além disso, durante o processo, podem ser gerados subprodutos, como ácidos orgânicos e glicerol (Góes-Favoni et al.,2018; Venturini-Filho, 2010).

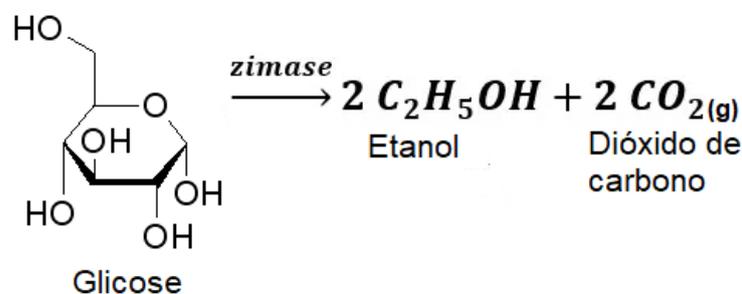
Durante o processo de fermentação existem dois subprocessos. Sabe-se que *Saccharomyces cerevisiae* (SC) dispõem de duas enzimas, a invertase e a zimase. Quando na presença de dissacarídeos como a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), açúcar encontrado em alta concentração no mosto da cana-de-açúcar, a invertase realiza a hidrólise da sacarose em glicose e frutose. A zimase por sua vez, permite que a *Saccharomyces cerevisiae* degrade os monossacarídeos os convertendo em etanol e dióxido de carbono (Cinelli, 2012). As reações estão representadas de forma reduzida nas Figuras 3 e 4.

Figura 3: Processo de hidrólise da sacarose



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-226-Hidrolise-enzimatica-da-sacarose_fig5_311994359.

Figura 4: Processo da conversão da glicose



Fonte: O Autor, 2023.

2.3.1.1 Fases da fermentação

A fermentação alcoólica é composta por três fases principais: a fase preliminar, a tumultuosa e a fase complementar. A fase preliminar tem início quando o substrato (fonte de açúcares) é adicionado às células. Nessa fase, ocorre uma intensa multiplicação das células, e o açúcar consumido é utilizado principalmente para reprodução celular. Durante essa fase, há um ligeiro aumento de temperatura e uma produção limitada de dióxido de carbono. A duração da fase preliminar pode variar dependendo das características do sistema de fermentação, e pode ser reduzida ao utilizar uma concentração elevada de células ou ao adicionar células a um meio mais rico do que o original (Steinle, 2013; Lima et al., 2011).

Na fase de fermentação tumultuosa, o piruvato é transformado em etanol em um procedimento composto por duas etapas distintas. Na primeira etapa, o piruvato é convertido em acetaldeído e isso é acompanhado pela produção de dióxido de carbono. Posteriormente, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH. As principais características

da fase tumultuosa são, justamente, uma intensa produção de álcool e grande liberação de CO₂. Durante esta, a temperatura tende a aumentar, o que geralmente requer controle por meio de resfriamento. Além disso, há um progressivo aumento na formação de espuma e um aumento na acidez do substrato. A fermentação principal atinge seu fim quando a liberação de gás diminui, reduzindo a turbulência característica do substrato (EMBRAPA, 2022).

Na pós-fermentação ou fase complementar, observa-se uma diminuição da temperatura do sistema, um aumento na acidez e uma redução na atividade de fermentação da levedura. Isso ocorre devido ao acúmulo de determinadas substâncias, ao esgotamento dos carboidratos disponíveis e à presença de toxinas provenientes de contaminantes (EMBRAPA, 2022).

A fermentação alcoólica pode ocorrer de modo em batelada com alimentação descontínua, onde a adição de inóculo ocorre apenas uma vez durante todo processo, batelada alimentada, onde há o reciclagem de células e o processo contínuo, onde o inóculo é renovado ao término de ciclo de fermentação inicial, é válido ressaltar que há diferença entre os reatores em detrimento do método de alimentação, haja vista que uma alimentação contínua demanda de uma adição de inóculo, de modo que o sistema permaneça em anaerobiose. (Góes-Favoni et al.,2018).

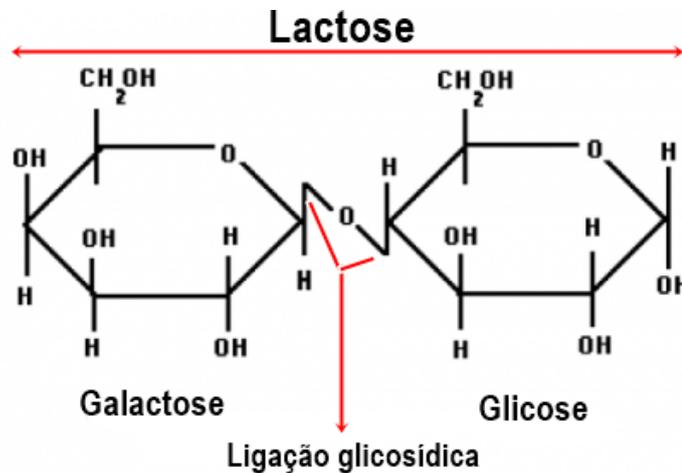
A eficácia da fermentação é influenciada por diversos fatores, e um dos mais importantes é o pH do meio. A acidez do substrato e o microrganismo fermentativo estão intimamente relacionados. Portanto, considera-se que o pH ideal para uma fermentação satisfatória deve estar situado na faixa entre 4,0 e 5,0 (Diógenes; Carmo, 2021).

2.3.2 Fermentação alcoólica do lactossoro

Apesar da levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentar uma grande variedade de açúcares, ela não é capaz de metabolizar a lactose, devido à ausência da enzima B-galactosidase e da proteína lactose permease, uma alternativa é promover hidrólise no lactossoro antes da fermentação (Luvisotto; Suguimoto, 2009; Domingues, 1999). Sendo assim, urge a necessidade de um pré-tratamento afim de converter a lactose, em seus respectivos monossacarídeos, glicose e galactose (Figura 5), para tal, pode se fazer o uso

da enzima lactase.

Figura 5: Estrutura química da lactose



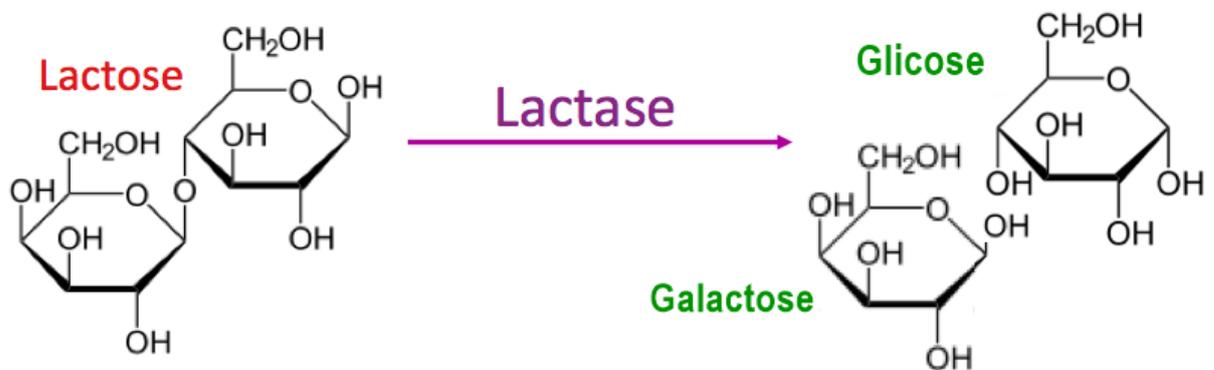
Fonte: Adaptado de <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/lactose>

2.3.2.1 Enzima Lactase

A enzima lactase, também conhecida como β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23), desempenha várias funções, incluindo digestão, degradação lisossômica e catabolismo. A lactase encontrada no intestino de mamíferos e em microrganismos é responsável pela hidrólise da lactose em seus monossacarídeos constituintes, D-galactose e D-glicose, conforme Figura 6. Esses monossacarídeos são posteriormente absorvidos e transportados para a corrente sanguínea até a células para a síntese de ATP. No organismo humano a lactase fica localizada nas microvilosidades das células mucosas da membrana da borda em escova do intestino, já nos microrganismos, fica geralmente, na região intracelular (bactérias, fungos e leveduras), podendo ser extracelular também nos fungos (Biansini, 2023; Dekker; Daamen, 2011).

As enzimas β -galactosidases usadas na indústria podem ser obtidas por meio do cultivo de fungos filamentosos, como o *Aspergillus oryzae* e o *Aspergillus niger*, além de leveduras, como o *Kluyveromyces lactis* e o *Kluyveromyces marxianus* (Biansini, 2023; Dekker; Daamen, 2011). A concentração lactase comercial é expressa em FCC ALU (Lactase Activity Unit) – Unidade de atividade de lactase, sendo o Food Chemical Codex (FCC) um padrão internacional para a medição de enzimas alimentares. Essas enzimas são utilizadas por pessoas intolerantes a lactose para que possam consumir produtos lácteos contendo esse glicídio.

Figura 6: Hidrólise da lactose através da enzima β -galactosidase



Fonte: Adaptado de <https://lbc.msu.edu/evo-ed/pages/Lactase/cellbio.html>

3 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar o potencial de produção de etanol obtido a partir do resíduo proveniente da fabricação de queijo minas frescal, o lactossoro bovino tratado previamente com a enzima lactase.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

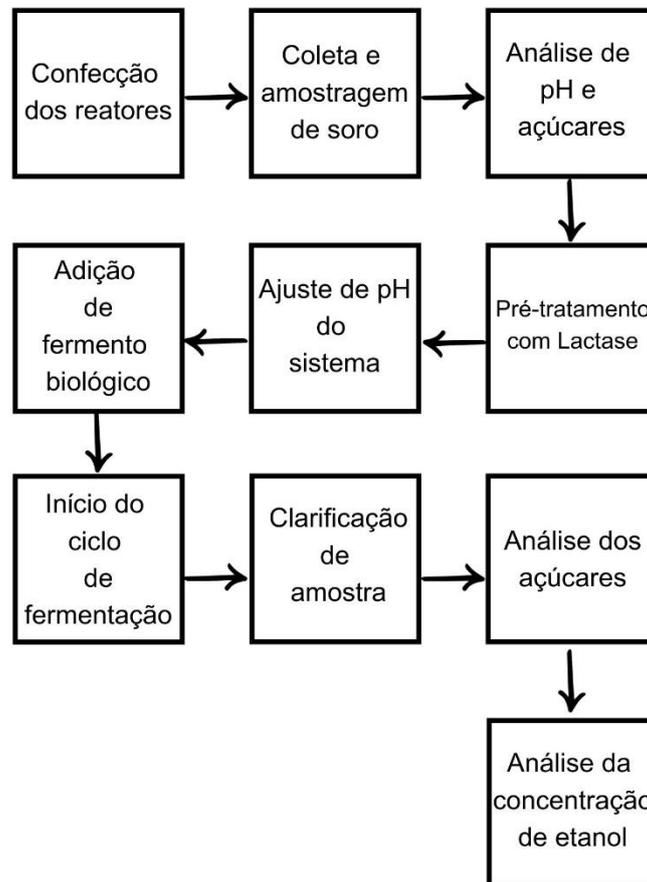
- Aplicar pré-tratamento no substrato fazendo uso da lactase;
- Determinar melhor concentração de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), para uso no reator de fermentação;
- Determinar a melhor concentração de lactase a ser utilizada no lactossoro;
- Avaliar o tempo ideal de fermentação em um intervalo de 24 a 72 horas;
- Avaliar a concentração de etanol nos fermentados.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo realizado foi subdividido, a fim de atingir os objetivos propostos anteriormente. A Figura 7 apresenta as principais etapas desenvolvidas nesta pesquisa.

Figura 7 – Delineamento do estudo de avaliação da concentração de etanol obtido a partir da fermentação alcoólica do lactossoro



Fonte: O autor, 2023.

4.2 LOCAL DE COLETA E ESTUDO

As coletas e amostragens de lactossoro foram realizadas na Agroindústria do Centro Estadual de Educação Profissional Manoel Moreira (Colégio Agrícola de Foz do Iguaçu). As etapas de análise de pH e análise açúcares redutores foram realizadas no laboratório de química ambiental do Núcleo de Análises Físico-Químicas LTDA em Foz do Iguaçu. As demais etapas de pré-tratamento de lactossoro, correção de pH, adição de fermento biológico, ciclo de fermentação, clarificação de amostra e determinação de etanol foram realizadas no laboratório de ensino 1 da Universidade Federal da Integração Latino-Americana situado no Parque Tecnológico Itaipu.

4.3 CONFECÇÃO DOS REATORES

Como evidenciado na bibliografia, o sistema de fermentação descontinuada não pode permitir a entrada e passagem de ar. Dessa forma, os reatores foram confeccionados com dois frascos estéreis de polipropileno de 250 e 500 mL, ligados por uma mangueira cristal flexível de PVC de 1 mm e vedados com um adesivo termofixo acrescido de resina epóxi (Durepoxi®), conforme Figura 8. O frasco de 500 mL (frasco 1) recebeu a mistura a ser fermentada e o frasco de 250 mL (frasco 2) foi preenchido com água, fazendo com que o CO₂ eliminado na fermentação no frasco 1, fosse eliminado no frasco 2, sendo borbulhado em água, impedindo a passagem de ar entre os sistemas.

Figura 8 – Fotografia dos reatores de fermentação



Fonte: O autor, 2023

4.4 COLETA E AMOSTRAGEM DO LACTOSSORO

Depois de separado o lactossoro do queijo, ele foi reservado em um caldeirão, dado isso, seguindo as recomendações de coleta, amostragem e transporte dispostos nos Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Com o auxílio de um fervedor e um funil foi transferida uma alíquota homogênea de lactossoro para um frasco estéril de polipropileno de 2L, garrafa esta que foi rotulada contendo data de coleta e armazenada em caixa de isopor contendo cubos de gelo afim de se manter a temperatura durante o transporte. No decorrer da pesquisa, foram realizadas o total de 5 coletas. A figura 9 exibe o frasco contendo lactossoro, já pronta para uso em uma bancada.

Figura 9 – Fotografia do frasco contendo lactossoro para análise



Fonte: O autor, 2023.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.4.1 pH

Após cada coleta realizada o pH do lactossoro foi analisado, para isso se fez uso de um medidor de pH de bancada de marca Digimed®, calibrados diariamente com material de referência certificado (MRC) nos pontos 4,00; 6,86 e 10,00.

4.4.2 Glicídios redutores em lactose

As análises de glicídios redutores foram realizadas de acordo com o método 432/IV – Determinação de glicídios redutores em lactose (adaptado) do Manual de Métodos físico-químicos para análise de alimentos (IAL, 2008). O procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra de lactossoro coletada e após fermentada. Foi preparada uma solução de lactose p.a. para controle.

Material

Para esse ensaio foram utilizados, balão volumétrico de 100 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, proveta de 25 mL pipeta graduada de 6 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, funil de vidro, papel de filtro, balão de fundo chato de 300 mL, bureta de 25 mL, chapa aquecedora e garra de madeira.

Reagentes

Foram preparadas as seguintes soluções para esse ensaio, solução de sulfato de zinco a 30% m/v, solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v, soluções de Fehling tituladas (Anexo A) e azul de metileno 1%

Procedimento

Foi transferido, com auxílio de proveta, aproximadamente 25 g da amostra para um balão volumétrico de 250 mL, foi adicionado 50 mL de água, 6 mL sulfato de zinco a 30% e 6 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, misturando bem após cada adição. O sistema foi submetido a repouso, para sedimentar durante 5 minutos, e após, o balão foi avolumado com água. A amostra foi submetida a filtração simples em filtro de papel, direto em um erlenmeyer de 250 mL. Em um novo erlenmeyer de 250 mL, se transferiu 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, posteriormente se adicionou 40 mL de água, o sistema foi submetido a aquecimento em bico de Bunsen até a ebulição. Se realizou a transferência do filtrado para uma bureta de 25 mL e se deu início a titulação, no primeiro sinal de descoloramento, se adicionou 2 gotas do indicador azul de metileno e prosseguiu-se com a titulação. É válido ressaltar que o tempo máximo para titulação é de 3 minutos, o sistema deve estar em ebulição constante e ser realizado em erlenmeyer afim

de diminuir o contato do meio com o ar atmosférico, que pode contribuir para a oxidação do meio.

O ponto final é indicado pelo azul de metileno, que sofre redução em conjunto da solução de Fehling. A Figura 10 evidencia o ponto de viragem para um melhor reconhecimento no momento do procedimento.

Figura 10 – Fotografia da amostra durante a titulação pelo método Lane-Eynon



Fonte: O Autor, 2023.

A porcentagem de glicídios redutores em lactose foi determinada pela Equação 1:

Equação 1 - Glicídios redutores em lactose

$$\% \text{ de glicídios redutores em lactose} = \frac{100 \times 250 \times \left(\frac{T}{2}\right) \times 1,39}{V \times m}$$

Onde:

T = título da solução de Fehling;

V = volume de amostra gasto na titulação, em mL;

m = massa da amostra em gramas

1,39 = fator de conversão da glicose em lactose

Também se realizou aplicação do método da Lane-Eynon para avaliar o consumo de açúcares nos fermentados, conforme a Equação 2:

Equação 2 – Glicídios redutores em glicose

$$\% \text{ de glicídios redutores em glicose} = \frac{100 \times 250 \times \left(\frac{T}{2}\right)}{V \times m}$$

Onde:

T = título da solução de Fehling;

V = volume de amostra gasto na titulação, em mL;

m = massa da amostra em gramas

4.5 TRATAMENTOS E FERMENTAÇÃO DO LACTOSSORO

4.5.1 Hidrólise da lactose no lactossoro

Material

Proveta de 500 mL, béquer de 500 mL, bastão de vidro.

Reagentes

Solução de lactase (*Aspergillus oryzae*) comercial (Deslac®), onde 1 mL possui 10.000 FCC ALU.

Procedimento

Transferiu-se para um béquer de 500 mL, 500 mL do lactossoro bovino, posterior a isso uma alíquota de lactase foi adicionada junto ao soro e com o auxílio de um bastão de vidro, se submeteu a amostra a agitação e em seguida, a repouso de 30 minutos. Foi preparada uma solução de lactose p.a. de concentração próxima do lactossoro para controle do processo de fermentação.

4.5.2 Correção do pH do sistema

Material

Medidor de pH Digimed DM22, pipeta de Pasteur

Reagentes

Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2,5 mol L⁻¹

Procedimento

Um sistema contendo o béquer com o lactossoro e um medidor de pH foi montado. Fazendo uso de uma pipeta de Pasteur, se gotejou a solução de ácido sulfúrico no soro leite hidrolisado até que se atingisse o pH de 4,5

4.5.3 Ciclo de fermentação

Material

Vidro de relógio, espátula, balança analítica e reatores de fermentação.

Reagentes

Fermento biológico Fleischmann® (levedura *Saccharomyces cerevisiae*)

Procedimento

Fazendo uso de um sistema composto por uma balança analítica e um vidro de relógio, com o auxílio de uma espátula se aferiu uma alíquota de 15,000g do inóculo (fermento biológico). Posterior a isso foi transferido de forma quantitativa todo o material para o reator de fermentação acrescido do substrato já hidrolisado, com 1mL de lactase e com o pH ajustado, o reator foi submetido a agitação para homogeneização do sistema e foi levado para estufa a uma temperatura de 30°C. As condições estabelecidas foram testadas nos tempos de 24h, 48h e 72 horas a fim de se avaliar a influência do tempo na fermentação e no consumo de açúcares redutores. Os ensaios foram feitos em triplicata. O Quadro 1 apresenta o número do ciclo e os tempos de fermentação testados.

Quadro 1 – Análise do tempo de fermentação do lactossoro

Ciclo	Tempo (h)
1	24
2	48
3	72

Fonte: O Autor, 2023.

n=3

Também foram feitas fermentações com o tempo de 24 horas, estreitando os parâmetros do experimento, e mantendo como variáveis a concentração do inóculo (fermento biológico) e da enzima lactase. Os ensaios foram feitos em duplicata. O Quadro 2 exibe os ciclos realizados com esses parâmetros.

Quadro 2 – Análise da influência da concentração do inóculo e da enzima lactase nos ciclos de fermentação

Ciclo	Inóculo (g)	Lactase (FCC ALU)
4	9,9996	20.000
5	4,9996	20.000
6	2,5025	20.000
7	10,0005	10.000
8	5,0007	10.000
9	2,5023	10.000
10	10,0082	5.000
11	5,0103	5.000
12	2,5007	5.000

Fonte: O Autor, 2023.

n=2

Ao término dos ciclos de fermentação, ao analisar as melhores condições, solução padrão de lactose p.a foi submetida a as mesmas condições, para ter o seu consumo de glicídios redutores e sua concentração de etanol avaliados.

4.5.4 Clarificação das amostras após fermentação

Materiais

Pipeta volumétrica de 10 mL,
Erlenmeyer de 250 mL
Filtro de papel qualitativo
Funil de vidro.

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v, solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v.

Procedimento

Fazendo uso de pipeta volumétrica de 10 mL, foi transferida uma alíquota de solução de sulfato de zinco para o reator de fermentação, em seguida foi adicionada 10 mL de solução de ferrocianeto de potássio, o sistema foi agitado e submetido a filtração simples, removendo assim os sólidos suspensos das proteínas de leite contidas no fermentado, o tornando apto para determinação de etanol no refratômetro. A Figura 11 apresenta uma amostra após e antes do processo de clarificação.

Figura 11 – Fotografia das amostras depois e antes da clarificação.



Fonte: O Autor, 2023.

4.5.4 Determinação da concentração de etanol

Material

Refratômetro de etanol

Pipeta de Pasteur

Papel toalha

Reagentes

Água destilada

Procedimento

Fazendo uso de uma pipeta de Pasteur, foi gotejado o fermentado clarificado na superfície do prisma do refratômetro de etanol ATC modelo RZ116 para realizar a leitura da concentração de etanol obtida em (%) (v/v). A Figura 12 apresenta a fotografia do refratômetro para etanol.

Figura 12 – Fotografia do refratômetro de etanol



Fonte: Ferreira et al., 2022.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE pH DO LACTOSSORO *IN NATURA*

As amostras de lactossoro coletadas foram avaliadas quanto ao seu pH inicial. O Quadro 3 apresenta os resultados das medidas das 5 amostras coletadas

Tabela 2 – Análise de pH no lactossoro in natura

Coleta	pH
1	6,52
2	6,59
3	6,54
4	6,60
5	6,49

Fonte: O Autor, 2023

Os resultados indicam uma constância nos valores do pH do lactossoro produzido, o que representa um aspecto positivo na sua produção, coleta e armazenamento. Esses valores são condizentes com os da literatura (Soares; Vendramel; Souza, 2021), sendo um valor médio de 6,55.

5.2 GLICÍDIOS REDUTORES EM LACTOSE NO LACTOSSORO *IN NATURA*

Foram avaliados os teores de glicídios redutores nas amostras de lactossoro in natura coletadas. Os teores de glicídios podem ser atribuídos, essencialmente, a presença da lactose que é quem confere o sabor doce ao leite. Os resultados apontam elevados valores de lactose, de 2,94 a 3,06 %, indicando que o lactossoro obtido parece ser apropriado para a produção de etanol. O aproveitamento desse açúcar para a produção de etanol pode contribuir para minimizar o impacto ambiental de seu descarte associado a um aproveitamento energético desse resíduo. O Quadro 4 apresenta os valores de glicídios redutores, lactose, nas 5 amostras coletadas e na solução de controle com lactose p.a.

Tabela 3 - Análise de glicídios redutores em lactose no lactossoro in natura

Lactossoro	Glicídios redutores (%)
1	3,00 ± 0,01
2	3,06 ± 0,01
3	2,8 ± 0,01
4	2,94 ± 0,01
5	3,03 ± 0,01
Padrão de lactose P.A	2,70

Fonte: O Autor, 2023.

Os valores obtidos estão de acordo com os da literatura, que nos fornece um valor médio de 2 a 5% (m/m) de lactose no lactossoro doce. Esses valores estão atrelados a uma série de outros fatores, tais como a raça do animal, sua alimentação, suplementação, condições climáticas entre outros.

5.2 GLICÍDIOS REDUTORES EM GLICOSE NO FERMENTADO

Apesar dos processos de fermentação alcoólica de lactossoro já estarem bem estabelecidos, existem ainda alguns aspectos passíveis de melhoramento. O tempo de fermentação com 24, 48 ou 72 h foi avaliado, conforme ciclos 1, 2 e 3, respectivamente. É possível observar que, na fermentação, a levedura consumiu todos os açúcares redutores presentes no meio, haja vista que, o limite de quantificação do método é de 0,5%. Os resultados indicam que com o tempo de 24h a fermentação já se apresenta completa, não sendo necessários tempos maiores ou mesmo que, um tempo maior parece não prejudicar o processo.

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada na fermentação alcoólica do lactossoro não apresentando, porém, o sistema lactase permease nem a enzima β -galactosidade que é capaz de hidrolisar a lactose em galactose e glicose. A adição de diferentes quantidades, 0,5, 1,0 ou 2,0 mL, de solução de lactase (*Aspergillus oryzae*) comercial (Deslac®) com 10.000 ALU/mL parece não influenciar na fermentação da lactose, pois, após a fermentação todas as amostras apresentaram valores de glicídios redutores < 0,5%. Nesse caso, a utilização de menores quantidades de lactase propicia uma fermentação efetiva e com custos reduzidos.

Quanto as quantidades de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas, 2,5, 5,0 ou 10 g, em 500 mL de lactossoro, parece não ter influenciado na fermentação. Igualmente aos resultados obtidos com a hidrólise da lactose, uma menor quantidade de levedura pode ser utilizada mantendo o processo de fermentação eficiente e com custos reduzidos.

Tabela 4 - Análise de glicídios redutores, lactose, no lactossoro após a fermentação

Fermentado (ciclo)	Glicídios redutores (%)
1	< 0,5 ± 0,0
2	< 0,5 ± 0,0
3	< 0,5 ± 0,0
4	< 0,5 ± 0,0
5	< 0,5 ± 0,0
6	< 0,5 ± 0,0
7	< 0,5 ± 0,0
8	< 0,5 ± 0,0
9	< 0,5 ± 0,0
10	< 0,5 ± 0,0
11	< 0,5 ± 0,0
12	< 0,5 ± 0,0
Padrão de lactose P.A	< 0,5 ± 0,0

Fonte: O Autor, 2023.

A amostra controle de lactose p.a do método também dispõe de mesmo valor (<0,5%). As condições de fermentação as quais foram submetidas a solução controle de lactose p.a. foram de: 2,5 g de levedura e 0,5mL (5.000 FCC ALU) de lactase indicando que o processo utilizado parece ter sido apropriado para a fermentação dos açúcares presentes no lactossoro.

5.3 DETERMINAÇÃO DE ETANOL NOS FERMENTADOS

A produção de etanol a partir dos açúcares do lactossoro parece associar duas vantagens importantes. Uma delas se refere ao pré-tratamento desse resíduo da indústria leiteira, pois promove uma diminuição da DQO antes do seu encaminhamento as Estações de Tratamento de Efluentes (ETE). Outra vantagem é o aproveitamento energético desses resíduos na obtenção do combustível etanol. Nesse sentido, essa proposta pode contribuir para uma agenda de desenvolvimento sustentável para os próximos 15 anos, a Agenda 2030, composta pelos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) e que o Brasil se comprometeu em contribuir, como outros países da Organização das Nações Unidas (ONU). Entre os ODS que se pretende atingir, essa proposta alinha com o ODS 6, pois cuida do efluente da indústria que finalmente alcançará os corpos d'água, o ODS 7, pois busca a obtenção de etanol, uma fonte de energia limpa.

Para todas as amostras clarificadas, aquelas com 24h de fermentação, observou-se uma quantidade de etanol de 5 a 6%, conforme Tabela 5. Considerando as quantidades de levedura e lactase adicionadas, as melhores condições se encontram no ciclo 12 (2,5007g de fermento biológico e 0,5mL de lactase). É possível notar que os valores obtidos ficaram muito próximos entre si, o que nos revela que a adição de um excedente de lactase e levedura não favorecem o processo. Esses resultados corroboram aqueles obtidos na determinação de açúcares redutores, após a fermentação. Ao término do consumo de açúcares o processo de produção de etanol se encerra e a formação de etanol se mantém constante.

Com relação a obtenção de etanol a partir do padrão de lactose, observa-se um ligeiro aumento em sua produção total, quando comparado ao desempenho do substrato. Onde 2,7% de lactose no padrão produziu 6% de etanol, enquanto no substrato se obteve a mesma concentração de etanol para 3% de lactose. A esse fator se justifica a ausência de bactérias lácteas e outros componentes que inibem parcialmente a produção de etanol, o que torna propício um melhor desempenho fermentativo. É válido ressaltar que a escala do refratômetro utilizado varia de 1 em 1% e que para resultados mais exatos se sugere a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tabela 5 – Valores de etanol obtidos nos ciclos de fermentação

Ciclo	Etanol (% v/v)
4	5
5	6
6	6
7	6
8	6
9	6
10	5
11	6
12	6
Padrão de lactose P.A	6

Fonte: O Autor, 2023.

6 CONCLUSÃO

O substrato avaliado foi capaz de produzir etanol em concentração detectável. Obteve-se 6% de etanol com as melhores condições sendo 2,5007g de fermento biológico, 0,5 mL de lactase (5.000 ALU) a tempo e temperatura de 24h e 30°C, respectivamente. É possível notar que o menor ponto analisado possui concentração de etanol semelhante com a dos ciclos onde as concentrações da levedura e da lactase foram maiores. Sendo assim, se sugere a análise de novos ciclos de fermentação com concentrações ainda menores afim de se obter uma linearidade e dados de obtenção máxima de etanol em função da levedura e da lactase. Pode-se dizer que a cada 10L de lactossoro fermentados são produzidos 600 mL de etanol, o que perfaz um valor representativo ao considerarmos que o substrato, muita das vezes, é descartado pelos laticínios e produtores de pequeno porte em corpos d'água e demais áreas. Quanto ao aproveitamento do etanol obtido, após o término do ciclo de fermentação se recomenda o uso da técnica de destilação fracionada para que se obtenha o etanol hidratado. Ao resíduo obtido da destilação se sugere a utilização como substrato líquido em biodigestores para produção de biogás, visto que ainda há proteínas e gorduras em menor concentração. Desse modo o substrato é aproveitado em sua totalidade, corroborando para produção de energia limpa, de forma sustentável.

REFERÊNCIAS

ALVES, Maura Pinheiro; MOREIRA, Renam de Oliveira; RODRIGUES JÚNIOR, Paulo Henrique; MARTINS, Mayra Carla de Freitas; PERRONE, Ítalo Tuler; CARVALHO, Antônio Fernandes de. SORO DE LEITE: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.L.], v. 69, n. 3, p. 212, 2 jul. 2014. Lepidus Tecnologia. <http://dx.doi.org/10.14295/2238-6416.v69i3.341>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE QUEIJO (São Paulo). **Indústria de queijos: como continuar crescendo?**. 2022. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2448&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=29. Acesso em: 15 out. 2023.

BNDES. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **Rio de Janeiro: BNDES. 2007. 35 p.**

BIANSINI, Annelize Kretzu. **Uso da enzima lactase comercial visando a redução do teor de lactose em leites Ultra High Temperature (UHT) com diferentes teores de gordura Florianópolis 2023**. 2023. 49 f. Monografia - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

CIBiogás – Centro Internacional de Energias Renováveis – **Biogás, Panorama do Biogás no Brasil 2022**. CIBiogás (Brasil) Relatório Técnico nº 001/2023 – Foz do Iguaçu, CIBiogás, 2023.

CINELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CONOMA. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA 1, de 23 de janeiro de 1986**. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (Brasil). **Pesquisa Pecuária Municipal 2020**. 30. ed. São Paulo: Cna, 2021. 8 p.

DIÓGENES, Bianca Cavalcante; CARMO, Shirlene Kelly Santos. Desempenho da *saccharomyces cerevisiae* ao estresse ácido no processo de fermentação alcoólica. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1-8, 9 ago. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18716>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Minas Gerais). **O Mercado Consumidor de Leite e Derivados**. 120. ed. Juiz de Fora: Embrapa, 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Brasil). **Anuário do Leite 2022**: pecuária leiteira de precisão. 2022. ed. São Paulo: Embrapa, 2022. 114 p.

GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso de; MONTEIRO, Anne Caroline Cardoso; DORTA, Claudia; CRIPPA, Mariele Gonçalves; SHIGEMATSU, Elke. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 285-296, 23 maio 2018. Companhia Brasileira de Produção Científica. <http://dx.doi.org/10.6008/cbpc2179-6858.2018.004.0023>.

GUSSO, Ana Paula. **Diferentes espessantes, níveis de gordura e lactosoro em creme de ricota**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital), 2008. 1020 p. 835

LEIFELD, V; MARQUES, M.B. Avaliações ambientais em diferentes tipos de soro de leite. **Congresso Brasileiro de Química**, 53., 2013, Rio de Janeiro.

LUVISOTTO, Elaine; SUGUIMOTO, Hélio Hiroshi. Fermentação da lactose hidrolisada com levedura *saccharomyces cerevisiae*. **Congresso Nacional de Extensão Universária - UNOPAR**. 3. 2009. Disponível em: <https://repositorio.pgsscogna.com.br/bitstream/123456789/14635/1/FERMENTA%C3%87%C3%83O%20DA%20LACTOSE%20HIDROLISADA%20COM%20LEVEDURA%20SACCHAROMYCES%20CEREVISIAE.pdf>. Acesso em: 15 out. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa, de 15 de dezembro de 2011**. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Assembleia Legislativa. **Instrução Normativa Nº 80, de 13 de agosto de 2020**. 157. ed. Seção 1, p. 2-5. Padrões de identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite ácido.

ROHLFES, Ana Lúcia Becker; BACCAR, Nádia de Monte; OLIVEIRA, Mari Silvia Rodrigues de; MARQUARDT, Liliane; RICHARDS, Neila Silvia Pereira dos Santos. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 2, p. 79-83, jul. 2011. Semestral.

SABIONI, R.C; FONTES, E.A.F; STRINGHETA, P.C; VIDAL, P.S; CARVALHO, R.M. Aproveitamento do permeado da ultrafiltração do soro de leite para a produção de bebida funcional, adicionada de corantes naturais extraídos do açaí (*euterpe oleracea mart.*). **Encontro nacional de engenharia de produção**, 36., 2016, João Pessoa.

STEINLE, Luis Antonio. **Fatores que interferem na fermentação alcóolica**. 2013. 51 f. Monografia (Especialização) - Curso de Pós-Graduação Mta - Gestão Industrial Sucoenergética, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Sertãozinho, 2013.

SOARES, Bruna Chamusca V.; VENDRAMEL, Simone M. R.; SOUZA, Simone L. Q. de. SORO DE LEITE: UMA VISÃO AMBIENTAL. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 31-40, 07 maio 2021.

VIDAL, Maria de Fátima. **Agroindústria - Etanol**: Caderno Setorial Etene. 237. ed. Fortaleza: Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste, 2022. 16 p.

ANEXOS

ANEXO A – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FEHLING

Fehling A:

- a) Dissolver em água 34,65 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- b) Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume;

Fehling B:

- a) Dissolver 173 g de tartarato duplo de potássio e sódio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) p.a., em solução de hidróxido de sódio (NaOH) p.a. 125 g em 300 mL;
- b) Completar o volume para 1000 mL e deixar em repouso por 24 horas.

Padronização da solução de Fehling:

- a) pesar exatamente 0,5 g de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) p.a., previamente seca em estufa a cerca de 70° C, durante 1 hora;
- b) Transferir para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água. Dissolver bem e completar o volume. A solução padrão de glicose para titular a solução de Fehling deve ser preparada no dia da padronização.
- c) Colocar na bureta a solução padrão de glicose.
- d) Transferir, com pipeta volumétrica, 10 mL de cada uma das soluções de Fehling A e B para erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 40 mL de água e aquecer até ebulição.
- e) Gotejar a solução padrão, sem agitação até quase o final da titulação, mantendo ebulição. Adicionar 1 gota de solução de azul de metileno a 1 % e completar a titulação até descoramento do indicador. O tempo da titulação não pode ultrapassar a 3 minutos. O final da titulação é em torno de 10 mL da solução padrão de glicose.

O título da solução de Fehling é obtido pelo cálculo:

$$T = \frac{V \times m}{100}$$

Onde:

V = volume gasto de glicose na titulação, em mL;

m = massa da glicose, em gramas.