

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Tânia Brandão Pinheiro

**Processo integrado de produção de uma bebida
destilada para a revalorização de drêche de uma
microcervejeira**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Lucília Domingues

e do

Doutor Francisco Pereira

Outubro de 2017

AGRADECIMENTOS

Este segmento é dedicado a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação de mestrado, e a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e sincero agradecimento.

Em primeiro lugar começo por agradecer à minha orientadora, professora Doutora Lucília Domingues, pela oportunidade que me deu para participar neste projeto, pela orientação, acompanhamento, transmissão de conhecimentos e pelo rigor inculcado.

Ao meu coorientador, Doutor Engenheiro Francisco Pereira e também ao Engenheiro Filipe Macieira, pela disponibilidade, prontidão e simpatia demonstrada.

Um agradecimento especial ao Engenheiro Eduardo Coelho, por toda a ajuda imprescindível na realização deste trabalho bem como todo o conhecimento, disponibilidade, tempo investido, dedicação, motivação e amizade demonstrada.

À Doutora Aloia Romani, pelo apoio prestado na realização de algumas atividades experimentais.

Aos investigadores do Laboratório de Fermentações pela forma como me integraram e pela disponibilidade prestada sempre que necessário. Agradeço em particular ao Daniel, à Márcia e à Sofia pela ajuda na realização de algumas atividades laboratoriais, mas sobretudo pela boa disposição, companheirismo, amizade e bons momentos propiciados.

A todos os meus amigos de longa data que sempre me acompanharam e apoiaram em tudo o que faço. Um agradecimento especial a todas as minhas colegas de mestrado, em particular à Alice, por todo o apoio, força, companheirismo, amizade e bons momentos passados. Sem dúvida tornaste este percurso bem mais agradável.

Ao Nelson, por estar sempre do meu lado, acreditar em mim e incentivar-me sempre a não desistir.

Por último, não poderia deixar de agradecer aos meus pais, avós e irmão, os grandes responsáveis por tudo. Obrigada pelos sacrifícios, dedicação, apoio incondicional, paciência, força e coragem que sempre me inculcaram para seguir em frente. Não há palavras para descrever a vossa influência na minha vida e o quanto vos estou grata por tudo.

A todos, um sincero obrigado!

Esta dissertação foi suportada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) Portuguesa no âmbito do fundo estratégico da unidade UID/BIO/04469/2013 e COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684), e co-financiada pelo projeto RECI/BBB-EBI/0179/2012 (FCOMP-01-0124-FEDER-027462).



RESUMO

A drêche é o resíduo sólido obtido após a etapa de elaboração do mosto cervejeiro, representando 85 % do total de subprodutos gerados. É um material rico em polissacáridos e proteínas, o que o torna um substrato interessante em muitas aplicações biotecnológicas. Contudo, é maioritariamente utilizado como ração de gado. Face às elevadas quantidades produzidas anualmente e ao seu baixo valor de mercado torna-se crucial encontrar alternativas para o seu aproveitamento. Neste contexto, a presente tese focou-se na valorização da drêche cervejeira como substrato para a produção de uma bebida alcoólica destilada, com características aromáticas e sensoriais que a associem à cerveja. Seis tipos diferentes de drêche foram caracterizadas quimicamente e avaliadas quanto à suscetibilidade à sacarificação enzimática. O teor de glucano das drêches estudadas variou entre 26,5 % e 32,1 %, com base no qual foram selecionadas duas drêches. O pré-tratamento por autohidrólise foi avaliado a temperaturas moderadas (150 °C, 160 °C e 170 °C) e cargas de sólidos elevadas (20 % e 25 %, em massa). Autohidrólise a 160 °C durante 5 min com uma carga de sólidos de 25 % demonstrou ser o processo que permite maior extração de glucano presente na matéria-prima e a obtenção de licores mais ricos em glucose. A sacarificação da drêche pré-tratada, com uma carga sólidos de 20 % permitiu a obtenção de uma concentração de glucose de 43,7 g·L⁻¹, equivalente a um rendimento de 85,9 %. O aumento da carga de sólidos para 25 % conduziu a um rendimento inferior (70,6 %), porém possibilitou um incremento notório da concentração de glucose obtida, para 57,7 g·L⁻¹. A utilização de sólido pré-tratado lavado e de *whole slurry* foi investigada na produção de etanol por sacarificação e fermentação híbridas, utilizando duas leveduras com elevada tolerância ao etanol. A fermentação do *whole slurry* permitiu a obtenção de concentrações de etanol superiores ao sólido pré-tratado lavado, registando valores entre 28,7 g·L⁻¹ e 42,3 g·L⁻¹, com rendimentos mássicos de etanol situados entre os 59,5 % e os 94,0 % do teórico, dependendo da drêche e da levedura utilizada. O fermentado com maior teor de etanol foi submetido um processo de destilação seguido de aromatização. A caracterização dos compostos voláteis foi efetuada por GC-FID e GC-MS e a avaliação sensorial por um painel de provadores. Um total de quarenta e nove compostos voláteis foram identificados no destilado após aromatização com aparas de carvalho americano. O destilado revelou características de uma bebida agradável bem como uma qualidade organolética aceitável para consumo humano, demonstrando assim a viabilidade de produzir uma bebida destilada promissora a partir da fermentação de drêche cervejeira.

Palavras-Chave: drêche, valorização, autohidrólise, altas cargas de sólidos, bebida destilada.

ABSTRACT

Brewer's spent grain (BSG) is the solid residue obtained after the separation of the wort during the brewing process, representing about 85 % of the total by-products generated. High polysaccharide and protein content makes BSG an interesting substrate in many biotechnological applications. However, it is mainly used as low-value cattle food. Due to the significant amount produced annually and its low market value, efforts should be increasingly focused on its reuse. In this context, this thesis focused on valorization of BSG as a substrate to produce a distilled alcoholic beverage, with aromatic and sensory characteristics that remind those of beer. Six different BSG were chemically characterized and evaluated for enzymatic susceptibility. Glucan content of the analyzed BSG varied between 26.5 and 32.1 g·100 g⁻¹ of raw material, basis on which two BSG were selected. Hydrothermal autohydrolysis was evaluated at mild temperatures (150 °C, 160 °C and 170 °C) and high solid loadings (20 % and 25 %). Autohydrolysis at 160 °C, 5 min, at 25 % solids loading proved to be the process that allows the highest extraction of glucan present in the raw material and the attainment of glucose-richer liquors. Saccharification of the pretreated BSG at 20 % solids loading allowed to obtain a glucose concentration of 43.7 g·L⁻¹, equivalent to 85.9 % of the theoretical yield. Increasing solid loading to 25 % led to a lower yield (70.6 %), but it enabled a remarkable increase in the glucose concentration to 57.7 g·L⁻¹. The utilization of washed pretreated solid and the whole slurry from pretreatment was investigated as substrate for ethanol production by hybrid saccharification and fermentation, using two high gravity yeasts. The fermentation of the whole pretreated BSG fraction reached higher ethanol concentrations than the washed pretreated solid, with values ranging from 28.7 g·L⁻¹ to 42.3 g·L⁻¹, at yield of 59.5 % to 94.0 % of the theoretical, depending on BSG and yeast used. The fermented broth with the highest ethanol content was subjected to a distillation process, followed by flavoring. Characterization of volatile compounds was performed by GC-FID and GC-MS and the sensory evaluation by a panel of tasters. Forty-nine volatile compounds were identified in the distillate after flavoring with American oak wood chips. The distillate revealed characteristics of a pleasant beverage as well as an acceptable organoleptic quality for human consumption, thus demonstrating the viability of producing a distilled promising beverage by brewer's spent grain fermentation.

Keywords: brewer's spent grain, valorization, autohydrolysis, high-solid loadings, distilled alcoholic beverage.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas.....	xvii
Lista de Símbolos.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento e motivação.....	1
1.2 Objetivos.....	1
2. Estado da arte.....	3
2.1 Origem e definição das bebidas espirituosas.....	3
2.2 Processo geral de produção de uma bebida destilada.....	4
2.2.1 Tipos de matéria-prima.....	5
2.2.2 Fermentação alcoólica.....	6
2.2.3 Destilação.....	7
2.2.4 Maturação.....	9
2.2.5 Aromatização.....	10
2.3 Compostos voláteis.....	11
2.4 Análise sensorial.....	13
2.5 Subprodutos da indústria cervejeira.....	14
2.5.1 Composição química da drêche.....	15
2.5.2 Potenciais aplicações da drêche.....	17
2.6 Produção de etanol a partir de materiais lenhinocelulósicos.....	19
2.6.1 Tecnologias de pré-tratamento.....	20
2.6.2 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada.....	24
2.6.3 Estratégias de hidrólise enzimática e fermentação para a produção de etanol.....	25

2.6.4	Recuperação e purificação do etanol	27
3.	Materiais e métodos.....	29
3.1	Matéria-prima.....	30
3.2	Caracterização química das drêches.....	30
3.2.1	Determinação da humidade	30
3.2.2	Determinação do teor de cinzas	30
3.2.3	Determinação do teor de proteínas	31
3.2.4	Determinação do teor de extratíveis	32
3.2.5	Determinação de polissacáridos.....	32
3.2.6	Determinação da lenhina	34
3.3	Pré-tratamento	35
3.4	Sacarificação enzimática da matéria-prima e da drêche autohidrolisada	36
3.5	Estirpes microbianas e preparação do inóculo	37
3.6	Sacarificação e fermentação da drêche pré-tratada	37
3.7	Ensaio em reator	38
3.8	Destilação	39
3.9	Aromatização	39
3.10	Análise sensorial	39
3.11	Quantificação de monossacáridos, ácido acético, etanol e compostos furânicos	40
3.12	Determinação do teor de oligossacáridos e de polissacáridos solúveis de glucose.....	41
3.13	Quantificação dos compostos voláteis.....	41
3.13.1	Compostos voláteis majoritários.....	41
3.13.2	Compostos voláteis minoritários.....	42
4.	Resultados e discussão	43
4.1	Composição química das diversas drêches cervejeiras.....	43
4.2	Sacarificação enzimática direta das drêches cervejeiras.....	47
4.3	Estudo de condições de operação para a obtenção de hidrolisados ricos em glucose	49
4.3.1	Estudo de diferentes temperaturas de autohidrólise.....	49
4.3.2	Efeito da carga de sólidos na autohidrólise	53

4.4	Comparação da sacarificação enzimática a diferentes cargas de sólidos da drêche tratada e não tratada.....	57
4.5	Sacarificação e fermentação da drêche autohidrolisada para produção de etanol	58
4.6	Produção da bebida destilada.....	63
4.6.1	Sacarificação e fermentação em reator da drêche autohidrolisada.....	63
4.6.2	Destilação dos caldos fermentativos.....	64
4.7	Caracterização dos compostos voláteis presentes nos fermentados, destilados e aromatizados	68
4.7.1	Compostos voláteis majoritários.....	68
4.7.2	Compostos voláteis minoritários.....	72
4.8	Análise sensorial dos destilados aromatizados	81
5.	Conclusões e perspectivas de trabalho.....	89
	Bibliografia	93
	Anexo I – Caracterização química da fração sólida e líquida obtida após autohidrólise	105
	Anexo II – Ficha de prova sensorial	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do processo típico de produção de cerveja e formação da drêche cervejeira (adaptado de Wunderlich e Back, 2009 [55]).	15
Figura 2 – Efeito do pré-tratamento sobre a estrutura dos materiais lenhinocelulósicos (adaptado de Mosier et al. 2005 [82]).	21
Figura 3 – Fluxograma de todo o processo e métodos analíticos utilizados neste trabalho.	29
Figura 4 – Reator pressurizado (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), utilizado para efetuar o processo de autohidrólise da drêche.	36
Figura 5 – Destilados aromatizados 1 e 2 (a) e respectivas amostras de 10 mL (b) fornecidas a cada membro do painel de provadores.	40
Figura 6 – Perfil de concentração de glucose (C_{glucose}) obtido após a sacarificação direta de seis drêches cervejeiras diferentes (BSG A a F) ao longo do tempo (t).	47
Figura 7 – Rendimento em glucose (Y_{glucose} , determinado como percentagem do glucano inicial) das frações sólida (glucano) e líquida (GOS e glucose monomérica), obtidas após pré-tratamento da drêche E a 150 °C, 160 °C e 170 °C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de duplicados experimentais.	51
Figura 8 – Efeito da temperatura de pré-tratamento (150 °C, 160 °C e 170 °C) na sacarificação enzimática da drêche, medido através do rendimento em glucose (Y_{glucose}). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de duplicados experimentais.	52
Figura 9 – Comparação entre (a) rendimento em glucose (Y_{glucose}) e (b) concentração de glucose (C_{glucose}) obtidos após sacarificação enzimática, com diferentes razões sólido-líquido (RSL), da drêche D não tratada e autohidrolisada a 160 °C, 5 min (<i>whole slurry</i>). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de dois ensaios independentes.	57
Figura 10 – Perfis de produção de (C_{CO_2}) ao longo do tempo (t) de fermentação do sólido pré-tratado lavado e sacarificado e/ou <i>whole slurry</i> sacarificado, das drêches D e E, pela <i>S. cerevisiae</i> BLG II e <i>S. cerevisiae</i> PE-2. Cada ponto está representado como valor médio \pm desvio padrão de duplicados experimentais.	60
Figura 11 – Perfis sensoriais obtidos através da média da intensidade atribuída a cada descritor pelo painel de provadores, do destilado aromatizado 1 (—) e 2 (- - -); (a) análise visual, (b) análise olfativa, (c) análise gustativa, (d) sensação nasal/gustativa e (e) qualidade global de cada parâmetro e	

do produto final. A análise do atributo “cor” foi realizada qualitativamente, com os números de 1 a 5, estando associados a uma cor específica (1– amarelo claro; 2– amarelo dourado; 3– amarelo torrado; 4– castanho; 5– castanho avermelhado). 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingredientes de base de diversas bebidas destiladas (adaptada de Burroughs e Bezzante, 1988 [15])	5
Tabela 2 – Composição química da drêche, em percentagem, obtida em diversos estudos	16
Tabela 3 – Valores standard dos parâmetros F_p e C_E dos polímeros glucano, xilano e arabinano	34
Tabela 4 – Composição química de drêches (BSG), apresentada em concentração mássica em base seca (C_{BSG}), originadas a partir de seis receitas diferentes (A a F). Os resultados estão representados como a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes	44
Tabela 5 – Rendimento mássico em sólido (Y_s) e composição química da fração sólida e líquida obtida após autohidrólise da drêche E a três temperaturas distintas (150 °C, 160 °C e 170 °C), durante 5 min, com uma carga de sólidos de 20 %, em massa	50
Tabela 6 – Rendimento mássico em sólido (Y_s) e composição química da drêche D e drêche E autohidrolisadas a 160 °C, 5 min, utilizando diferentes cargas de sólidos. Os resultados estão apresentados como a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes	54
Tabela 7 – Concentração de glucose residual (G_{rf}) e de etanol final (C_{EtOH}) e rendimento em etanol (Y_{EtOH}) obtidos após o processo de HSF das drêches D e E com duas leveduras distintas. Os resultados estão representados como valor médio \pm desvio padrão de duplicados experimentais	61
Tabela 8 – Valores de diferentes parâmetros fermentativos relativos à fermentação da drêche E em reator, após 48 h, conduzida pela <i>S. cerevisiae</i> BLG II, para duas réplicas processuais (F1 e F2).	63
Tabela 9 – Temperatura de recolha (T) das distintas frações obtidas durante o processo de destilação de cada uma das réplicas processuais e respetivo teor alcoólico (C_{EtOH})	65
Tabela 10 – Compostos voláteis maioritários presentes nas distintas frações (1 a 14) do destilado 1 (D1) e 2 (D2) e respetivas concentrações (C)	67
Tabela 11 – Identificação dos compostos voláteis maioritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com a correspondente concentração (C), limiar de perceção (PT) e descritores aromáticos reportados	70
Tabela 12 – Identificação dos compostos voláteis minoritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com correspondente concentração (C), limiar de perceção (PT) e descritores aromáticos reportados	74

Tabela 13 – Frequência relativa (*F*), Intensidade (*I*) e respetivo desvio padrão (*SD*) determinados para os descritores detetados nos destilados 1 e 2 na caracterização sensorial efetuada pelo painel de provadores 84

LISTA DE ABREVIATURAS

AIL	lenhina insolúvel em ácido (do inglês <i>acid insoluble lignin</i>)
ASL	lenhina solúvel em ácido (do inglês <i>acid soluble lignin</i>)
BSG	drêche cervejeira (do inglês <i>brewer's spent grain</i>)
CBP	bioprocesso consolidado (do inglês <i>consolidated bioprocessing</i>)
FPU	unidades de filtro de papel (do inglês <i>filter paper units</i>)
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GC-FID	cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama
GOS	gluco-oligossacáridos
HMF	hidroximetilfurfural
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
HSF	sacarificação e fermentação híbridas (do inglês <i>hybrid saccharification and fermentation</i>)
RSL	razão sólido-líquido
SHF	sacarificação e fermentação separadas (do inglês <i>separate hydrolysis and fermentation</i>)
SSCF	sacarificação, filtração e fermentação simultâneas (do inglês, <i>simultaneous saccharification, filtration, and fermentation</i>)
SSF	sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês <i>simultaneous saccharification and fermentation</i>)
XOS	xilo-oligossacáridos

LISTA DE SÍMBOLOS

C_E	fator de correção estequiométrico
C_{EtOH}	concentração de etanol
F_P	fator de correção da degradação dos açúcares
G_{tf}	concentração de glucose final
H	humidade da amostra

N	azoto de Kjeldahl
PMH	massa total de amostra húmida
PT	limiar de perceção olfativo
t	tempo
V_a	volume de ácido gasto na titulação da amostra
V_b	Volume de ácido gasto na titulação do branco
Y_s	rendimento em sólido
Y_{EtOH}	rendimento em etanol

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e motivação

A elaboração de bebidas espirituosas inovadoras bem como a melhoria da qualidade das bebidas tradicionais existentes é primordial [1], dada a importância desta indústria para os consumidores, produtores e setor agrícola [2]. De facto, nos últimos anos, a indústria dos destilados tem procurado desenvolver novos produtos a partir de matérias-primas pouco comuns, o que possibilita a incorporação de sabores e aromas distintos e, por conseguinte, a atração de novos mercados [3]. Os mercados encontram-se cada vez mais saturados pelo que o interesse acaba por incidir sobre produtos que apresentem diferenciais inovadores. Além disso, o mercado de produtos sustentáveis encontra-se em rápido crescimento e os consumidores estão cada vez mais dispostos a integrar alternativas sustentáveis nas suas decisões de compra [4], [5]. Com base nestes três pressupostos, diversos investigadores têm-se dedicado à descoberta de potenciais matérias-primas que possam ser utilizadas para a produção deste tipo de bebidas alcoólicas. Uma das matérias-primas que satisfaz os requisitos pretendidos são os resíduos agroindustriais, uma vez que apresentam baixo custo, aromas característicos e ainda uma quantidade considerável de açúcares fermentescíveis suscetíveis de serem convertidos em etanol [3].

A indústria cervejeira produz anualmente elevadas quantidades de subprodutos, entre os quais se destaca a drêche, que representa, em massa, 85 % do total de subprodutos gerados. Este resíduo lenhinocelulósico é um material rico em polissacáridos e proteínas, o que potencia a sua utilização em diversos processos biotecnológicos. Contudo, atualmente a maioria da drêche é vendida a baixo custo para alimentação animal [6].

A acumulação dos subprodutos conduz não só à degradação ambiental, como à perda de material de valor acrescentado [7]. Assim, um dos principais desafios do setor cervejeiro assenta na recuperação e valorização dos resíduos produzidos.

1.2 Objetivos

Com as inúmeras discussões sobre a preservação do meio ambiente, desenvolvimento sustentável e procura de inovação, este estudo contempla o aproveitamento da drêche como matéria-prima para a produção de uma bebida alcoólica destilada.

Este estudo surge ligado ao projeto EcoBrew, da empresa Fermentum – Engenharia das Fermentações Lda., que pretende aproveitar ao máximo os subprodutos gerados com o aumento da capacidade de produção previsto.

Assim, o objetivo global deste trabalho consistia na produção de uma bebida alcoólica destilada inovadora e diferenciada, detentora de características organoléticas aceitáveis para o consumo humano e passível de ser implementada no mercado. Pretendia-se obter um perfil de destilado com aromas que levassem o consumidor a relacionar a nova bebida com o produto cerveja, o núcleo do negócio da Fermentum – Engenharia das Fermentações Lda. Especificamente, propôs-se:

- 1) Caracterizar quimicamente diferentes tipos de drêche cervejeira e avaliar o seu potencial como matéria-prima para a produção de etanol;
- 2) Avaliar a realização de autohidrólise em condições pouco severas como estratégia de pré-tratamento da drêche;
- 3) Estudar diferentes cargas de sólidos e o seu efeito na eficiência do pré-tratamento e da sacarificação enzimática;
- 4) Comparar a eficiência de conversão do glucano em glucose alcançada com diferentes configurações processuais;
- 5) Selecionar a metodologia e o processo mais favorável à produção de etanol, visando a obtenção de altas concentrações e rendimentos de conversão satisfatórios;
- 6) Produzir uma bebida destilada e avaliar a sua qualidade no que concerne à composição química e características sensoriais.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Origem e definição das bebidas espirituosas

De acordo com os registos arqueológicos, o consumo de álcool é um hábito que acompanha a história da humanidade. Efetivamente, os primeiros indícios relativos ao consumo de álcool datam de aproximadamente 6000 a.C., com a primeira cerveja a ser produzida no Egito. Inicialmente, as bebidas existentes apresentavam um baixo teor alcoólico pois dependiam exclusivamente do processo fermentativo. Já na Idade Média, com a instituição do processo de destilação, introduzido na Europa pelos árabes, surgiram novos tipos de bebidas alcoólicas, que passaram a ser consumidas na sua forma destilada. Emergiram, assim, duas categorias de bebidas alcoólicas: bebidas alcoólicas fermentadas e as bebidas espirituosas. A primeira bebida espirituosa surgiu na China há cerca de 1000 a.C. [8].

O foco deste trabalho é apenas no segundo grupo de bebidas referido – bebidas alcoólicas espirituosas ou *spirits* em inglês.

O regulamento da Comunidade Europeia [CE] nº 110 (2008, art. 1º) [9] define, de modo formal, as bebidas espirituosas, como:

“a) Destinada ao consumo humano; b) com características organoléticas específicas; c) com um título alcoométrico volúmico mínimo de 15 %; d) obtida: i) quer diretamente por destilação de produtos fermentados naturais com ou sem a presença de aromas e/ou por maceração de produtos vegetais e/ou por adição de aromas, de açúcares ou de outros produtos edulcorantes enumerados no ponto 3 do anexo I, e/ou outros produtos agrícolas e/ou de géneros alimentícios a álcool etílico de origem agrícola e/ou destilados de origem agrícola e/ou a bebidas espirituosas nos termos que são definidos no presente regulamento, ii) quer por mistura de uma bebida espirituosa com um ou vários dos seguintes produtos: – outras bebidas espirituosas; álcool etílico de origem agrícola ou destilados de origem agrícola; outras bebidas alcoólicas; bebidas”.

A definição enunciada acima foi estabelecida para descrever bebidas espirituosas importadas e/ou produzidas e comercializadas nos países integrantes da Comunidade Europeia, embora possa também descrever, de um modo geral, bebidas espirituosas produzidas em qualquer outra parte do mundo.

Esta categoria de bebidas alcoólicas subdivide-se em dois tipos de bebidas: aperitivos/licores e destilados [10].

A definição de licor é bastante diversificada, porém, todos os autores referem que esta bebida dita “por mistura” é composta por uma fonte de álcool, de sabor e de açúcar. Segundo o regulamento da Comunidade Europeia [CE] nº 110 (2008, art.1º) [9], o título alcoométrico volúmico mínimo desta bebida é de 15 %.

Já na categoria dos destilados inserem-se bebidas com um teor alcoólico volúmico mais elevado, situados entre os 30 % e 50 %, derivadas da destilação de produtos agrícolas previamente fermentados, que contenham hidratos de carbono; o seu sabor é influenciado não só pelos compostos aromáticos derivados da matéria-prima e fermentação alcoólica, como também pelo processo de destilação, armazenamento e envelhecimento [10].

A procura de bebidas espirituosas sofreu um grande incremento nas últimas décadas, sendo um dos tipos de bebida mais consumidos no mundo, a par da cerveja e do vinho [11]. Esta subida é, em grande parte o resultado da qualidade do sabor e reputação que estes produtos têm adquirido no mercado mundial ao longo de centenas anos [10].

Em dezembro de 2011 existiam, nos países membros da União Europeia, 329 bebidas espirituosas com Indicação Geográfica, revelando a grande importância económica e representatividade deste setor. De facto, a exportação de bebidas espirituosas é o principal produto alimentar da União Europeia, com significativa contribuição para a sua economia [2].

2.2 Processo geral de produção de uma bebida destilada

Os diferentes tipos de bebidas alcoólicas destiladas podem ser produzidos com recurso a diversas matérias-primas, mas todas têm um processo idêntico para a obtenção de um elevado volume de álcool. De facto, o processo de produção de uma bebida destilada envolve, inicialmente, a seleção, recolha e processamento da matéria-prima, seguindo-se a extração do substrato e consecutiva fermentação, para produção do etanol. Após a fermentação, o fermentado é destilado para separar o etanol e assim obter um produto mais puro. Os passos posteriores à destilação dependem do tipo de bebida destilada que se pretende obter [12].

2.2.1 Tipos de matéria-prima

A primeira etapa de produção de uma bebida destilada é a seleção da matéria-prima, que constitui a característica mais distintiva entre os diferentes tipos de bebida destilada existentes no mercado. Qualquer material que possa ser fermentado pode ser utilizado como matéria-prima [13].

Existem três categorias de matérias-primas: (i) líquidos contendo álcool (vinho, cerveja, etc.); (ii) materiais ricos em açúcar (cana-de-açúcar, frutas e seus derivados, melão, etc.) e (iii) amido e materiais constituídos por amido (cereais, batatas, tapioca, etc.) [14]. No segundo grupo descrito anteriormente, o açúcar está presente no material primário, o que permite que a fermentação ocorra diretamente. Contrariamente, nas bebidas destiladas a partir de matérias-primas amiláceas, a fermentação só é iniciada após o amido ser convertido num açúcar simples [13].

A disponibilidade do ingrediente de base bem como a singularidade do terreno onde este cresce, contribuem significativamente para as diferentes complexidades e qualidades encontradas nas bebidas destiladas [13]. Na Tabela 1 encontram-se alguns dos vários ingredientes de base utilizados em diferentes tipos de bebidas destiladas.

Tabela 1 – Ingredientes de base de diversas bebidas destiladas (adaptada de Burroughs e Bezzante, 1988 [15])

Ingrediente de base	Bebida destilada obtida
Cereais	<i>Whiskey, gin, vodka, korn.</i>
Vegetais	Rum, gin e vodka.
Frutas, pevide	Conhaque, armanhaque e outros <i>brandies</i> .
Frutas	Calvados, aguardente <i>Poire</i> , aguardente Slivovitz e Mirabelle, <i>arrack, framboise, fraise.</i>
Raizes	Tequila.
Caroço	Kirsch.
Cana-de-açúcar	Rum, <i>arrack, basi</i> , pinga, cachaça.
Beterraba sacarina	Bebida destilada neutra.
Celulose	Bebida destilada neutra.

Algumas bebidas podem ser produzidas a partir de uma única matéria-prima, como é o caso do *whiskey*. Outras, como a *vodka*, podem ser concebidas a partir de uma ampla variedade de matérias-primas, incluindo vários grãos, batata, cana de açúcar e uvas [13]. Os cereais são extensivamente utilizados para produção de bebidas alcoólicas como a cerveja, *vodka, whiskey, bourbon*

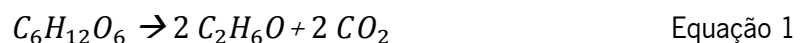
entre outras. Efetivamente, bebidas alcoólicas resultantes da fermentação de cereais maltados estão difundidas por todo o mundo e são bastante apreciadas [1].

Alternativamente, nos últimos anos, têm surgido diversos estudos que investigam a possibilidade de produção de bebidas destiladas utilizando, como matéria-prima, resíduos de outras indústrias. Em 2009, Dragone e seus colaboradores [16] desenvolveram uma bebida destilada a partir da fermentação contínua de soro de queijo, com características organoléticas aceitáveis, na qual foram identificados 40 compostos voláteis. De igual modo, Sampaio e os seus colaboradores (2013) [3] usaram a borra do café, que advém do processo de produção de café solúvel, como substrato fermentativo, o que lhes permitiu obter uma bebida destilada adequada ao consumo humano com propriedades agradáveis, detentora de um aroma e sabor a café.

2.2.2 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico através do qual açúcares simples (dos quais são exemplos a glucose e a xilose) são transformados em etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos [17].

A conversão das hexoses segue a estequiometria apresentada na Equação 1, na qual a degradação de uma molécula de glucose dá origem a duas moléculas de etanol e duas moléculas de dióxido de carbono.



De acordo com a equação supramencionada, o rendimento máximo teórico é de 0,51 g de etanol e de 0,49 g de dióxido de carbono por cada grama de açúcar fermentado. Este processo é essencialmente levado a cabo por leveduras para a obtenção de energia celular, embora também existam algumas bactérias capazes de o efetuar, como é o caso da *Zymomonas mobilis* [17].

São produzidos outros compostos além dos produtos principais anteriormente mencionados, cuja composição e concentração são amplamente variáveis e que se revestem de grande importância devido às características sensoriais que atribuem à bebida final [16]. Fazem parte deste grupo compostos como o glicerol, os ácidos orgânicos, os álcoois superiores, os aldeídos, os ésteres, entre outros. Alguns destes compostos dependem da estirpe de levedura empregue, tais como os álcoois superiores, os ésteres e o glicerol. Outros, formam-se a partir de precursores da matéria-prima, podendo ter origem no metabolismo azotado das leveduras ou, ainda, em reações enzimáticas paralelas [17].

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura usualmente empregue para a produção de etanol a uma escala industrial, uma vez que possibilita um elevado rendimento de etanol, alta produtividade e suporta elevadas concentrações de etanol minimizando, deste modo, os custos da destilação. Porém, embora a *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar hexoses de forma rápida e eficiente, ela é incapaz de fermentar pentoses e usar esses açúcares para o seu crescimento [18].

Conseqüentemente, também no processo de produção de bebidas alcoólicas a levedura utilizada por excelência pertence ao género *Saccharomyces* [19]. A espécie e a estirpe de levedura selecionada são essenciais, não só para a obtenção de elevados níveis de etanol como para a produção de metabolitos minoritários, que contribuem conjuntamente para o desenvolvimento do sabor da bebida [20]. Deste modo, deve ser feita uma escolha cuidadosa da espécie e estirpe a utilizar. Existem diversas características inerentes à levedura que determinam a eficiência da fermentação, das quais se destacam a utilização de carboidratos, a taxa de fermentação, a tolerância ao etanol, a estabilidade da cultura bem como a resistência a altas temperaturas e/ou acidez [12].

2.2.3 Destilação

Após a fermentação, segue-se uma etapa de destilação, que consiste na volatilização de compostos pelo aquecimento, seguido de condensação com o objetivo de promover a separação, concentração e purificação do etanol e de outros compostos provenientes da fermentação [21].

Através deste processo de separação, o fermentado é aquecido e a substância com menor temperatura de ebulição será separada. Este processo é sucessivamente repetido, permitindo a separação dos diversos compostos presentes na mistura. Assim, quando a temperatura atinge os 78,3 °C, ponto de ebulição do etanol, ocorre a vaporização do etanol e conseqüente separação dos outros componentes, em particular da água, que possui um ponto de ebulição mais elevado (100 °C). Deste modo, ocorre um enriquecimento do teor alcoólico do destilado [22].

A composição do fermentado é bastante complexa e variável, mas encerra sempre substâncias gasosas e líquidas, podendo ainda conter sólidos. As primeiras são constituídas principalmente por dióxido de carbono. Os sólidos incluem células de leveduras utilizadas na fermentação e de bactérias contaminantes, sais minerais, açúcares não fermentados e impurezas sólidas em suspensão. Relativamente à fração líquida, a água e o etanol representam os principais componentes, aos quais acrescem produtos secundários (álcoois superiores, aldeídos, ésteres, ácidos, cetonas, compostos azotados, entre outros), que constituem uma parcela de líquidos de pequena importância em relação ao volume, mas de grande efeito na qualidade dos destilados [23].

Durante a destilação, os compostos são fracionados, de acordo com três critérios: temperatura de ebulição, afinidade com o álcool ou água e teor alcoólico no vapor durante a destilação [21]. Essas frações são divididas em cabeça, coração e cauda. A cabeça corresponde à primeira fração recolhida do destilador e possui um teor alcoólico volúmico, geralmente acima de 65 %. O coração é a segunda fração e corresponde ao destilado desejado, representando 80 % do volume destilado. A cauda é a fração final do destilado e apresenta uma baixa graduação alcoólica sendo, por conseguinte, também conhecida por “água fraca” [21], [23]. A primeira fração do destilado – cabeça –, encontra-se enriquecida em metanol e na maioria dos aldeídos e ésteres, que são compostos mais voláteis do que o etanol. Devido à presença de metanol, uma substância neurotóxica para o ser humano, esta fração é, usualmente, desprezada. A fração coração é composta por etanol, álcoois superiores e alguns ácidos voláteis. Já a fração cauda é rica em compostos menos voláteis do que o etanol, onde figuram alguns ácidos (especialmente o ácido acético) e furfuróis, que provocam um sabor desagradável e indesejável para o destilado final [21].

A destilação pode ser conduzida de dois modos distintos – descontínuo e contínuo –, consoante o equipamento utilizado. Um dos fatores preponderante na seleção do tipo destilação a utilizar consiste no tipo de bebida destilada que se pretende produzir. A destilação descontínua, maioritariamente efetuada em equipamentos designados por alambiques, é preferencialmente utilizada quando é necessário um "carácter" particular para um produto, como é o caso do conhaque e do *whiskey*, ao passo que várias colunas de destilação contínua são usualmente empregues para a produção de bebidas espirituosas mais neutras. Ademais, a destilação descontínua é principalmente aplicada nas destilarias de pequeno porte, enquanto a destilação contínua está associada a destilarias de médio a grande porte [24].

O material mais utilizado na construção dos equipamentos de destilação para a obtenção de bebidas destiladas é o cobre. Este metal é bastante maleável, bom condutor de calor, resistente à corrosão e constitui um fator preponderante na qualidade sensorial do produto. De facto, as reações entre os congêneres e as superfícies de cobre do destilador são bastante importantes pois são capazes de modificar ou remover muitos compostos desagradáveis presentes no processo, em particular os compostos sulfurados [25].

A qualidade e composição do produto final são influenciados por diversos fatores inerentes ao processo de destilação, nomeadamente tipo de destilador, sistema de aquecimento e eficiência na separação das diferentes frações [21], [26]. As condições sob as quais a destilação é conduzida assumem, também, um papel fundamental nas características sensoriais da bebida, afetando as quantidades absolutas e relativas dos compostos voláteis e, ainda, promovendo algumas reações

químicas induzidas pelo calor [27]. Dependendo do tipo de reação, estas podem conduzir a um aumento ou diminuição de alguns compostos voláteis ou até à formação de novos compostos. A descrição das possíveis reações que podem ocorrer encontra-se disponível na literatura, e incluem reações de hidrólise, esterificação, acetilação, produção de furfural e as reações com o cobre [21].

2.2.4 Maturação

A maturação de bebidas destiladas é o principal fator para a sua qualidade, posto que cerca de 60 % dos compostos aromáticos presentes na bebida advêm da madeira ou da interação da madeira com o destilado [28]. A bebida recém destilada é incolor e, muitas vezes não apresenta uma qualidade sensorial satisfatória, devido à presença de substâncias de aroma e sabor desagradáveis [29]. Neste sentido, o processo de maturação torna-se fundamental para atenuar ou eliminar estes componentes, proporcionando uma melhoria sensorial da bebida [30]. O envelhecimento consiste no armazenamento da bebida destilada em barris por um período de tempo determinado e em condições adequadas, ação esta que promove alterações na composição química, aroma, sabor e cor da bebida [31].

A composição química da madeira que constitui o barril exerce um efeito primordial durante a maturação [31]. A madeira mais empregue para o envelhecimento de bebidas destiladas na Europa é o carvalho (*Quercus sp.*), em virtude das suas propriedades de flexibilidade, dureza, impermeabilidade à água, e ainda, libertação de extrativos essenciais para o processo de maturação [30].

O tempo de maturação requerido para obter uma qualidade sensorial satisfatória é influenciado por diversos fatores tais como características da matéria destilada, a espécie botânica da madeira e a sua origem geográfica, assim como o número de vezes que o barril foi utilizado [31], [32].

O mecanismo inerente ao processo de envelhecimento é comum a praticamente todas as bebidas destiladas e é baseado na permuta de compostos entre a madeira e a bebida. As possíveis reações que podem ocorrer são: (1) extração direta dos compostos presentes na madeira; (2) decomposição de macromoléculas que formam a estrutura da madeira e transferência dos compostos resultantes para a bebida; (3) reações entre os componentes da madeira e do destilado; (4) reações envolvendo exclusivamente os compostos extraídos da madeira ou do destilado e (5) evaporação de compostos voláteis e formação de moléculas estáveis [33].

O cerne da madeira é composto por constituintes da parede celular – hemicelulose, celulose e lenhina – e, por compostos extrativos, dos quais fazem parte os compostos fenólicos, ácidos gordos e constituintes menores [31].

A maturação de bebidas alcoólicas em barricas de carvalho e os compostos derivados da madeira são objeto de estudo de diversos investigadores [31]–[33]. A maioria dos compostos aromáticos emerge da degradação dos constituintes da parede celular. Contudo, os componentes não se comportam da mesma forma quando interagem com uma bebida, favorecendo reações particulares do sistema madeira/bebida [28].

Durante o período de maturação ocorrem diversas transformações químicas, que conduzem a uma diminuição do pH, do conteúdo de cobre, metanol e de etanol, bem como a um aumento da acidez e da intensidade da cor e a variações das concentrações de compostos fenólicos (taninos), ésteres, aldeídos, furfural e álcoois superiores. A maior parte destas transformações químicas é atribuída à lenhina [30]. Efetivamente, a degradação térmica deste componente durante a torra da madeira na produção das barricas conduz à formação de algumas substâncias que podem ser consideradas marcadores no processo de envelhecimento tais como os aldeídos benzóicos (siringaldeído e vanilina), aldeídos cinâmicos (coniferaldeído e sinapaldeído) e ácidos benzóicos (ácido vanílico e ácido siringico) [34]. Ocorrem ainda, reações de oxidação e hidrólise das ligações éster da lenhina, promovidas pela presença de oxigénio, e que contribuem para a formação de aldeídos, os quais, ao serem oxidados, originam os respetivos ácidos [30]. É, também, de salientar a presença de taninos hidrolisáveis e compostos voláteis, que são particularmente importantes em tanoaria, sendo os primeiros responsáveis pelo amargor, adstringência e coloração da bebida [31].

2.2.5 Aromatização

O *flavour* é a associação entre o aroma, sabor, textura e outras sensações percebidas pela boca (como “calor”, “frescura”, “adstringência”, entre outras), constituindo um fator de extrema importância para a aceitação de um produto no mercado. Entre os componentes do *flavour* destaca-se o aroma, usado para descrever a percepção dos voláteis no sistema olfativo e na boca, sendo responsável por 75 % da impressão do *flavour* [35].

A preferência dos consumidores alterou-se de bebidas destiladas de elevada complexidade organolética para bebidas destiladas mais leves, razão pela qual se torna desejável modificar o sabor tradicional dos destilados, de modo a conceber uma bebida mais palatável [36]. Neste contexto surge o processo de aromatização, que possibilita a diferenciação da bebida.

A operação de aromatização consiste em adicionar uma ou mais substâncias, definidas na alínea a) do n.º 2 do artigo 3.º do Regulamento (CE) n.º 1334/2008, com propriedades odoríferas e/ou sápidas

capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor da bebida. Os materiais aromatizantes utilizados incluem: frutas, plantas, vegetais e especiarias, entre outros [37].

A extração do aroma pode ser efetuada através de diversos métodos nomeadamente infusão, maceração, percolação, extração por fluido supercrítico, destilação, extração ultrassónica e hidrodestilação com micro-ondas a vácuo. A escolha do método a utilizar depende do aroma e da sua fonte [36].

Existem algumas bebidas comercialmente disponíveis com adição de aromas. Uma das mais reconhecidas é o gin, que resulta da redestilação de bagos de zimbro. Outros aromas comumente adicionados a esta bebida são as sementes de cardamomo, casca de laranja e limão, raiz de angélica e de orris, casca de acácia, entre outros. A *vodka* também pode ser aromatizada utilizando uma variedade de materiais, como casca de laranja e de limão, gengibre, cravo-da-índia, pimenta e groselha. Uma ampla variedade de outras bebidas aromatizadas são produzidas em todo o mundo sendo anis a categoria mais conhecida e apreciada [36].

2.3 Compostos voláteis

As bebidas alcoólicas destiladas são misturas complexas constituídas maioritariamente por etanol e água. Além destes, possuem, ainda, um grande número de compostos voláteis que podem ser provenientes da matéria-prima (aromas primários ou varietais) ou formados durante as etapas de fermentação, destilação e maturação (aromas secundários e terciários) [38]. Alguns destes compostos aparecem em elevadas concentrações, na ordem dos $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (compostos voláteis maioritários), enquanto outros estão presentes em níveis significativamente baixos, na ordem dos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (compostos voláteis minoritários) [39].

A análise dos compostos voláteis presentes no destilado é fundamental não só para fins de caracterização como também pela necessidade de controlar o nível de certas substâncias tóxicas, dos quais é exemplo o metanol, e de garantir que a bebida alcoólica produzida está de acordo com níveis mínimos de álcoois superiores definidos por lei para a sua categoria [9].

As bebidas destiladas típicas, como o rum, o *whiskey* e o *brandy*, entre outros, apresentam diversos compostos voláteis, que pertencem a uma variedade de classes tais como ésteres, álcoois superiores, ácidos gordos, compostos carbonílicos (e.g. aldeídos e cetonas), compostos sulfurados, compostos furânicos, lactonas, terpenos, fenóis voláteis, pirazinas, etc [40], [41]. Apesar de existirem compostos exclusivos de uma bebida particular ou tipo de bebida, no geral, os compostos responsáveis

pelos sabores característicos são bastante idênticos. A diferença parece estar na concentração que estes compostos voláteis apresentam nas diferentes bebidas e na sua respetiva contribuição para o aroma, na alteração do limiar de deteção e perceção dos compostos na presença de etanol e ainda, nas interações odoríferas que são estabelecidas [42]. No conjunto, estas diferenças conferem características particulares a cada produto, influenciando as propriedades sensoriais apreciadas pelos consumidores como o sabor, odor e cor [38].

A maioria das substâncias voláteis vulgarmente presentes nos destilados pertencem à classe dos álcoois superiores, ácidos orgânicos, aldeídos ou ésteres [43]. Os demais compostos, devido à sua reduzida quantidade, são usualmente mais difíceis de serem determinados e quantificados, embora exerçam um papel relevante nos atributos sensoriais da bebida [40].

Os álcoois superiores representam o grupo mais abundante nos destilados, atribuindo-lhes aroma e características essenciais [44], [45]. Este grupo é particularmente importante pela sua ação solvente sobre outras substâncias voláteis aromáticas, interferindo no seu grau de volatilidade e, por conseguinte, nos seus limiares de deteção e perceção [46].

Os ésteres formam o maior grupo de compostos responsáveis pelos aromas das bebidas destiladas [40]. São conhecidos pelo seu aroma frutado e floral, razão pela qual são um dos grupos de compostos voláteis mais desejados nos destilados [26], [47]. Porém, o aumento do número de átomos de carbono dos ésteres afeta negativamente a qualidade organolética do destilado, conferindo-lhe um aroma a rancidez e cola [43]. A formação destes compostos está associada sobretudo à etapa fermentativa, embora a destilação e o envelhecimento influenciem a sua concentração final [48].

Os aldeídos podem ser formados através da oxidação de álcoois, degradação oxidativa de aminoácidos e auto-oxidação de ácidos gordos insaturados durante o processo de fermentação e envelhecimento da bebida [16]. Este grupo de compostos é geralmente menos abundante do que os álcoois e os ésteres, contudo apresenta um limiar de perceção baixo, podendo ser facilmente detetado pelo seu odor [49]. O acetaldeído representa 90 % do conteúdo total dos aldeídos no destilado e confere características sensoriais distintas consoante a sua concentração: em baixas concentrações este composto atribui um aroma frutado ao destilado; já em concentrações elevadas, o acetaldeído possui um odor pungente irritante [50].

Os ácidos orgânicos voláteis são fixadores de vários compostos aromáticos. Além disso, intervêm no controlo da estabilidade microbiológica das bebidas e são responsáveis, juntamente com os álcoois superiores, pelo corpo da bebida [21], [51]. O aroma das bebidas alcoólicas é particularmente afetado por ácidos de cadeia curta que se encontram, geralmente, em baixas concentrações nos destilados, e

possuem uma intensidade odorífera semelhante à exibida pelo ácido acético [52]. Contrariamente, os ácidos gordos de cadeia longa apresentam um efeito reduzido no *flavour* [53].

A influência de cada composto é bastante distinta, sendo comum os compostos presentes em quantidades vestigiais terem um efeito superior sobre as propriedades sensoriais da bebida, comparativamente com os compostos maioritários [39].

2.4 Análise sensorial

A qualidade da bebida não depende apenas do cumprimento das especificações estabelecidas na lei como também da aceitação do consumidor, de acordo com as características sensoriais percebidas. De facto, o aroma, o sabor e o aspeto visual da bebida destilada final são cruciais para a aceitação do consumidor pelo que devem ser controlados por análises sensoriais, que corresponde à principal forma de avaliar a aceitação das bebidas com base na percepção humana [35].

Existem diversos testes que podem ser utilizados para efetuar uma análise sensorial do produto, dentre os quais se destacam: testes discriminativos (triangular, duo-trio, ordenação, comparação pareada e comparação múltipla), testes descritivos (perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa) e teste afetivos (preferência, aceitação por escala hedónica, aceitação por escala ideal e intenção de compra). Resumidamente, os métodos discriminativos são realizados através de testes que irão indicar a existência ou não de diferença entre as amostras analisadas. São testes objetivos e que podem ser utilizados para controlo de qualidade e no desenvolvimento de novos produtos. Já os métodos descritivos, tal como o próprio nome indica, são testes que descrevem e quantificam as informações a respeito do parâmetro que está a ser avaliado (aparência, cor, odor e sabor), permitindo a caracterização do produto. Por último, os métodos afetivos consistem numa manifestação subjetiva do provador sobre o produto em análise, procurando apurar a preferência e o grau de satisfação com um novo produto, e/ou a probabilidade de o adquirir [35].

Cada um destes testes possui um objetivo diferente e os participantes são selecionados segundo critérios distintos. O método de teste deve ser cuidadosamente escolhido de modo a dar resposta às questões colocadas acerca do produto em análise [54].

Em oposição à maioria dos métodos de análise, que utiliza instrumentos e equipamentos, a análise sensorial é conduzida por um painel de indivíduos e depende das suas percepções sensoriais. Os provadores são selecionados de acordo com a acuidade sensorial que possuem para características críticas (paladar, odor, etc) do produto a ser avaliado. É desejável que estes provadores possuam

familiaridade com as características sensoriais do produto, uma vez que deste modo terão maior facilidade na descrição das características avaliadas. O número de membros do painel de provadores varia consoante o método de teste empregue, contudo, é aconselhável um número equivalente de homens e mulheres [35], [54]. A distribuição da idade do painel também deve ser tida em consideração dado que pode afetar os resultados [35].

2.5 Subprodutos da indústria cervejeira

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida como produto de fermentação do mosto de cereal maltado, acrescido ou não de adjuntos (outros cereais e/ou fontes de açúcar), com adição de lúpulo, por ação de leveduras [55]. A grande difusão e aceitação da cerveja tornaram-na uma das bebidas mais apreciadas e consumidas no mundo [11].

A indústria cervejeira produz anualmente uma quantidade considerável de subprodutos e resíduos [56] que têm, de igual modo, sofrido um incremento, em consequência do crescimento do setor verificado nas últimas décadas [57]. Entretanto, diversos avanços tecnológicos têm possibilitado uma minimização geral da formação dos subprodutos gerados ao longo do processo cervejeiro. Ainda assim, esta minimização nem sempre é possível, existindo determinados subprodutos inerentes à produção da bebida que dificilmente são restringidos. Entre estes encontram-se a drêche, o excedente de levedura e os resíduos de lúpulo (*trub*) [56], [58], que constituem os principais subprodutos cervejeiros. O seu descarte representa um desafio devido a diversas razões, nomeadamente: (1) elevada quantidade gerada, (2) baixo valor acrescentado, (3) dificuldade de armazenamento ocasionada pelo elevado teor de humidade e (4) poluição ambiental provocada pela sua eliminação em aterros ou queima [57].

A poluição derivada das atividades industriais decorrente da inutilização e descarte de subprodutos constitui uma das grandes preocupações atuais, motivo pela qual a maioria das empresas tem procurado reciclar os subprodutos gerados e reaproveitá-los como matéria-prima para outros processos [6]. No caso específico da indústria cervejeira, como grande parte dos subprodutos advém de produtos agrícolas, podem ser facilmente reciclados e reutilizados e, assim, valorizados [6], [58].

A drêche cervejeira, designada em inglês por *brewer's spent grain* (BSG), é o subproduto maioritário da indústria cervejeira [56], proveniente de uma das etapas iniciais de produção – a brassagem (Figura 1).

Durante a brassagem, a cevada maltada é moída, misturada com água e submetida a temperaturas gradualmente superiores a fim de promover a hidrólise enzimática dos constituintes do

malte. O objetivo deste processo de extração é hidrolisar os açúcares e algumas proteínas constituintes do malte conduzindo à obtenção de uma mistura aquosa de substâncias solúveis e insolúveis. Esta mistura é então sujeita a uma etapa de filtração, de modo a separar as referidas frações, uma vez que apenas a parte solúvel, denominada mosto, prossegue no processo de produção de cerveja, como meio fermentativo [55]. A fração sólida residual obtida é designada por drêche e pode representar mais de 30 %, em massa, do malte original, em consequência do carácter seletivo do processo cervejeiro, isto é, remoção de apenas alguns nutrientes do malte [6], [59].

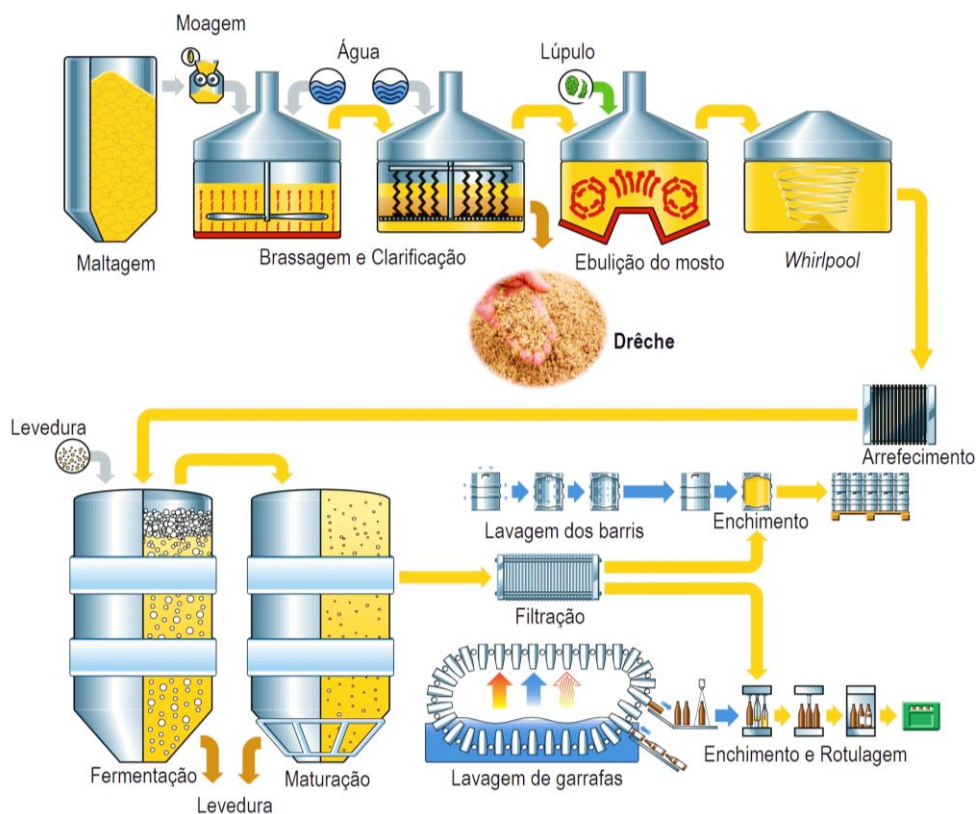


Figura 1 – Esquema do processo típico de produção de cerveja e formação da drêche cervejeira (adaptado de Wunderlich e Back, 2009 [55]).

2.5.1 Composição química da drêche

A drêche é essencialmente composta pela casca, tegumento e pericarpo dos grãos de cevada maltada, utilizados como principal matéria-prima na produção de cerveja. Em função do regime de produção selecionado poderá também estar presente algum endosperma de amido residual, paredes de células de aleurona vazias, bem como resíduos de lúpulo. Ademais, determinados tipos de cerveja

recorrem ainda a fontes alternativas de açúcar, nomeadamente cereais não maltados (arroz, milho, trigo, etc.) que podem, por conseguinte, serem encontrados na drêche [6], [56].

Este subproduto cervejeiro é considerado um produto heterogéneo cuja composição química pode variar entre as indústrias em função de diversos fatores, tais como a variedade de cevada utilizada e respetiva época da sua colheita, as condições empregues na maltagem e brassagem e com a qualidade e quantidade de lúpulo e adjuvantes adicionados [60].

A Tabela 2 apresenta a composição química da drêche descrita em diversos estudos e demonstra, nitidamente, a variação da constituição química deste subproduto em consequência dos fatores enumerados anteriormente. Independentemente destas variações, a drêche é considerada um material lenhinocelulósico, com um elevado teor de humidade (entre 75 % a 80 %) e rico em proteínas e fibras [6].

Tabela 2 – Composição química da drêche, em percentagem, obtida em diversos estudos

Componente	Kanauchi et al. 2001 [61]	Santos et al. 2003 [62]	Carvalho et al. 2004 [63]	Silva et al. 2004 [64]	Mussatto e Roberto 2006 [65]	Xiros et al. 2008 [66]	Jay et al. 2008 [67]	Meneses et al. 2013 [68]
Celulose	25,4	n.d.	21,9	25,3	16,8	12,0	31,0 a 33,0	21,7
Hemicelulose	21,8	n.d.	29,6	41,9	28,4	40,2	n.d.	19,2
Xilano	n.d.	n.d.	20,6	n.d.	19,9	n.d.	n.d.	13,6
Arabinano	n.d.	n.d.	9,0	n.d.	8,4	n.d.	n.d.	5,6
Amido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,7	10,0 a 12,0	n.d.
Proteínas	24,0	31,0	24,6	n.d.	15,2	14,2	15,0 a 17,0	24,7
Lenhina	11,9	16,0	21,7	16,9	27,8	11,5	20,0 a 22,0	19,4
Lípidos	10,9	3,0 a 6,0	n.d.	n.d.	n.d.	13,0	6,0 a 8,0	n.d.
Cinzas	2,4	4,0	1,2	4,6	4,6	3,3	n.d.	4,2
Extrativos	n.d.	n.d.	n.d.	9,5	5,8	n.d.	n.d.	10,7

Todos os valores estão expressos em percentagem mássica, em base seca; n.d., não determinado.

A celulose e a hemicelulose correspondem, tipicamente, a 50 % da composição da drêche. Desta forma, este subproduto alberga uma quantidade significativa de carboidratos fermentescíveis, dos quais a xilose, a glucose e a arabinose são os mais abundantes [6]. De igual modo, as proteínas e a lenhina também compreendem uma fração importante, sendo esta última constituída por componentes polifenólicos, em particular ácidos tais como ácido ferúlico, ácido *p*-coumárico, ácido siríngico, ácido vanílico e ácido *p*-hidroxibenzoico [69]–[71]. A drêche contém quantidades consideráveis de minerais,

extrativos e vitaminas. Os minerais presentes na drêche são diversificados, embora os mais abundantes sejam o silício, o fósforo e o cálcio. Encontra-se também descrito a presença de vitaminas, tais como a biotina, a colina, o ácido fólico, a riboflavina, entre outras, e de uma parcela de extrativos, que abrange as ceras, lípidos, amido, resina, taninos, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos [60].

Este subproduto cervejeiro está disponível a baixo custo e em grandes quantidades ao longo do ano, quer nas grandes cervejarias como nas pequenas [6]. De facto, estima-se que apenas na Europa sejam gerados, anualmente, mais de 3×10^9 kg de drêche [72].

Apesar das grandes quantidades produzidas o seu uso é limitado. O alto teor de humidade, a natureza orgânica e o elevado conteúdo em açúcares fermentescíveis fazem com que a drêche seja altamente suscetível a ataques microbianos e modificações químicas, com conseqüente perda de nutrientes e formação de produtos tóxicos [6]. Efetivamente, os grãos de cereais colhidos possuem uma microflora residente, decorrente de várias fontes, compreendendo bactérias e fungos, que podem causar problemas durante o armazenamento e tratamento do subproduto [73]. Por esta razão, a drêche deve ser imediatamente preservada após efetuada a sua recolha na cervejeira, a fim de evitar a deterioração microbiana [74].

Ao longo dos anos, foram propostos diversos métodos que objetivam esta preservação. A utilização de ácidos, tais como o ácido láctico, ácido acético e ácido fórmico e de compostos derivados de ácidos, como o sorbato de potássio, constitui um método de preservação química que assegura a manutenção da qualidade e valor nutricional da drêche. Alternativamente, a preservação poderá também ser feita via secagem, liofilização ou congelamento. Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, contudo nenhum deles reúne simultaneamente três características fundamentais: (1) ser economicamente viável, (2) possibilitar a estabilidade biológica do produto assim como a manutenção da sua qualidade nutricional e (3) permitir o processamento eficaz de quantidades consideráveis de drêche. A técnica de preservação selecionada pode afetar a composição química da drêche, em particular o conteúdo de arabinose e de proteínas [6].

2.5.2 Potenciais aplicações da drêche

Atualmente, a maioria da drêche produzida é utilizada para alimentação animal, em particular de gado, quer diretamente sob a forma húmida (resultante da filtração do mosto) ou após secagem [6], [56]. Porém, este destino exige gastos com a distribuição e transporte, além de usualmente ser vendido a baixo preço, representando um processo oneroso. Assim, o seu baixo valor comercial juntamente com os problemas associados com o seu descarte têm impulsionado a procura de formas de exploração

alternativas, quer pela indústria como pela comunidade científica [75]. Em função da sua composição química, a aplicação da drêche abrange as mais diversas áreas, como alimentação, produção de energia e processos químicos e biotecnológicos. Todas as aplicações apresentadas de seguida encontram-se descritas nos artigos de revisão de Mussatto et al. (2006) [6] e Mussatto (2014) [60].

No setor alimentar, a drêche é utilizada não só na alimentação animal como também na humana, onde é empregue como aditivo alimentar em farinhas para o fabrico de pão, bolos, *snacks*, bolachas e *waffles*, devido às propriedades benéficas deste subproduto para a saúde. A drêche possui na sua constituição quantidades significativas de proteínas ricas em glutamina, carboidratos não digeríveis (arabinoxilanos) e fibras que são capazes, entre outros benefícios, de regular o funcionamento da flora intestinal.

Em função do seu conteúdo em proteínas, polissacáridos e minerais, a drêche constitui também um substrato de elevado valor em biotecnologia. A sua aplicação neste ramo é variada, e inclui o uso como substrato para o crescimento de microrganismos e produção de enzimas, suporte de imobilização de biomassa, bem como agente antiespuma no processo cervejeiro. Adicionalmente, em virtude da composição rica em açúcares e fatores nutritivos, os hidrolisados obtidos a partir do drêche podem ser aproveitados em processos fermentativos a fim de produzir inúmeros compostos de interesse industrial como xilitol, arabitol, glicerol, ácido acético e etanol.

De igual modo, a drêche representa uma matéria-prima de interesse em processos químicos, possibilitando a obtenção (por extração) e produção (por reação química) de compostos de interesse industrial dos quais são exemplo os ácidos hidroxicinâmicos, os compostos fenólicos e os polissacáridos de hemicelulose e celulose.

Em consequência da crise de energia que o mundo vivencia atualmente, várias alternativas foram propostas para utilização da drêche na produção de energia incluindo a conversão termoquímica (pirólise, combustão), a produção de biogás e de etanol. A drêche apresenta um poder calorífico líquido e bruto considerável, o que a torna interessante para a produção de energia via combustão. Por outro lado, nos últimos anos, diversos investigadores têm procurado fontes alternativas aos derivados do petróleo, de modo a substituir estas fontes por outras mais sustentáveis. Dentro desta categoria encontra-se o etanol, que constitui uma fonte limpa e renovável. Atualmente, os níveis de produção mundial de etanol são elevados, sendo o milho a principal matéria-prima utilizada para esse fim. Entretanto, a produção de bioetanol a partir de matérias-primas não alimentares tem sido encorajada [76]. Com base nesta demanda, diversos materiais lenhino-celulósicos têm sido investigados, entre os quais a drêche, que graças ao seu elevado conteúdo em hemicelulose e em celulose é considerada uma matéria-prima

promissora para esta aplicação. A possibilidade de utilização da drêche como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração tem sido avaliada por diversos autores, empregando diferentes tipos de processos e estirpes microbianas.

Além da obtenção de compostos de valor acrescentado, a drêche tem sido empregue como matéria-prima para a produção de papel bioadsorvente e no tratamento de águas residuais.

Por outro lado, Meneses e seus colaboradores descreveram uma nova forma de reaproveitamento e valorização da drêche cervejeira, empregando-a como matéria-prima para a elaboração de uma bebida destilada [77]. Para tal, a drêche foi previamente submetida a um pré-tratamento por autohidrólise e o extrato obtido foi então suplementado com $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e $175 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de metabisulfito de potássio e, seguidamente, submetido a uma etapa de fermentação e destilação. Um total de 38 compostos voláteis foram identificados na bebida destilada obtida, que revelou qualidade organolética adequada para consumo humano, demonstrando, deste modo, a possibilidade atrativa e promissora de utilizar a drêche na indústria dos destilados. Contudo, a necessidade de suplementação com açúcar pode comprometer a viabilidade económica deste processo. De facto, até à data, não existe, ainda, no mercado nenhuma bebida produzida desta forma.

2.6 Produção de etanol a partir de materiais lenhinocelulósicos

Os materiais lenhinocelulósicos são a matéria orgânica mais abundante na natureza. Quanto à sua origem esta biomassa por ser classificada em: (i) florestal, que inclui as madeiras de folhosas, (eucalipto, carvalho, castanheiro, etc), as madeiras de coníferas (pinheiro, abeto, etc) e ainda resíduos da indústria do papel e da madeira; (ii) resíduos agrícolas (palha, caroço de espiga de milho, cascas, caules ou podas das árvores, etc); (iii) resíduos agroindustriais (drêche, bagaço de cana-de-açúcar, sementes de frutas, polpa, etc) e (iv) resíduos urbanos (papel de jornal e revistas, lixo doméstico, etc) [78]. A biomassa lenhinocelulósica constitui um substrato de baixo custo e apresenta uma estrutura complexa e recalcitrante, composta essencialmente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lenhina. A composição exata e a forma como estes polímeros se combinam entre si é altamente dependente do tipo de biomassa [79].

A celulose é um homopolissacárido linear com longas cadeias de glucose, unidas entre si por ligações glicosídicas. Os feixes de moléculas de celulose encontram-se agregados formando microfibrilas, onde existe uma alternância entre áreas com configuração ordenada e inflexível (região cristalina) e áreas menos ordenadas (região amorfa). Como consequência desta estrutura fibrilar e múltiplas ligações de

hidrogénio, a celulose apresenta uma estrutura altamente rígida e é insolúvel na maioria dos solventes [80].

Em contraste, a hemicelulose difere substancialmente da celulose por apresentar uma estrutura amorfa e ramificada, com cadeias laterais curtas, o que em combinação com o baixo peso molecular tornam este polímero relativamente fácil de hidrolisar. A hemicelulose é, usualmente, constituída por uma cadeia principal que pode conter a repetição de um único açúcar (homopolímero) ou a mistura de vários açúcares (heteropolímero). Este polissacárido pode ser composto por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glucose e galactose) e/ou ácidos urónicos (ácidos 4-O-metil-glucurónico e galacturónico) [80].

Por outro lado, a lenhina constitui um polímero aromático fenólico e hidrofóbico, que age como um material de ligação, envolvendo a hemicelulose e a celulose. As suas características tornam a biomassa impermeável e são responsáveis pela baixa reatividade dos materiais lenhinocelulósicos [80], [81].

As grandes quantidades de biomassa lenhinocelulósica podem ser potencialmente convertidas em diversos produtos de alto valor, incluindo etanol. De modo genérico, a produção de bioetanol engloba quatro grandes operações: pré-tratamento, hidrólise da celulose e da hemicelulose para produção de açúcares simples, fermentação dos mesmos e, finalmente, a recuperação e purificação do etanol produzido [22].

De seguida, serão abordadas, com maior detalhe, cada uma das etapas supramencionadas, enfatizando alguns desafios e aspetos específicos da produção de etanol a partir deste tipo de matéria-prima.

2.6.1 Tecnologias de pré-tratamento

A produção de bioetanol a partir de materiais lenhinocelulósicos requer, geralmente, a realização de uma etapa prévia de pré-tratamento, de modo a tornar a fração de carboidratos mais suscetível à ação das enzimas hidrolíticas e, por conseguinte, aumentar o rendimento em açúcares fermentescíveis libertados (Figura 2) [82]. De facto, a utilização da celulose na sua forma nativa consome elevadas quantidades de enzima e conduz a um baixo rendimento de digestão enzimática, inferior a 20 % do valor teórico [82].

O pré-tratamento é realizado com intuito de superar a recalcitrância da matriz lenhinocelulósica, através de uma combinação de alterações químicas e estruturais quer na lenhina como nos carboidratos. Concretamente, a implementação dos pré-tratamento visa limitar os principais fatores

inibidores da hidrólise enzimática, agindo sobre (1) cristalinidade da celulose, (2) porosidade e área superficial disponível, (3) conteúdo e estrutura da lenhina e (4) no teor e grau de acetilização da hemicelulose [83].

Ao longo dos anos, vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos e desenvolvidos. As tecnologias atualmente disponíveis incluem processos físicos (moagem, trituração, extrusão e micro-ondas); químicos (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, ozonólise, processo *organosolv* e líquido iônico); físico-químicos (explosão a vapor, autohidrólise, explosão de fibras com amoníaco, explosão com CO₂ e oxidação húmida) e biológicos (microrganismos decompositores), sendo também possível uma combinação destes métodos de pré-tratamento [83].

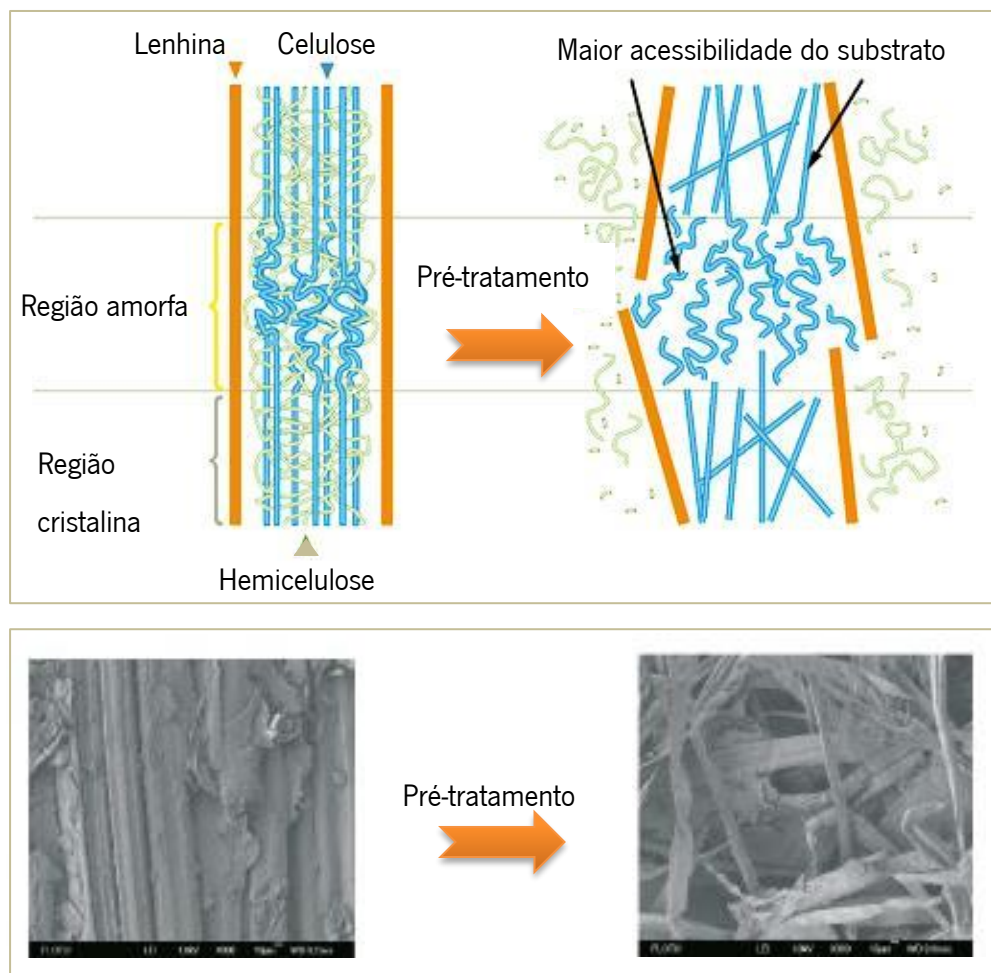


Figura 2 – Efeito do pré-tratamento sobre a estrutura dos materiais lenhinoceulósicos (adaptado de Mosier et al. 2005 [82]).

A escolha da tecnologia adequada de pré-tratamento, bem como das condições específicas, não é trivial, devendo ser considerado o padrão de libertação de açúcares e concentração de sólidos para

cada pré-tratamento, bem com a sua compatibilidade com o processo geral, matéria-prima, enzimas e organismos a serem aplicados [83].

O pré-tratamento possui um impacto significativo sobre a economia do processo, constituindo uma das etapas mais onerosas e com forte influência no custo das etapas situadas a montante e, em particular, a jusante (*i.e.* hidrólise enzimática e fermentação) [84].

Cada tipo de pré-tratamento altera de forma distinta a estrutura da biomassa e conduz a rendimentos distintos. Contudo, existem alguns atributos chave que devem ser tidos em consideração na seleção da tecnologia. Em teoria, um pré-tratamento efetivo pressupõe a (1) quebra do complexo lenhinocelulósico, (2) a diminuição do grau de cristalinidade da celulose, (3) a preservação dos açúcares de natureza hemicelulósica e da biomassa, (4) a maximização da conversão dos polissacáridos em açúcares fermentescíveis, (5) a minimização da formação de produtos de degradação dos açúcares, (6) baixo custo e consumo energético e (7) reduzido impacto ambiental [82].

O processo hidrotérmico (autohidrólise ou água líquida quente) representa um dos métodos mais promissores de pré-tratamento de materiais lenhinocelulósicos no conceito de biorrefinarias. Consiste num processo no qual a solubilização e rutura da estrutura da biomassa é alcançada pela utilização de água a alta temperatura e alta pressão (> 5 MPa) [79].

O mecanismo do pré-tratamento via autohidrólise é semelhante ao da hidrólise em meio ácido posto que ambos os processos são catalisados por iões hidroxilo (H_3O^+). Estes iões são gerados, numa primeira fase, pela autoionização da água e atuam como catalisadores, atacando as ligações éter heterocíclicas da hemicelulose, que são as mais suscetíveis a este tipo de reação. Como resultado, ocorre a quebra de unidades acetiladas de xilose, produzindo resíduos de ácido acético livre e, ainda, conduzindo à formação de oligossacáridos. O papel da autoionização da água está, no entanto, restringido às fases iniciais do processo. De facto, o ácido acético libertado também promove a formação de iões hidroxilo que catalisam a despolimerização da hemicelulose remanescente. Adicionalmente, o ácido urónico, o ácido fórmico e o ácido levulínico, também têm sido apontados como formadores de iões hidroxilo, embora o seu papel ainda não se encontre devidamente esclarecido [85].

Durante a autohidrólise, a água penetra a estrutura da célula, hidrata a celulose e despolimeriza a hemicelulose, conseguindo-se assim a dissolução de 40 % a 60 % da biomassa, com remoção de 4 % a 22 % de celulose, 35 % a 60 % de lenhina e a maioria da hemicelulose. É, portanto, notável que a autohidrólise afeta distintamente cada um dos constituintes dos materiais lenhinocelulósicos. De facto, este pré-tratamento representa um processo efetivo e adequado para a despolimerização da hemicelulose, possibilitando a recuperação de mais de 90 % sob a forma de açúcares monoméricos,

caso o líquido resultante do pré-tratamento seja submetido a uma pós-hidrólise ácida [82]. Dependendo das condições operacionais selecionadas, a hemicelulose pode ser decomposta em produtos de valor acrescentado tais como oligossacáridos e monossacáridos, ácido acético e em produtos resultantes da decomposição dos açúcares, como o furfural derivado das pentoses e o hidroximetilfurfural (HMF) proveniente das hexoses [86]. Por outro lado, o tratamento hidrotérmico em questão, provoca a quebra das ligações lenhina-hemicelulose, bem como a despolimerização parcial e redistribuição da lenhina na superfície do material. A fração de lenhina solubilizada durante o processo depende da severidade das condições reacionais selecionadas assim como da matéria-prima [86]. Contrariamente, o efeito da autohidrólise sobre a celulose é mínimo, em função da elevada resistência térmica do polímero. De acordo com Sakaki et al. (2002), a celulose começa a degradar-se em oligossacáridos e hexoses apenas quando a temperatura reacional é superior a 230 °C [87]. Ainda assim, a reatividade da celulose em relação às enzimas é significativamente melhorada, em virtude da remoção da hemicelulose e da realocização e alteração química da lenhina [79]. Após o pré-tratamento por autohidrólise formam-se então duas frações, uma fração sólida rica em celulose e lenhina e uma fração líquida composta essencialmente por água e açúcares provenientes da hemicelulose. É nesta última fração que se encontram, caso existam, os compostos inibitórios, em especial o furfural e o HMF [79].

A eficácia desta estratégia de pré-tratamento depende da interação entre alguns fatores como a temperatura, o tempo de exposição do material no reator e a carga de sólidos (também conhecida por razão líquido-sólido) [86]. A gama de temperatura na qual a autohidrólise é realizada situa-se entre os 150 °C e os 230 °C. Esta gama foi estabelecida com base no facto de, abaixo dos 100 °C se verificarem poucas reações hidrolíticas, e acima dos 230 °C, ocorrerem reações de degradação da celulose. Relativamente à razão líquido-sólido, valores entre 1 g·g⁻¹ a 40 g·g⁻¹ têm sido explorados, embora as condições mais frequentes se situem entre os 7 g·g⁻¹ e os 10 g·g⁻¹. A duração do pré-tratamento varia consoante a temperatura selecionada. Em ensaios realizados a elevadas temperaturas, o tempo de exposição do material é de apenas alguns segundos, aumentando para vários minutos ou até horas quando se opera a temperaturas mais baixas [85].

É essencial efetuar a otimização das condições operacionais, procurando estabelecer as condições ideais, uma vez que interferem diretamente no rendimento de recuperação dos principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lenhina), bem como na eficiência das subseqüentes etapas de sacarificação da celulose e de fermentação dos hidrolisados obtidos [86].

Estudos realizados ao longo do tempo têm demonstrado que a autohidrólise é um método eficiente para tratar diferentes tipos de materiais lenhinocelulósicos, incluindo materiais agrícolas e agroindustriais

como o caroço da espiga de milho [88], o bagaço de cana-de-açúcar [89], a palha de trigo [90] e de centeio [91].

A autohidrólise oferece muitas vantagens comparativamente com os outros métodos de pré-tratamento disponíveis. Trata-se de um processo bastante benéfico do ponto de vista económico e ambiental uma vez que evita o uso de reagentes químicos ambientalmente hostis, perigosos ou caros e opera sob condições suaves. Estas características permitem uma redução dos problemas de corrosão de equipamentos e uma diminuição dos custos operacionais, eliminando a necessidade de realização de etapa adicional de neutralização de químicos [86]. Além disso, este método destaca-se pela reduzida formação de produtos inibitórios. Efetivamente, a autohidrólise conduz à libertação de elevadas quantidades de açúcares hemicelulósicos maioritariamente sob a forma de oligómeros, que contribuem para a minimização da degradação não desejada [82]. Ainda assim, a autohidrólise não permite, tipicamente, alcançar rendimentos em açúcares tão elevados quanto os obtidos com ácidos mais fortes e apresenta elevados consumos de água e energia [79].

2.6.2 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada

Após a realização de um pré-tratamento bem-sucedido, a fração celulósica do material encontra-se mais suscetível ao processo de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentescíveis. Ao longo dos anos foram desenvolvidos múltiplos processos que possibilitam a hidrólise da celulose em glucose. Os processos mais usuais são a hidrólise ácida, que utiliza ácido sulfúrico concentrado ou diluído, e a hidrólise enzimática, na qual são empregues enzimas celulolíticas [92]. Apesar de dispendiosa, a hidrólise enzimática tem-se revelado mais adequada visto que requer menos energia, é um processo que ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH do que os processos químicos e exhibe elevada especificidade, minimizando a formação dos compostos inibitórios [93].

As enzimas do complexo celulolítico, coletivamente designadas de celulases, são hidrolases especializadas em quebrar ligações β -1-4-glicosídicas do glucano. Estas enzimas possuem uma atividade enzimática ótima situada entre os 40 °C e os 50 °C e pH entre 4 e 5. As formulações de celulases comercialmente disponíveis compreendem uma mistura de diversas enzimas, que trabalham sinergicamente para a eficiente degradação da celulose em açúcares mais simples [94]. De facto, existem pelo menos três grupos de celulases envolvidas no processo de hidrólise, que representam diferentes tipos de atividade enzimática: endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolases) e β -glucosidases.

As endoglucanases atuam de modo aleatório sob as regiões amorfas da cadeia de celulose, conduzindo à liberação de oligossacáridos de diversos comprimentos. Deste modo, estas enzimas são responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas, expondo novos terminais livres que serão locais de atuação das exoglucanases. Por sua vez, as exoglucanases hidrolisam as ligações glicosídicas existentes nas extremidades da celulose, produzindo celobiose como principal produto. Por fim, as β -glucosidases hidrolisam a celobiose, resultando na liberação de duas unidades de glucose por cada molécula de celobiose [93].

Além dos três grupos de enzimas celulolíticas acima mencionados, existem ainda outras enzimas que atacam a hemicelulose, nomeadamente a glucuronidase, a acetilesterase, a xilanase, a β -xilosidase, a galactomananase e a glucomananase [94].

Porém, a obtenção de uma alta eficiência de conversão de celulose em glucose pressupõe a adição de elevadas doses de enzimas comerciais dispendiosas, tornando imperativo a otimização da etapa de sacarificação enzimática. Neste sentido, é necessário procurar maximizar a carga operacional de sólidos empregue e minimizar, simultaneamente, a dose de enzima requerida. O incremento da carga de sólidos proporciona um aumento da concentração de açúcares resultantes e, conseqüentemente, de etanol, exercendo efeitos significativos nos custos do processo, em particular da destilação. Ademais, o menor teor de água permite diminuir a energia requerida para os processos de aquecimento e arrefecimento, bem como a água residual obtida [95]. Todavia, o incremento da concentração de substrato também acarreta desvantagens. Operar com uma alta carga de sólidos poderá causar uma diminuição da eficiência de conversão da celulose em glucose, resultando em rendimentos teóricos mais baixos do que os esperados [96]. Tal facto poderá ser explicado pela existência de limitações de transferência de massa decorrentes da elevada viscosidade do meio, que restringem o acesso enzimático a toda a celulose disponível, particularmente para cargas de sólidos superiores a 20 %, em massa. Além disso, ocorre ainda um aumento das concentrações de produtos finais e inibidores que podem provocar uma redução da atividade das enzimas e dos microrganismos fermentadores. Por último, a preservação de uma boa função catalítica da maioria das enzimas lenhinocelulolíticas requer a existência de uma quantidade mínima de água disponível, devido ao seu mecanismo hidrolítico de quebra das ligações glicosídicas [95], [96].

2.6.3 Estratégias de hidrólise enzimática e fermentação para a produção de etanol

A hidrólise enzimática e a conversão dos açúcares libertados em etanol podem ser realizadas segundo diferentes configurações processuais: em unidades independentes e de modo sequencial, num

processo denominado sacarificação e fermentação separadas (SHF); ou simultaneamente, de forma integrada, como é o caso dos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), sacarificação com co-fermentação simultânea (SSCF), bioprocesso consolidado (CBP) e sacarificação, filtração e fermentação simultâneas (SSFF) [97].

Cada uma destas estratégias envolve abordagens e níveis de complexidade distintos que se refletem em vantagens e limitações particulares [97]. Dentre as estratégias supramencionadas será apenas efetuada uma descrição mais detalhada das estratégias mais tradicionais — SSF e SHF.

A sacarificação e fermentação separadas é a concepção mais antiga e consiste em duas operações consecutivas. Primeiramente, os hidratos de carbono presentes na fase sólida do material pré-tratado são hidrolisados pela ação de enzimas. Seguidamente, a mistura de açúcares libertados, contendo hexoses e pentoses, é então convertida em etanol por ação de uma estirpe microbiana na etapa fermentativa. Ambos os processos podem operar sob as condições ótimas para o seu desempenho (temperatura, pH, teor de sólidos, composição nutricional), o que representa a maior vantagem do processo SHF, uma vez que a temperatura ótima de cada etapa varia significativamente. A maioria das enzimas celulolíticas possui uma temperatura ótima operacional entre os 45 °C e os 50 °C, enquanto grande parte das estirpes microbianas usualmente empregues (levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis*) produzem etanol de forma eficiente entre os 28 °C e os 37 °C [98], [99]. Além disso, e contrariamente ao que se verifica nos processos em simultâneo, o desempenho das enzimas não é afetado pela presença de etanol, e a viscosidade do meio é significativamente reduzida antes da fermentação, possibilitando uma eficiente mistura e transferência de nutrientes e calor. Esta característica afeta positivamente a viabilidade das estirpes microbianas e é particularmente importante em processos conduzidos com elevadas cargas de sólidos [99].

Em oposição, a sacarificação e fermentação simultâneas é uma estratégia que combina a hidrólise enzimática e fermentação numa só unidade, tendo sido apontada como superior ao processo de sacarificação e fermentação separadas, em termos de produção global de etanol. Além disso, a configuração SSF permite uma diminuição da complexidade do processo e dos respetivos custos operacionais graças à existência de uma única etapa [98]. Nesta forma de condução há uma minimização da inibição da celulase pelos produtos de hidrólise em virtude da glucose libertada ser concomitantemente fermentada. Como consequência deste consumo imediato de glucose, ocorre um deslocamento do equilíbrio das reações enzimáticas no sentido de formação de mais produto proporcionando, por sua vez, rendimentos mais elevados e uma produtividade de etanol superior, comparativamente com o processo de SHF. Por outro lado, os riscos de contaminação no sistema são

diminutos devido, em parte, às baixas concentrações de açúcar livre no meio supramencionadas e, ainda, à alta temperatura, presença de etanol e condições anaeróbicas [97], [98]. Em contrapartida, um dos maiores obstáculos inerentes ao processo SSF refere-se à necessidade de otimização iterativa da temperatura de operação. Esta dificuldade é geralmente ultrapassada através da diminuição da temperatura de hidrólise de modo a que seja compatível com a atividade do microrganismo, ou através da utilização de uma estirpe microbiana termotolerante [99].

Alternativamente, foi desenvolvido um processo híbrido, designado por sacarificação e fermentação híbridas (HSF – do inglês *hybrid saccharification and fermentation*), que envolve uma etapa de pré-hidrólise e inoculação tardia do microrganismo. Nesta estratégia, os hidratos de carbono são primeiramente hidrolisados com celulasas à sua temperatura ótima, e depois o meio reacional é arrefecido até à temperatura a que decorre a fermentação e, imediatamente, inoculado [99].

2.6.4 Recuperação e purificação do etanol

O produto final do processo de fermentação contém além de etanol e água, biomassa microbiana, açúcares não convertidos e diversos outros compostos. Por conseguinte, é necessária a realização de uma etapa subsequente de separação e purificação do etanol, sendo a destilação o método de eleição [22]. A destilação fracionada é um processo muito comum para separar o etanol da água com base nas suas diferentes volatilidades [100]. O princípio deste processo já foi descrito anteriormente na secção 2.2.3. Esta técnica de purificação apresenta custos elevados, que dependem da eficiência da hidrólise enzimática e da fermentação, e aumentam quando as concentrações de etanol são baixas. De modo a que a destilação seja economicamente viável, é necessária uma concentração mínima de etanol de cerca de 4 %, em volume [101]. No caso específico dos materiais lenhinocelulósicos a obtenção de tais concentrações de etanol requer, geralmente, a utilização de cargas de sólidos elevadas (> 15 %, em massa) [102], [103].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho envolveu o estudo de várias etapas processuais de produção de uma bebida destilada aromatizada: caracterização química de seis drêches, métodos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, fermentação, destilação e aromatização. A Figura 3 apresenta sinteticamente os métodos analíticos utilizados e o esquema global de todo o processo. Por uma questão de simplificação de escrita, a abreviatura BSG será utilizada para designar o termo “drêche”.

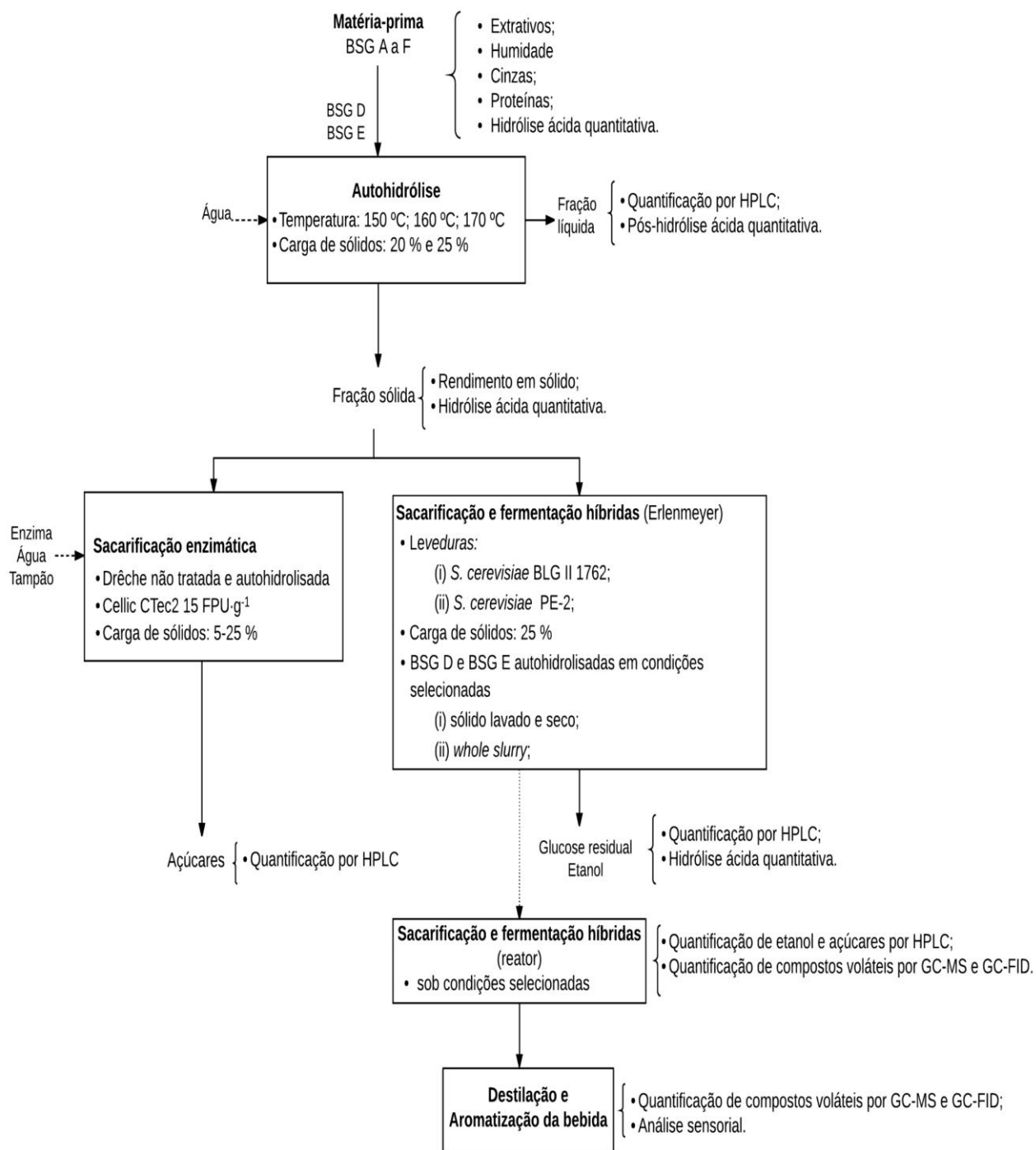


Figura 3 – Fluxograma de todo o processo e métodos analíticos utilizados neste trabalho.

3.1 Matéria-prima

As diversas drêches utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela microcervejeira Fermentum – Engenharia das Fermentações, Lda, sediada em Vila Verde, Portugal. Estas drêches provêm de seis processos cervejeiros artesanais distintos que empregam nas suas receitas quantidades e tipos diversificados de malte e adjuntos. A nomenclatura das cervejas tem por base o abecedário, existindo quatro cervejas base: a Letra A (*Weiss*), a Letra B (*Pilsner*), Letra C (*Stout*) e a Letra D (*Red Ale*); e duas cervejas de edição especial: a Letra E (*Belgian Dark Strong Ale*) e a Letra F (*India Pale Ale*).

As drêches foram recolhidas sob a forma húmida e secas numa estufa a 60 °C, até atingir um conteúdo de humidade inferior a 10 %.

3.2 Caracterização química das drêches

3.2.1 Determinação da humidade

A determinação da humidade foi realizada com recurso a uma balança de humidade (Radwag, MAC 50/1/NH), através de um programa de secagem automático.

A humidade das amostras foi determinada em triplicado para a caracterização química das seis drêches em estudo e sempre que necessário para as técnicas utilizadas, possibilitando os cálculos inerentes às análises químicas, numa base de matéria seca.

3.2.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação das cinzas de cada drêche foi realizada de acordo com a norma NREL/TP-510-42622 [104]. Para tal, colocou-se cadinhos de porcelana numa estufa a 105 °C, durante 24 h, seguido de arrefecimento em excicador e respetiva pesagem. Posteriormente, foi pesado 1 g de amostra para cada cadinho e procedeu-se à sua incineração numa mufla a 550 °C, por um período de 24 h. Após este passo, os cadinhos foram novamente arrefecidos num excicador e pesados. A quantidade de cinzas foi obtida através da Equação 2, pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, e foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial (base seca). As determinações foram feitas em duplicado.

$$\frac{\text{cinzas}}{\%} = \frac{m_{\text{cad+cinz}} - m_{\text{cad}}}{PMH \times (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

H = humidade da amostra (massa de água por massa de amostra húmida);

m_{cad} = massa do cadinho;

$m_{cad+cinz}$ = massa do cadinho com cinzas;

PMH = massa total da amostra húmida.

3.2.3 Determinação do teor de proteínas

A proteína total da matéria-prima foi estimada através do método de Kjeldahl, de acordo com o descrito por Labconco [105] recorrendo a um analisador de proteínas automático Kjeltec™ 8400 (FOSS Tecator™).

O procedimento prático consistiu em pesar 0,5 g de amostra previamente seca e colocá-la num tubo de digestão, juntamente com uma pastilha de selénio (catalisador) e 10 mL de H₂SO₄ concentrado (95 % a 97 %, em massa). As amostras preparadas foram colocadas na unidade de aquecimento do aparelho de digestão, com a respetiva cápsula de condensação de fumos e foram sujeitas a uma etapa de digestão, durante aproximadamente 1 h a 420 °C. Uma vez terminada a digestão e após arrefecimento da solução obtida, os tubos foram colocados na unidade automática de destilação. Brevemente, a operação envolveu a adição de uma solução de NaOH (400 g·L⁻¹) de modo a neutralizar o ácido e tornar básica a solução digerida. Os iões NH₃ assim libertados foram aprisionados numa solução de N₃BO₃ e titulados com um ácido forte, HCl 0,1 mol·L⁻¹. O conteúdo de azoto de Kjeldahl (N) foi calculado a partir da Equação 3.

$$\frac{N}{\%} = \frac{(V_a - V_b) \times M_{HCl} \times M_{N_2}}{PMH \times (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

V_a = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

V_b = volume de HCl gasto na titulação do branco;

M_{HCl} = concentração molar do HCl;

M_{N_2} = concentração molar do N₂.

A concentração de proteína foi calculada multiplicando o teor de azoto por um fator específico de conversão (6,25) [105].

3.2.4 Determinação do teor de extratíveis

O teor de extratíveis (*Ext*) de cada drêche foi determinado segundo a norma NREL/TP-510-42619 [106], utilizando uma mistura água/etanol, numa unidade de extração Soxtec™ 8000 (FOSS, Tecator, Hillerød, Dinamarca).

Primeiramente, foram tarados cartuchos de celulose e copos de alumínio numa estufa a 105 °C, durante 24 h, seguido de arrefecimento em excicador e respetiva pesagem. Posteriormente, acondicionou-se 3 g de amostra seca em cada cartucho e adicionou-se a mistura de etanol-água a 80 %, em volume, na garrafa de extração.

Após término do processo de extração, os cartuchos de celulose contendo as amostras desprovidas de compostos extratíveis (m_{se}), foram secos a 105 °C, até atingir peso constante, possibilitando o cálculo da percentagem de matérias extraíveis de acordo com a Equação 4.

$$\frac{Ext}{\%} = \frac{m_{se} - PMH}{PMH \times (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Ademais, os extratos resultantes foram submetidos a um processo de pós-hidrólise ácida e analisados por HPLC, para determinação do conteúdo de polissacáridos solúveis de glucose (secção 3.12). No que concerne à fração sólida, esta foi sujeita a uma hidrólise ácida quantitativa, para determinação do conteúdo em glucano, xilano, arabinano e lenhina (de acordo com a metodologia da Secção 3.2.5 e 3.2.6). Este procedimento foi realizado em duplicado.

3.2.5 Determinação de polissacáridos

A matéria-prima livre de extratíveis e os resíduos sólidos obtidos após autohidrólise foram sujeitos a um processo de hidrólise ácida quantitativa, conforme descrito na norma NREL/TP-510-42618 [107].

As amostras foram moídas com recurso a um moinho Taurus Aromatic (Ver II) 150 W, de modo a obter partículas com uma granulometria inferior a 0,5 mm. De seguida, pesou-se, aproximadamente, 0,5 g de amostra para tubos de ensaio, aos quais se adicionou 5 mL de H₂SO₄ a 72 %, em massa. Esta mistura foi incubada durante 1 h num banho termostático (Clifton, Alemanha), a 30 °C, com agitação periódica, utilizando uma vareta de vidro, a fim de promover a hidrólise dos polissacáridos a oligossacáridos. Após este período, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para frascos (Schott, Alemanha) de 250 mL e procedeu-se à adição de água destilada, de modo a diluir o ácido sulfúrico para

uma concentração final de 4 %, em massa. O conjunto foi pesado e autoclavado a 121 °C, durante 1 h visando a quebra dos oligossacáridos nos respectivos monómeros. Após o arrefecimento dos frascos, procedeu-se, novamente, à pesagem do conjunto, a fim de verificar a ocorrência de perdas durante o tratamento.

Por último, o conteúdo presente em cada frasco foi filtrado recorrendo a cadinhos de placa porosa (Robu[®], Alemanha), de porosidade 3, com auxílio de uma bomba de vácuo. Antes deste procedimento, os cadinhos foram tarados numa estufa a 105 °C, durante 24 h e arrefecidos num excicador durante pelo menos 1 h.

O filtrado obtido foi guardado em tubos falcon de 50 mL, para determinação do conteúdo de polissacáridos e, posteriormente, de lenhina ácida solúvel (secção 3.2.6). As concentrações de glucose, xilose e arabinose determinadas por HPLC foram utilizadas no cálculo das percentagens de glucano, xilano e arabinano, respetivamente. O conteúdo de polímeros (*CP*), em percentagem mássica de drêche, pode-se calcular mediante a Equação 5. Na hidrólise ácida quantitativa ocorre a degradação de uma pequena percentagem dos açúcares presentes, razão pela qual são introduzidos fatores de correção, de modo a considerar as perdas. Este procedimento foi realizado em duplicado.

$$CP = F_P \times C_E \times \frac{[A]}{\rho} \times \frac{P + (PMH \times H)}{PMH \times (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

F_P = fator de correção da degradação dos açúcares;

C_E = fator de correção estequiométrico (para ter em consideração o aumento de peso molecular durante a hidrólise);

$[A]$ = concentração mássica do monómero;

ρ = massa volúmica da dissolução analisada;

P = massa da dissolução analisada tendo em conta as perdas de água decorrentes da evaporação, durante a segunda etapa da HAQ;

Os valores habituais dos parâmetros F_P e C_E encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores *standard* dos parâmetros F_p e C_E dos polímeros glucano, xilano e arabinano

Fração	Espécie medida	F_p	C_E
Glucano	Glucose	1,04	162/180
Xilano	Xilose	1,09	132/150
Arabinano	Arabinose	1,09	132/150

3.2.6 Determinação da lenhina

A determinação dos teores de lenhina solúvel (*Acid Soluble Lignin* - ASL) e insolúvel (*Acid Insoluble Lignin* - AIL) foi efetuada de acordo a norma NREL/TP-510-42618 [107].

O teor de lenhina solúvel em ácido foi estimado através da análise espectrofotométrica da fração líquida remanescente da filtração, aquando a determinação dos polissacáridos. Para tal, procedeu-se à diluição do hidrolisado anteriormente obtido com H_2SO_4 a 4 % em massa, de modo a assegurar valores de absorvância inferiores a 1,0. Seguidamente, agitou-se bem as amostras, a fim de obter misturas homogêneas, e procedeu-se à leitura da absorvância a 205 nm (região dos ultravioleta), num espectrofotómetro de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments), utilizando como branco a referida solução de H_2SO_4 . Todas as amostras foram lidas em triplicado. O teor de lenhina solúvel em ácido de cada drêche foi determinado segundo a Equação 6.

$$\% ASL = \frac{UV_{abs} \times Volume_{filtrado} \times Diluição}{\varepsilon \times (PMH \times (1 - H)) \times \rho} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

UV_{abs} = média de absorvância para a amostra a 205 nm;

ε = constante de absorvidade;

ρ = massa volúmica da amostra.

Relativamente à respetiva fração sólida obtida na secção 3.2.5, esta foi submetida a uma etapa de lavagem, com cerca de 200 mL de água destilada, e seca a 105 °C, até atingir peso constante. O resíduo seco foi considerado como lenhina de Klason presente na matéria-prima. O resultado foi expresso em percentagem relativa à massa de amostra completamente seca conforme se apresenta na Equação 7

$$\% AIL = \frac{massa_{cadinho \text{ com resíduo insolúvel}} - massa_{cadinho}}{PMH \times (1 - H)} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

3.3 Pré-tratamento

Os pré-tratamentos por autohidrólise foram conduzidos num reator pressurizado de 2 L (Figura 4), de aço inoxidável (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), equipado com duas turbinas de quatro pás, uma manta de aquecimento externa e um controlador de temperatura PID, modelo 4842 (Parr Instruments Company, EUA).

As amostras de drêche foram pré-tratadas sob diferentes condições de temperatura (150 °C, 160 °C e 170 °C) e cargas de sólidos (20 % e 25 %, expresso em g de matéria-prima, em base seca, por 100 g de água), avaliando-se o efeito individual de cada uma destas variáveis operacionais na eficiência do pré-tratamento.

O procedimento experimental consistiu em pesar a quantidade adequada de drêche (80 g ou 100 g) e colocá-la no reator, juntamente com 400 mL de água destilada, de modo a obter a carga de sólidos desejada. A velocidade de agitação foi fixa a 150 min⁻¹ e o reator foi aquecido para atingir a temperatura alvo. Após 5 min à temperatura desejada (condições isotérmicas), o meio foi imediatamente arrefecido, por circulação de água fria na serpentina interna.

Após término do pré-tratamento obtém-se uma mistura, conhecida em inglês por *whole slurry*, que designa o conjunto líquido e sólido pré-tratados. A fração sólida foi recuperada e lavada com água destilada, através de diversos ciclos de centrifugação a 10000 g durante 15 min, 7 °C (Sigma 4K15), seguido de secagem numa estufa a 60 °C, durante dois dias. Após estes procedimentos, foi então possível determinar o rendimento em sólido (g de sólido recuperado por 100 g de matéria-prima, em base seca), analisar a composição química e avaliar a digestão enzimática da drêche pré-tratada. A análise da composição química incidiu sobre o conteúdo de polissacáridos (glucano, xilano e arabinano) e lenhina, seguindo a metodologia já descrita.

Paralelamente, analisou-se a respetiva fração líquida proveniente da autohidrólise, mediante a recolha de duas alíquotas. Uma das alíquotas foi diretamente analisada por HPLC, para o doseamento da concentração de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural (secção 3.11). A outra alíquota foi submetida a um processo de pós-hidrólise ácida e a analisada por HPLC para quantificação dos oligossacáridos (secção 3.12). Para os ensaios posteriores de HSF foram também preservados *whole slurries* do pré-tratamento.

Com base nas concentrações de glucose, xilose e arabinose foi possível determinar a percentagem de polímero (glucano, xilano, arabinano e lenhina) que permanece no sólido pré-tratado e que é extraída para o licor, conforme descrito no Anexo I.



Figura 4 – Reator pressurizado (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA), utilizado para efetuar o processo de autohidrólise da drêche.

3.4 Sacarificação enzimática da matéria-prima e da drêche autohidrolisada

Todas as reações de hidrólise enzimática foram realizadas a 50 °C, pH 4,8, em frascos Erlenmeyer de 100 mL (volume de trabalho de 50 mL), com uma agitação de 200 min⁻¹. Estes ensaios foram conduzidos com uma carga enzimática de 15 FPU·g⁻¹ de biomassa, de uma mistura comercial de celulases “Cellic CTec2” de *Trichoderma reesei* (Novozymes, Dinamarca). O *cocktail* enzimático utilizado apresentava uma atividade celulásica total de 120 FPU·mL⁻¹, em formato não diluído, determinada de acordo com o procedimento analítico proposto por Ghose (1897) [108]. As experiências foram preparadas pela mistura da quantidade adequada de substrato (drêche não tratada ou tratada) com tampão citrato de sódio a 0,05 N e água (quando necessário) seguido de esterilização desta suspensão em autoclave, a 121 °C por 15 min e subsequente arrefecimento e adição da enzima. As sacarificações foram acompanhadas através da recolha periódica de amostras, para a determinação da concentração de açúcares por HPLC, com exceção dos ensaios realizados com maior carga de sólidos (*i.e.*, 25 %),

onde a amostragem só foi possível no final da sacarificação. Os sólidos remanescentes foram submetidos a uma hidrólise ácida quantitativa com o objetivo de estimar a fração de açúcares não sacarificada.

A eficiência de todas as sacarificações enzimáticas foi determinada exclusivamente através dos rendimentos de glucose alcançados. As concentrações de glucose inicialmente presentes no *cocktail* enzimático também foram determinadas por HPLC e subtraídas ao rendimento em glucose, possibilitando um cálculo preciso da percentagem de rendimento teórico alcançado, expresso como % do conteúdo total de glucose da drêche não tratada ou do resíduo pré-tratado gerado antes da sacarificação (hidrólise da drêche pré-tratada).

3.5 Estirpes microbianas e preparação do inóculo

As estirpes selecionadas para a produção de etanol foram a *S. cerevisiae* Wyeast 1762, Abbey II belga (Wyeast Laboratories Inc.), uma levedura cervejeira, e a *S. cerevisiae* PE-2, uma levedura isolada da indústria brasileira de bioetanol [109], [110]. A levedura cervejeira foi mantida em meio YPD líquido formulado por glucose (20 g·L⁻¹), peptona (20 g·L⁻¹) e extrato de levedura (10 g·L⁻¹), a -80 °C. A estirpe de bioetanol foi preservada a 4 °C em placas YPD agar.

A preparação de ambos os inóculos foi efetuada através da transferência assética de células da respetiva cultura *stock*, para frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio YPD, seguido de crescimento a 30 °C, 200 rpm por 24 h. Para a inoculação em biorreator preparou-se 500 mL de YPD e procedeu-se de modo idêntico. Decorridas 24 h de crescimento, a suspensão celular foi centrifugada (10000 g, 10 min, 7 °C) e ressuspensa numa solução de NaCl a 9 g·L⁻¹, para atingir uma concentração final de levedura fresca de 200 g·L⁻¹.

Os ensaios de fermentação foram inoculados com uma concentração celular de levedura fresca de 7 g·L⁻¹.

3.6 Sacarificação e fermentação da drêche pré-tratada

Amostras de biomassa pré-tratadas hidrotermicamente foram empregues como substrato para a produção de etanol por um processo de Sacarificação e Fermentação Híbrida (HSF).

A etapa de hidrólise enzimática foi conduzida de modo idêntico ao descrito anteriormente na secção 3.4, utilizando-se os mesmos parâmetros operacionais. A particularidade destes ensaios assentou no uso exclusivo de cargas de sólidos comercialmente relevantes (25 % de sólidos, em massa) e na

utilização do resíduo sólido lavado e da suspensão integral (*whole slurry*) obtidos após pré-tratamento por autohidrólise em condições selecionadas. Decorridas, aproximadamente, 120 h de sacarificação, a temperatura e a agitação foram diminuídas e mantidas a 30 °C e 150 min⁻¹, respetivamente, para a adição da levedura e início da fase fermentativa. As condições anaeróbias foram alcançadas pelo uso de rolhas de borracha equipadas com glicerol *airlock*, que possibilitam a libertação de CO₂ e impedem a entrada de O₂. A progressão da fermentação foi avaliada através do registo da perda de peso, equivalente à produção de CO₂ na fermentação e diretamente associada à conversão dos açúcares em etanol e CO₂. Assim, os balões Erlenmeyer foram pesados com precisão, em intervalos frequentes, até atingir um peso constante, indicativo do fim da fermentação. Após término da fermentação, recolheram-se amostras para quantificação da glucose e do etanol por HPLC.

Os resultados foram expressos em termos de concentração mássica de etanol e de rendimento mássico em etanol (Y_{EtOH} , etanol relativamente ao etanol potencial), utilizando a seguinte equação:

$$Y_{EtOH} = \frac{[EtOH]_f - [EtOH]_i}{0,511 \times [Gluc]_{pot}} \quad \text{Equação 8}$$

Onde,

$[EtOH]_f$ = concentração de etanol no final da fermentação;

$[EtOH]_i$ = concentração de etanol no início da fermentação, que deverá ser zero;

0,511 = fator estequiométrico de conversão de glucose em etanol;

$[Gluc]_{pot}$ = concentração de glucose potencial presente na matéria-prima.

3.7 Ensaios em reator

Após ser apurada a melhor configuração processual para a produção de etanol procedeu-se a ensaios em reator, visando obter um volume suficiente de fermentado para a etapa de destilação.

Os ensaios foram conduzidos num biorreator de 3,7 L (Bioengineering Ralf, Suíça) com um volume útil de 1,2 L, equipado com sistema eletrónico de controlo de temperatura, agitação, pH e oxigénio, após esterilização (121 °C, 20 min) do reator carregado com a drêche E.

O bioprocesso realizado iniciou-se com uma etapa de pré-hidrólise, seguida de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* Wyeast 1762, Abbey II belga, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Ao longo da fermentação foram retiradas amostras periodicamente para quantificação de

glucose e etanol, possibilitando a determinação do fim de etapa fermentativa. Após a fermentação, o conteúdo do reator foi centrifugado (10000 *g*, 15 min, 7 °C) para separação da biomassa e o sobrenadante foi armazenado à temperatura de 4 °C para posterior análise química (compostos voláteis) e destilação. Foram realizados dois ensaios independentes.

3.8 Destilação

A destilação do meio fermentado livre de biomassa foi realizada utilizando um sistema composto por uma coluna de destilação fracionada, um condensador, um balão de 2 L e uma manta de aquecimento.

Diferentes frações do destilado foram recolhidas a diferentes temperaturas. As frações iniciais foram recolhidas entre 60 °C e 70 °C, as frações intermédias entre 78 °C e 80 °C, e as últimas frações foram recolhidas a temperaturas entre os 90 °C e os 100 °C. Todas as frações recolhidas foram analisadas por HPLC para determinação da concentração de etanol presente (secção 3.11). As frações que detinham uma percentagem volúmica de etanol superior a 30 % foram misturadas. A concentração de etanol da referida mistura foi retificada através da adição de frações com percentagens de etanol mais baixas, visando obter um destilado com um teor alcoólico volúmico situado entre os 45 % e os 50 %. Cada destilado obtido foi guardado em frascos de vidro selados, a 4 °C, para posterior análise química (secções 3.13) e aromatização (secção 3.9).

3.9 Aromatização

A aromatização de cada destilado foi efetuada através da adição de aparas de madeira de carvalho americano (Vinoferm, Bélgica) de tosta média/forte, numa concentração final de 30 g·L⁻¹. O contacto foi promovido através de agitação orbital (150 min⁻¹), a uma temperatura de 20 °C, por um período de 5 dias. Os destilados aromatizados foram guardados a 4 °C, para posterior análise química e sensorial.

3.10 Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada por um conjunto de provadores não treinados composto por 5 voluntários recrutados, do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 30 e os 60 anos. A folha de prova fornecida encontra-se no Anexo II. Os provadores receberam duas amostras (relativas a cada

um dos destilados) e avaliaram os atributos de aparência, aroma, sabor, sensação nasal/gustativa e impressão global, de acordo com uma escala estruturada de 6 pontos, variando de zero (“ausência”) a cinco (“muito forte”). O teste foi realizado com luz branca e temperatura ambiente ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Cada provador recebeu cerca de 10 mL de cada destilado (Figura 5). Foi calculada a intensidade relativa (I) e a frequência relativa (F) dos diversos descritores, para cada destilado. A intensidade corresponde à média da soma das intensidades atribuídas pelo painel para um dos descritores e a frequência designa o número de vezes que o descritor foi mencionado a dividir pelo número máximo que poderia ser mencionado.

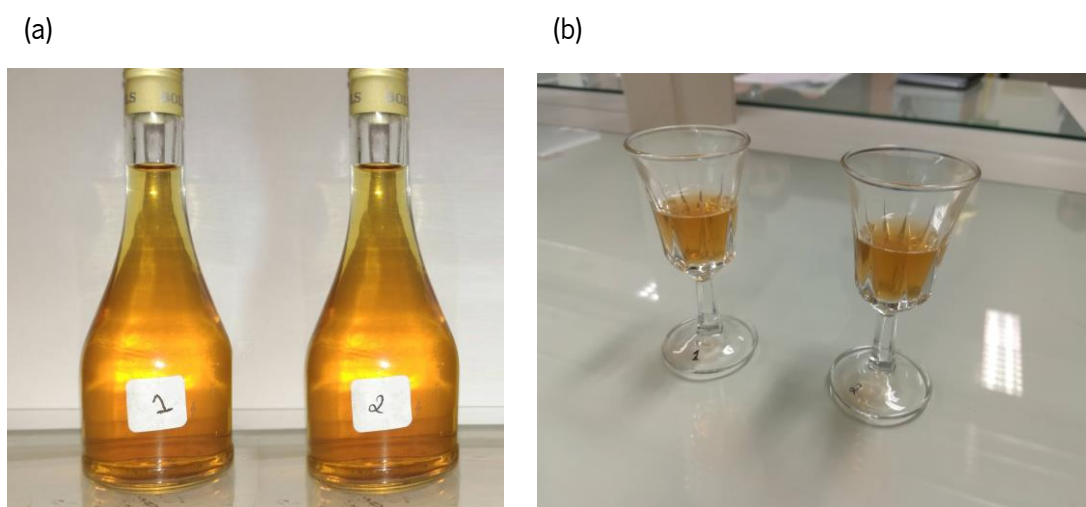


Figura 5 – Destilados aromatizados 1 e 2 (a) e respectivas amostras de 10 mL (b) fornecidas a cada membro do painel de provadores.

3.11 Quantificação de monossacáridos, ácido acético, etanol e compostos furânicos

A determinação da concentração de glucose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF), furfural e etanol foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando uma coluna Aminex HPX-87H (BioRad), a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. O eluente utilizado foi uma solução aquosa de ácido sulfúrico $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, a um caudal de $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e um volume de injeção de $20\text{ }\mu\text{L}$. O furfural, o HMF e o ácido acético foram quantificados a 210 nm , utilizando um detetor de UV (Knauer). Todos os restantes compostos foram quantificados através de um detetor de índice de refração-IR (Knauer).

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros porosidade de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore®). As concentrações dos compostos analisados foram determinadas a partir de curvas de

calibração construídas a partir de soluções padrão, numa gama de concentrações que variou, no máximo entre $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.12 Determinação do teor de oligossacáridos e de polissacáridos solúveis de glucose

O doseamento dos oligossacáridos e do teor de polissacáridos solúveis de glucose dos extratos (secção 3.2.6) foi efetuado através da mistura 5 mL de licor ou de extrato, respetivamente, com H_2SO_4 72 %, em massa, de modo a obter uma concentração final do referido ácido de 4 %. Em seguida, as amostras foram autoclavadas, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 1 h. Após o arrefecimento, as amostras foram filtradas e analisadas por HPLC. Este procedimento de hidrólise foi realizado em duplicado.

As concentrações dos oligossacáridos foram determinadas através da diferença de concentração do respetivo monossacárido (quantificada por HPLC) antes e após pós-hidrólise, tendo em consideração os respetivos fatores anidros. Já o conteúdo de polissacáridos solúveis de glucose foi calculado a partir da concentração de glucose no extrato e do respetivo fator de conversão anidro, 0,9, que considera a remoção de uma molécula de água durante as ligações covalentes das moléculas de glucose necessárias para formar o respetivo polissacárido.

3.13 Quantificação dos compostos voláteis

3.13.1 Compostos voláteis maioritários

A quantificação dos compostos voláteis maioritários dos destilados foi realizada por injeção direta num cromatógrafo gasoso (Chrompack CP-9000) equipado com um injetor *split*, um detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar Meta-Wax ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.}$, espessura do filme $0,20 \text{ }\mu\text{m}$; Teknokroma). A temperatura do injetor e do detetor foram colocadas a $250 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura do forno foi mantida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, tendo sido depois programada para aumentar de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até $220 \text{ }^\circ\text{C}$, a uma velocidade de $3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, onde permaneceu por mais 5 min. O gás de arraste empregue foi o hélio, a um fluxo inicial de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (75 kPa). As análises foram feitas injetando $1 \text{ }\mu\text{L}$ em modo *split* ($15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). A quantificação foi alcançada por adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de 4-nonanol (padrão interno, com uma concentração inicial de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a 5 mL de amostra. A determinação da concentração dos diversos compostos foi realizada utilizando o *software* Star-Chromatography Workstation versão 6.41 (Varian),

tendo em consideração o fator de resposta do detetor para cada composto e comparando o seu tempo de retenção com o do respectivo padrão puro.

3.13.2 Compostos voláteis minoritários

Os compostos voláteis minoritários foram analisados por GC-MS após a realização de uma etapa prévia de extração.

Em tubos de 10 mL (Pyrex, ref. 1636/26 MP) adicionou-se 8 mL de amostra, 400 µL de diclorometano e 100 µL de um padrão interno – 4-nonanol (com uma concentração inicial de 24,64 µg·mL⁻¹). Após a preparação da mistura, adicionou-se uma barra magnética a cada tubo e promoveu-se a agitação, por um período de 15 min, com recurso a uma placa de agitação magnética (IKA® RO 10). De seguida, os tubos foram arrefecidos a -20 °C, durante 15 min e procedeu-se à remoção das barras de agitação magnética. A fase orgânica foi separada através de um ciclo de centrifugação (ScanSpeed 416, Triad Scientific), 2500 min⁻¹, 10 min. O extrato foi recuperado, com recurso a uma pipeta de *Pasteur*, e transferido para um *vial* com sulfato de sódio anidro, promovendo a sua desidratação. Após esta etapa, o extrato aromático desidratado foi transferido para um novo *vial* e analisado.

A análise dos compostos voláteis minoritários foi efetuada por GC-MS, constituído por um cromatógrafo (Varian 3800), equipado com um injetor 1079 e um detetor de massa do tipo *ion-trap* (Varian Saturn 2000). Injetou-se 1 µL de amostra em modo *splitless* (30 s) numa coluna Sapiens-Wax MS Teknokroma (30 m × 0,15 mm, espessura do filme de 0,15 µm). O gás de transporte utilizado foi o hélio, a um fluxo constante de 1,3 mL·min⁻¹. O detetor foi programado para o modo de impacto eletrónico, com uma energia de ionização de 70 eV, e uma gama de aquisição entre 35 m·z⁻¹ e 300 m·z⁻¹. A temperatura do forno foi inicialmente ajustada para 60 °C, durante 2 min e de seguida aumentada para 234 °C a 3 °C·min⁻¹, de 234 °C para 250 °C a 10 °C·min⁻¹ e, finalmente mantida a 250 °C durante 10 min. Os compostos foram identificados com recurso ao *software* Star-Chomatography Workstation versão 6.9.3 (Varian), comparando os seus espectros de massa e índices de retenção com os do respectivo padrão puro. Cada composto volátil minoritário foi quantificado em termos de equivalentes de 4-nonanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química das diversas drêches cervejeiras

A produção da cerveja artesanal (*craft beer*) recorre tipicamente a uma variedade de receitas. Fatores como tipos de malte e levedura, proporções de cereais, condições de maltagem e brassagem, qualidade e quantidade de lúpulo são frequentemente manipulados para originar os diversos estilos de cerveja e obter um produto único/distinto. Independentemente da escala, o processo de produção de cerveja produz inevitavelmente subprodutos e resíduos, dos quais se salienta a drêche cervejeira. A valorização deste subproduto tem sido largamente explorada face à sua composição química. Atendendo às variações processuais inerentes à produção de cerveja artesanal, em particular tipo de malte e condições de brassagem, é expectável que as respetivas drêches obtidas sejam quimicamente heterogêneas. Dito isto, o conhecimento das características físico-químicas da matéria-prima apresenta suma importância, ajudando na seleção da biomassa para o processamento adicional e obtenção de produtos de valor acrescentado.

Assim, com a finalidade de avaliar a potencial utilização de drêche como matéria-prima para a produção de uma bebida destilada, efetuou-se a caracterização química de seis drêches (A a F) originadas a partir de diferentes receitas de cerveja artesanal. A percentagem em peso seco de glucano, xilano, arabinano, lenhina, proteínas, cinzas e extrativos de cada drêche encontra-se apresentada na Tabela 4.

O teor de humidade inicial das drêches foi de aproximadamente 75 %, em massa, concordante com o descrito anteriormente por outros autores [74], [111]. Para a realização de todos os ensaios efetuados procedeu-se, no entanto à secagem da drêche até à obtenção de um teor de humidade inferior a 10 %.

Conforme pode ser observado na Tabela 4, os hidratos de carbono são os componentes mais representativos da drêche com valores situados entre os 42 % a 49 %, aos quais se seguem os extrativos e as proteínas. Os hidratos de carbono mencionados incluem o glucano, o xilano e o arabinano presumivelmente sob a forma de fibras (celulose e hemicelulose) e polissacáridos solúveis de glucose.

Tabela 4 – Composição química de drêches (BSG), apresentada em concentração mássica em base seca (C_{BSG}), originadas a partir de seis receitas diferentes (A a F). Os resultados estão representados como a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes

Componentes ($C_{BSG}/\%$)	BSG A	BSG B	BSG C	BSG D	BSG E	BSG F
Glucano total	26,6 \pm 0,7	26,5 \pm 0,5	28,6 \pm 2,3	31,3 \pm 1,6	32,1 \pm 1,9	29,0 \pm 0,7
Polisacáridos solúveis de glucose	3,4 \pm 0,3	2,2 \pm 0,3	2,9 \pm 0,7	2,2 \pm 0,7	7,6 \pm 0,7	2,9 \pm 0,7
Xilano	11,5 \pm 0,2	10,6 \pm 0,3	9,1 \pm 0,2	12,5 \pm 0,8	7,0 \pm 0,5	10,9 \pm 0,4
Arabinano	5,8 \pm 0,3	5,2 \pm 0,4	4,4 \pm 0,0	5,3 \pm 0,5	2,6 \pm 0,1	5,1 \pm 0,2
Lenhina Total	11,0 \pm 0,3	11,4 \pm 0,5	14,5 \pm 0,8	12,1 \pm 1,0	8,9 \pm 0,6	9,9 \pm 0,2
Lenhina de Klason	7,7 \pm 0,2	8,8 \pm 0,3	11,7 \pm 0,7	9,1 \pm 0,8	6,7 \pm 0,4	7,0 \pm 0,2
Lenhina solúvel	3,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
Proteínas	19,1 \pm 0,2	19,9 \pm 0,5	18,1 \pm 0,5	20,2 \pm 0,1	14,3 \pm 0,9	17,2 \pm 0,9
Cinzas	2,87 \pm 0,05	3,73 \pm 0,08	2,89 \pm 0,05	3,47 \pm 0,07	1,93 \pm 0,04	2,85 \pm 0,03
Extrativos	22,5 \pm 1,1	19,6 \pm 0,7	19,7 \pm 0,9	12,9 \pm 0,4	29,8 \pm 2,2	21,7 \pm 0,5

O glucano (polissacárido de D-glucose) é o constituinte mais abundante de todas as drêches avaliadas. O glucano proveniente de fibras registou valores compreendidos entre 23,2 % e os 29,1 % da matéria-prima. Apesar do presente estudo não ter contemplado a origem deste glucano, sabe-se que a maioria da glucose deriva de celulose, existindo, no entanto, uma percentagem mínima que pode provir de β -glucano [6], [58]. Além do glucano derivado de fibras, polissacáridos solúveis de glucose também foram encontrados na fração de extrativos e contribuem para a glucose potencial das drêches. Em geral, durante o processo de brassagem ocorre hidrólise dos açúcares presentes nos maltes, que são convertidos a oligossacáridos e açúcares simples deixando, por conseguinte, a drêche pobre nestes nutrientes. Contudo, a percentagem de hidratos de carbono encontrada na drêche é dependente da eficiência da etapa de brassagem. Considerando que os métodos de produção de cerveja artesanal recorrem a configurações processuais e metodologias que conduzem a menores eficiências de brassagem, o grão gerado por esses processos será, conseqüentemente, “menos esgotado”, possuindo maior teor de glucano não convertido. A caracterização química da fração de extrativos em relação aos açúcares, revelou a existência de polissacáridos solúveis de glucose, que representavam entre 2,2 % a 3,4 % da matéria prima, salvo na drêche E, a qual se destaca com 7,6 % da matéria-prima. A drêche E deriva do processo de produção de uma cerveja de alto extrato e teor alcoólico, que utiliza quantidades de malte superiores às restantes cervejas, podendo justificar a maior concentração de polissacáridos solúveis de glucose não convertidos e, conseqüentemente, encontrados na drêche. De modo geral, o teor total de glucano das drêches em estudo excede os valores tipicamente apontados na literatura (12,0 % a 26,0 % da drêche) [61], [64]–[66], [68], [112], providenciando uma maior quantidade de glucose passível de ser fermentada e convertida em etanol. Estas evidências sugerem que as drêches estudadas, oriundas de um processo de produção *craft*, constituem uma boa matéria-prima para a produção de etanol.

Além dos polissacáridos solúveis de glucose, a fração de extrativos compreende uma variedade de compostos orgânicos, inclusive ceras, lípidos, resina, taninos, óleos essenciais e outros constituintes citoplasmáticos [113]. O teor de extrativos das drêches estudadas situa-se entre os 12,9 % e os 29,8 %. Entre as drêches caracterizadas, o maior conteúdo de extrativos foi verificado na BSG E, enquanto o mais baixo foi obtido na BSG D.

O xilano e o arabinano constituem frações menos significativas de polissacáridos. Geralmente, o conteúdo de hemicelulose (xilano + arabinano) é igual ou superior ao de glucano [63], [114]. Todavia, os resultados obtidos neste estudo contrapõem esta tendência. De acordo com os trabalhos de caracterização química existentes, a drêche apresenta teores de xilano entre os 13,6 % e os 20,6 % [63],

[65], [68]. Estes valores são notoriamente superiores aos observados neste trabalho, cujas drêches revelaram um conteúdo de xilano compreendido entre 7,0 % e os 11,5 %, em consequência do seu elevado conteúdo de glucano e extrativos. De igual modo, o teor de arabinano também foi inferior à gama anteriormente reportada, com valores situados entre os 2,6 % e os 5,8 % [63], [115]. Como se pode observar na Tabela 4, a maioria das drêches é relativamente semelhante no que respeita ao teor de xilano e de arabinano, à exceção da drêche E que exhibe teores visivelmente inferiores para ambos os polissacáridos.

As proteínas são o terceiro componente mais abundante na constituição das drêches representando entre 14,3 % a 20,2 % do seu peso seco, com a drêche E a registar o valor mais baixo. Estes valores são próximos da gama apresentada na literatura (com percentagem mássica situada entre os 14,2 % e 31,0 %) [61], [62], [64]–[66], [112].

Dada a sua natureza lenhinocelulósica, as drêches apresentam também quantidades consideráveis de lenhina (lenhina de Klason e lenhina solúvel em ácido), variando entre 8,9 % e 14,5 %. A maior proporção em massa do teor de lenhina é ocupada pela lenhina de Klason (insolúvel em ácido), parcela esta que é responsável pelas diferenças no conteúdo de lenhina observado entre as distintas drêches estudadas.

Além dos polissacáridos, extrativos, proteínas e lenhina, a drêche contém também pequenas quantidades de cinzas, que incluem uma variedade de minerais. Esta constitui a fração menos expressiva na composição química das seis drêches, com valores situados entre 1,93 % e 3,73 % da drêche.

Os valores obtidos para a composição química das seis drêches estão, de um modo geral, dentro da faixa dos valores encontrados na literatura, destacando-se um maior teor de glucano. Esta característica, aliada à considerável concentração de proteínas (fonte de azoto), torna as drêches em estudo bastante promissoras para a produção de etanol, dado que o glucano pode ser convertido em açúcares fermentescíveis e posteriormente em etanol através da utilização de leveduras comerciais, sem necessitar de qualquer tipo de suplementação nutricional. Por outro lado, a composição das diferentes drêches revelou-se consideravelmente heterogénea, o que demonstra a importância do tipo de cerveja nas características da drêche gerada no seu fabrico.

4.2 Sacarificação enzimática direta das drêches cervejeiras

Considerando a existência de uma fração de açúcar já acessível, sob a forma de polissacáridos solúveis de glucose, foram realizados ensaios de sacarificação enzimática direta visando avaliar a suscetibilidade do material não tratado. Os perfis de sacarificação obtidos para as seis drêches, após 120 h de hidrólise, encontram-se ilustrados na Figura 6. Para a realização destes ensaios selecionou-se uma carga de sólidos baixa (5 %, em massa), de modo a beneficiar eficiência da hidrólise enzimática.

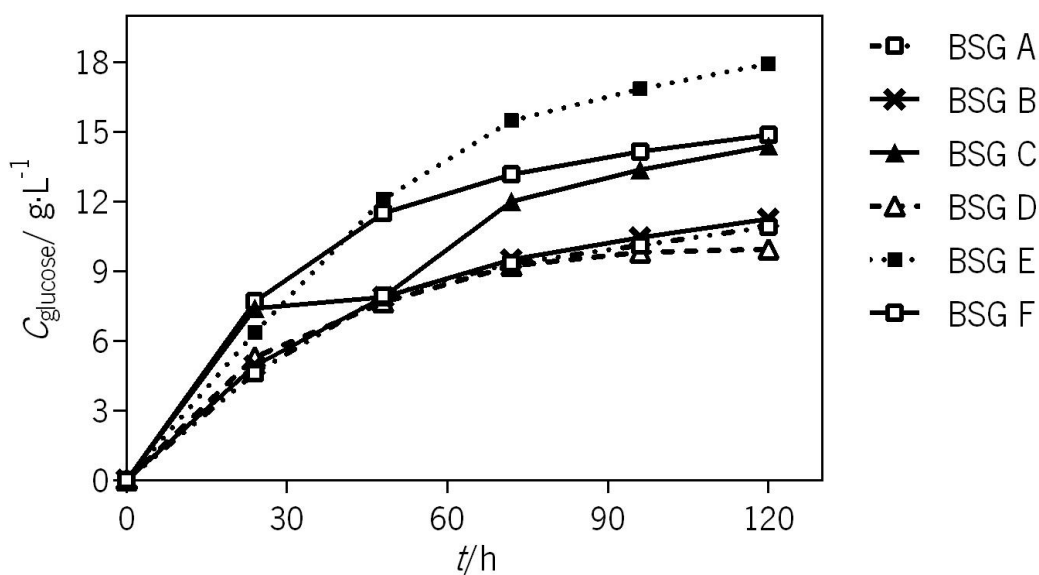


Figura 6 – Perfil de concentração de glucose (C_{glucose}) obtido após a sacarificação direta de seis drêches cervejeiras diferentes (BSG A a F) ao longo do tempo (t).

O gráfico apresentado na Figura 6 evidencia que a sacarificação direta da BSG E possibilitou a obtenção da maior concentração de glucose ($17,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A hidrólise enzimática das drêches F e C conduziram à obtenção de concentrações finais de glucose consideravelmente mais baixas, de $14,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $14,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respetivamente. Por último, encontram-se as drêches B, A e D, que registaram concentrações de glucose inferiores a $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com a drêche D a permitir apenas $9,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose após as 120 h de sacarificação.

Uma análise comparativa destes resultados com os da respetiva caracterização química das drêches (secção 4.1 – Tabela 4) permite afirmar que a concentração de glucose final obtida está em concordância com o conteúdo de glucano da matéria-prima. De facto, seria expectável que a hidrólise enzimática da drêche E proporcionasse uma maior concentração de glucose, uma vez que constituiu a

drêche com maior conteúdo de glucano, em particular da forma solúvel/extratível de glucose. Seguem-se as drêches F e C, que também apresentam conteúdos elevados de glucano, embora inferiores ao da drêche E, justificando a obtenção de concentrações intermédias de glucose. Por fim, o menor conteúdo de glucano das drêche A e B fez com que a sacarificação destas drêches resultasse em baixas concentrações do respetivo monómero. Em contrapartida, a drêche D, apesar de possuir um conteúdo de glucano total elevado e equiparável com o da drêche E, foi a que registou a menor concentração de glucose. Este resultado poderá estar relacionado, em parte, com o baixo teor de glucano sob a forma solúvel da drêche D, comparativamente com a maioria das drêches. Efetivamente, o alto conteúdo de glucano da drêche D é praticamente todo derivado das fibras, que constituem uma fonte menos acessível de glucose e mais difícil de hidrolisar. Por outro lado, considerando a caracterização química das drêches, é perceptível que as concentrações de glucose obtidas após a sacarificação ultrapassam a quantidade de glucano existente sob a forma de polissacáridos solúveis de glucose. Estes resultados indicam que a sacarificação ocorreu não só sobre a fração imediatamente acessível de glucano, mas também sobre parte da fração de glucano na forma de fibras. Adicionalmente, foram também encontradas pequenas quantidades de xilose e arabinose nos hidrolisados enzimáticos (resultados não apresentados), reforçando a hipótese de hidrólise de uma pequena parte das fibras de hemicelulose. Assim, é possível afirmar que a sacarificação direta reflete não só o teor de glucano da matéria-prima, como a suscetibilidade da drêche *in natura* (sem qualquer tipo de pré-tratamento prévio). Os resultados obtidos demonstram, por conseguinte, que a drêche D apresenta baixa suscetibilidade enzimática. Esta resistência ao ataque enzimático poderá estar associada com o seu conteúdo superior de hemicelulose, em particular de xilano. A hemicelulose constitui uma reconhecida barreira física, cobrindo as fibras de celulose e, por conseguinte, dificultando a digestão enzimática da celulose [79]. Além disso, os grupos acetato que compõem a estrutura do xilano interferem com o reconhecimento enzimático, diminuindo assim a taxa de hidrólise [116]. No outro extremo situa-se a drêche E, que além de ter um elevado conteúdo de glucano sobre a forma solúvel, possui também um baixo teor de hemicelulose, inclusive de xilano, sendo, potencialmente mais suscetível ao ataque enzimático. Este facto encontra-se refletido pela elevada eficiência enzimática obtida no ensaio realizado com esta drêche.

Convém ressaltar que estes resultados foram alcançados com uma baixa carga de sólidos. Porém, a produção de etanol requer a utilização de cargas de sólidos superiores, nas quais as eficiências de sacarificação podem ser distintas das encontradas neste ensaio.

4.3 Estudo de condições de operação para a obtenção de hidrolisados ricos em glucose

A produção de bioetanol requer a utilização de biomassas com elevadas quantidades de hidratos de carbono. Entre as drêches avaliadas no presente estudo, a BSG D e BSG E exibiram o maior conteúdo de glucano, justificando o seu uso nos subseqüentes ensaios de pré-tratamento e sacarificação. Além disso, a BSG D revelou ser a drêche com o conteúdo mais baixo de polissacáridos solúveis de glucose e a menor suscetibilidade enzimática. Dito isto, a utilização da BSG D e BSG E permitirá apurar o impacto do pré-tratamento sobre drêches que apresentam graus de suscetibilidade enzimática e quantidades de polissacáridos solúveis de glucose distintos.

Na etapa de pré-tratamento existem diversas condições operacionais que influenciam o processo e que devem ser controladas e, se possível, otimizadas de modo a maximizar a extração de açúcares e a suscetibilidade da celulose na subseqüente etapa de hidrólise enzimática, minimizando, simultaneamente, a formação de produtos da degradação que limitam a utilização dos hidrolisados como meio de cultura. No presente estudo avaliou-se o efeito individual de duas variáveis operacionais: temperatura de pré-tratamento e carga de sólidos.

4.3.1 Estudo de diferentes temperaturas de autohidrólise

A existência de uma fração de glucano sob a forma solúvel constitui um desafio para o processo hidrolítico clássico. Os polissacáridos solúveis de glucose encontrados são presumivelmente representados por amido, maltodextrinas e glucose residual [6]. Este tipo de moléculas pode ser hidrolisado em condições menos severas do que a celulose e a hemicelulose [117]. Assim, a fim de minimizar a degradação dos polissacáridos solúveis de glucose e tendo em conta também que a drêche foi sujeita a um processo industrial prévio (maltagem e brassagem), optou-se por investigar a eficiência do pré-tratamento utilizando temperaturas baixas, comparativamente com as necessárias para a modificação de outras biomassas lenhinocelulósicas [90], [118]. Com base na literatura [119] foram selecionadas três temperaturas: 150 °C, 160 °C e 170 °C. Os ensaios de autohidrólise foram conduzidos com a drêche E, utilizando uma relação sólido/líquido fixa de 20 %, em massa. A escolha da BSG E teve por base o seu elevado conteúdo de polissacáridos solúveis de glucose, sobre o qual o efeito da temperatura será mais perceptível.

O efeito da temperatura no fracionamento da drêche foi avaliado através da caracterização química das frações sólida e líquida, apresentada na Tabela 5.

O aumento das temperaturas de pré-tratamento levou a diferenças no fracionamento da drêche, em particular no que diz respeito ao conteúdo de glucano, gluco-oligossacáridos (GOS) e glucose.

Tabela 5 – Rendimento mássico em sólido (Y_s) e composição química da fração sólida e líquida obtida após autohidrólise da drêche E a três temperaturas distintas (150 °C, 160 °C e 170 °C), durante 5 min, com uma carga de sólidos de 20 %, em massa

	Temperatura de autohidrólise		
	150 °C	160 °C	170 °C
Y_s /%	66,5	62,5	55,1
a. Composição química da fração sólida (% mássica relativa à drêche pré-tratada)			
Glucano	24,3 ± 0,2	26,3 ± 0,4	27,7 ± 0,9
Xilano	15,5 ± 0,3	14,1 ± 0,1	13,4 ± 0,4
Arabinano	4,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	2,9 ± 0,2
Lenhina de Klason	19,2 ± 0,2	21,1 ± 0,2	29,6 ± 0,2
b. Composição química da fração líquida ou do licor de autohidrólise (g·L ⁻¹)			
Gluco-oligossacáridos	37,3 ± 0,1	36,6 ± 0,2	32,5 ± 0,5
Xilo-oligossacáridos	2,18 ± 0,02	3,43 ± 0,05	6,03 ± 0,05
Glucose	2,33 ± 0,02	2,49 ± 0,01	2,68 ± 0,04
Xilose	0,38 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,50 ± 0,01
Ácido acético	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,45 ± 0,02
HMF	0,033 ± 0,002	0,062 ± 0,004	0,185 ± 0,003
Furfural	0,063 ± 0,001	0,150 ± 0,005	0,301 ± 0,003

A fim de facilitar a análise, a distribuição da glucose obtida para as diferentes temperaturas de autohidrólise encontra-se ilustrada na Figura 7. Os resultados obtidos demonstram que ocorreu solubilização do glucano durante os ensaios de pré-tratamento. De facto, é notório que a maior parte da glucose potencial foi encontrada no licor – fração líquida do pré-tratamento –, predominantemente sob a forma de gluco-oligossacáridos. A recuperação dos açúcares sobre a forma oligomérica é típica do processo de autohidrólise [82]. Aos GOS acrescem ainda pequenas quantidades de glucose monomérica, que resultam da sua clivagem hidrolítica. A recuperação de glucose na fração líquida do pré-tratamento obtida neste estudo é elevada comparativamente ao relatado por outros autores. Carvalheiro e seus colaboradores (2009) [120], num estudo incidente sobre a hidrólise de quatro materiais lenhinocelulósicos, observaram que a drêche cervejeira apresentou a maior produção de GOS, atribuída

à presença de amido residual. Porém, e apesar da utilização de condições de autohidrólise mais severas (190 °C), a libertação de GOS alcançada foi 3 vezes inferior à obtida no presente estudo. Entretanto, as recuperações de glucose encontradas neste estudo são próximas das descritas por Plaza e seus colaboradores (2017), após pré-tratamento da drêche com ácido diluído (H₂SO₄, pH 1, 121 °C, 30 min) [121].

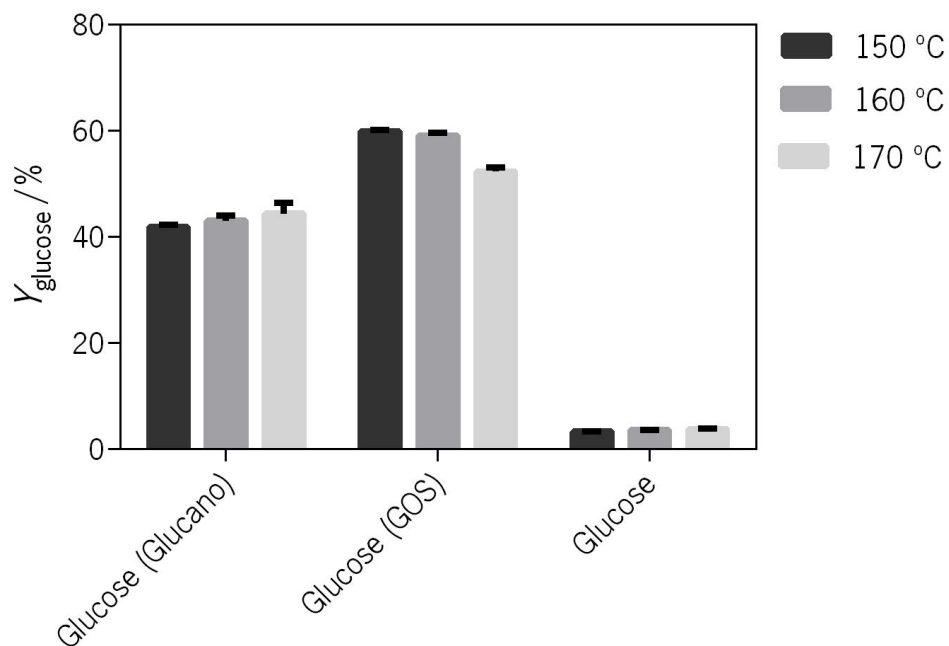


Figura 7 – Rendimento em glucose (Y_{glucose} , determinado como percentagem do glucano inicial) das frações sólida (glucano) e líquida (GOS e glucose monomérica), obtidas após pré-tratamento da drêche E a 150 °C, 160 °C e 170 °C. As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de duplicados experimentais.

Considerando que a celulose não é tão suscetível à hidrólise hidrotérmica como a hemicelulose [122], a maioria ou a totalidade do glucano deveria permanecer na fração sólida do pré-tratado. Assim, a alta concentração de glucose solubilizada observada na Figura 7 poderá dever-se ao elevado teor de polissacáridos solúveis de glucose presente nesta drêche e, ainda, à solubilização de glucanos estruturais, que já foram reportados por alguns autores [114]. A quantidade de β -glucano presente na drêche é dependente da eficiência da etapa de brassagem, variando geralmente de modo inverso [58]. Por conseguinte, tendo em conta a menor eficiência de brassagem nos processos de produção de cerveja artesanal, já mencionada anteriormente, é expectável a presença deste polissacárido nas drêches em estudo.

Apesar da solubilização da glucose ter sido transversal a todos os ensaios, a temperatura de pré-tratamento exerceu uma influência sobre a quantidade de GOS obtida. O licor de autohidrólise da drêche pré-tratada a 170 °C exibiu um teor de GOS significativamente menor quando comparado com os licores dos pré-tratamentos a 150 °C e 160 °C, que apresentaram resultados semelhantes. Por conseguinte, o aumento na temperatura de autohidrólise de 160 °C para 170 °C conduziu a uma diminuição da recuperação da glucose, possivelmente devido a reações de degradação. A glucose monomérica foi encontrada em níveis residuais no licor de autohidrólise e não foram encontradas diferenças entre as temperaturas testadas. De modo análogo, o teor de glucano da fração sólida também não revelou diferenças significativas entre os três ensaios efetuados.

No entanto, de modo a apurar a eficiência do pré-tratamento é necessário avaliar também o seu efeito sobre suscetibilidade enzimática do substrato. Os sólidos pré-tratados a diferentes temperaturas foram submetidos a hidrólise enzimática, com Cellic CTec2 e uma carga de sólidos baixa (5 %, em massa). A conversão do glucano a glucose após a sacarificação dos sólidos pré-tratados encontra-se apresentada na Figura 8.

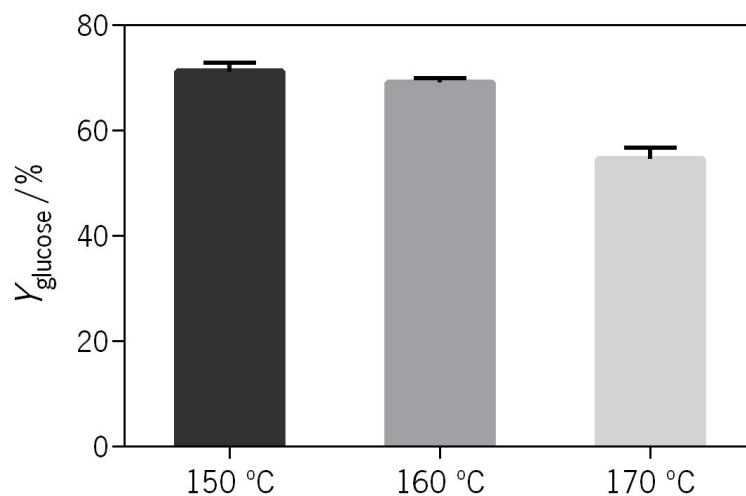


Figura 8 – Efeito da temperatura de pré-tratamento (150 °C, 160 °C e 170 °C) na sacarificação enzimática da drêche, medido através do rendimento em glucose (Y_{glucose}). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de duplicados experimentais.

A análise da Figura 8 revela que, no caso dos sólidos pré-tratados a 150 °C e 160 °C, cerca de 70 % do glucano presente no substrato foi hidrolisado. Em contrapartida, no sólido pré-tratado a 170 °C, a percentagem de sacarificação foi de apenas 55 %. De modo geral, o aumento da temperatura do pré-tratamento hidrotérmico está associado à despolimerização e solubilização parcial da hemicelulose

e rutura da estrutura recalcitrante da lenhina, aumentando assim a acessibilidade da enzima ao substrato [86], [123]. Contudo, no presente estudo, o aumento da severidade revelou afetar negativamente a suscetibilidade enzimática do substrato pré-tratado, facto este que poderá estar relacionado com o incremento da quantidade de lenhina livre. Ko e seus colaboradores (2014) demonstraram que um fator de severidade superior pode ter um impacto negativo sobre a sacarificação em consequência da maior libertação de lenhina, a qual atua como um inibidor da hidrólise enzimática [124]. De facto, encontra-se descrito que durante a etapa de pré-tratamento a lenhina pode redistribuir-se e migrar para a superfície da biomassa lenhinocelulósica aumentando a sua massa no substrato. Deste modo, o acesso das celulasas à celulose é dificultado, o que conduz a rendimentos da hidrólise enzimática inferiores [125]. Analisando os resultados apresentados na Tabela 5, no que concerne ao teor de lenhina, é possível verificar que efetivamente o sólido proveniente do pré-tratamento a 170 °C possui um conteúdo de lenhina de Klason superior (29,6 % da BSG pré-tratada) ao obtido nos sólidos pré-tratados a 150 °C e 160 °C (19,2 % e 21,1 %, respetivamente). Assim, é possível que o maior teor de lenhina tenha provocado uma inibição da sacarificação enzimática e, conseqüentemente, a menor eficiência observada neste ensaio.

Em suma, a realização de autohidrólise a 170 °C revelou ter efeitos significativamente negativos quer sobre a composição de GOS presente na fração líquida do pré-tratamento (redução da glucose potencial) quer sobre a suscetibilidade enzimática. Entre as temperaturas testadas, a autohidrólise a 160 °C revelou ser a que possibilita uma maior recuperação global de glucose, sendo, por conseguinte, selecionada para o tratamento da drêche nas etapas subsequentes.

4.3.2 Efeito da carga de sólidos na autohidrólise

Após a seleção da temperatura de autohidrólise mais adequada e, uma vez que a eficiência de extração se mostrou satisfatória, optou-se por testar cargas de sólidos elevadas.

Até à data, a maioria das estratégias de pré-tratamento reportadas na literatura utilizam baixas cargas de sólidos (tipicamente percentagens mássicas entre 5 % a 10 %). Contudo, a economia do processo de conversão de biomassas lenhinocelulósicas é beneficiada pelo uso de cargas de sólidos superiores a 15 %, uma vez que proporciona um aumento dos rendimentos de açúcar e etanol enquanto reduz os custos de produção e de capital. Contudo, elevadas cargas de sólidos oferecem muitos desafios, nos quais se incluem altas concentrações de inibidores e limitações de transferência de massa, que afetam negativamente a eficiência do processo [126]. Tendo isto em consideração, foram testadas duas

cargas de sólidos: BSG D foi pré-tratada com uma percentagem mássica de 20 % e 25 % (BSG D₂₀ % e BSG D₂₅ %), enquanto BSG E foi pré-tratada com uma percentagem mássica de 25 % (BSG E₂₅ %). As composições das frações sólida e líquida resultantes dos diferentes pré-tratamentos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento mássico em sólido (Y_s) e composição química da drêche D e drêche E autohidrolisadas a 160 °C, 5 min, utilizando diferentes cargas de sólidos. Os resultados estão apresentados como a média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes

	BSG D ₂₀ %	BSG D ₂₅ %	BSG E ₂₅ %
Y_s /%	72,8 \pm 5,8	71,7 \pm 6,6	48,6 \pm 5,6
a. Composição química da fração sólida (% mássica relativa à drêche pré-tratada)			
Glucano	21,5 \pm 1,6	22,4 \pm 1,6	21,8 \pm 1,5
Xilano	14,3 \pm 1,2	13,4 \pm 1,8	11,3 \pm 1,8
Arabinano	4,1 \pm 0,1	3,9 \pm 0,3	4,4 \pm 0,4
Lenhina de Klason	10,2 \pm 1,3	16,3 \pm 1,2	26,5 \pm 2,3
b. Composição química da fração líquida ou do licor de autohidrólise (g·L ⁻¹)			
Gluco-oligossacáridos	25,2 \pm 1,6	34,2 \pm 1,5	51,6 \pm 2,3
Xilo-oligossacáridos	5,4 \pm 0,1	6,0 \pm 0,9	3,9 \pm 0,4
Glucose	0,41 \pm 0,07	0,46 \pm 0,02	3,19 \pm 0,31
Xilose	0,36 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	0,51 \pm 0,03
Ácido acético	0,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1
HMF	0,06 \pm 0,01	1,48 \pm 0,53	0,21 \pm 0,07
Furfural	0,13 \pm 0,03	0,13 \pm 0,00	0,26 \pm 0,01

A observação da Tabela 6 indica que o grau de solubilização alcançado nos dois ensaios realizados com a da drêche D foi idêntico. Efetivamente, o pré-tratamento efetuado com uma carga de sólidos de 20 % registou um rendimento em sólidos de 72,8 %, enquanto no pré-tratamento a 25 % obteve-se um valor de 71,7 %. Estes rendimentos equivalem a uma percentagem de solubilização da drêche de 27,2 % e 28,3 %, respetivamente. Por outro lado, o rendimento em sólido obtido no ensaio com a drêche E foi notoriamente inferior (48,6 %) sugerindo uma solubilização superior desta drêche. A remoção dos extrativos e a solubilização do glucano são os principais fenómenos associados a esta perda de massa da fração sólida. Os extrativos não foram mensurados, porém sabe-se que estes compostos são

tipicamente removidos da biomassa durante a etapa de pré-tratamento [127], [128]. O menor rendimento em sólido obtido com a drêche E poderá ser justificado pelo seu maior conteúdo de extrativos e de polissacáridos solúveis de glucose (Secção 4.1 – Tabela 4).

De modo análogo ao observado nos ensaios de temperatura de pré-tratamento (secção 4.3.1), uma grande fração do glucano foi removida da matéria-prima, perceptível pela diminuição do conteúdo de glucano no resíduo sólido pré-tratado relativamente ao da respetiva drêche *in natura*. Apenas cerca de 33 % do glucano existente na matéria-prima permaneceu no sólido pré-tratado BSG E₂₅ %. Já nos ensaios com a drêche D, a percentagem de glucano que permaneceu no sólido foi consideravelmente superior, com um valor de, aproximadamente, 50 %. Estes resultados são coerentes com o teor de polissacáridos solúveis de glucose e com o grau de suscetibilidades anteriormente discutidos.

A lenhina foi o segundo componente predominante para todos os sólidos pré-tratados, seguido do xilano e, por fim, o arabinano com a menor percentagem. Comparativamente com a matéria-prima, é perceptível uma maior percentagem destes componentes no sólido pré-tratado, facto este que está essencialmente relacionado com a remoção de vários componentes, que foram extraídos para a fração líquida durante o pré-tratamento. Contudo, a realização da autohidrólise resultou numa diminuição total das quantidades de xilano e arabinano. No caso do xilano, cerca de 18 % a 23 % foi extraído para a fase líquida, valores estes que se aproximam dos obtidos por Carvalheiro e seus colaboradores (2004), em condições de pré-tratamento idênticas [63]. No que concerne à lenhina, o aumento verificado não é apenas explicado pelo seu enriquecimento no sólido, como também pela formação de matéria insolúvel em ácido, conhecida por “pseudo-lenhina”. Este fenómeno é típico dos processos de autohidrólise e está associado com reações de condensação da lenhina com os açúcares e/ou produtos de degradação, formando-se compostos insolúveis, que são quantificados como lenhina de Klason inflacionando, por conseguinte, o seu valor [129], [130].

A composição dos hidrolisados também se encontra descrita na Tabela 6. Esta fração é maioritariamente composta por mono e oligossacáridos, que representam entre 94 % e 99 % do total de compostos identificados nos hidrolisados. O principal açúcar encontrado foi a glucose, sob a forma de oligossacárido, com concentrações de 25,2 g·L⁻¹ (ensaio BSG D₂₀ %), 34,2 g·L⁻¹ (ensaio BSG D₂₅ %) e 51,6 g·L⁻¹ (ensaio BSG E₂₅ %). A elevada concentração de glucose encontrada em todos os hidrolisados (GOS + glucose monomérica) é concordante com a elevada solubilização do glucano supramencionada, e torna-os adequados para os subseqüentes ensaios fermentativos. De igual modo, a presença de XOS e xilose monomérica também corrobora a solubilização da fração de xilano.

Relativamente ao efeito da carga de sólidos avaliado através dos ensaios conduzidos com a drêche D, observa-se que a composição de glucano e xilano no sólido autohidrolisado não variou entre as frações tratadas com diferentes cargas de sólidos. Este comportamento também foi verificado nos ensaios de temperatura de pré-tratamento. Em contrapartida, o aumento da carga de sólidos conduziu a um incremento da concentração de GOS no licor, uma consequência direta do aumento da concentração de substrato. No entanto, este aumento não foi observado para os XOS, sugerindo que a eficiência de extração diminuiu com o aumento da carga de sólidos. Esta tendência de redução dos rendimentos com o aumento da carga de sólidos no pré-tratamento não é incomum e já foi relatada anteriormente [131].

Durante a etapa de pré-tratamento originam-se ainda diversos produtos de degradação, que constituem potenciais inibidores para as etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação [81]. Na Tabela 6 encontram-se apresentados os valores dos compostos tóxicos identificados na fração líquida, nomeadamente ácido acético, HMF e furfural. O aparecimento de ácido acético é expectável uma vez que é o catalisador do processo de autohidrólise, sendo libertado como consequência da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose [86]. As concentrações deste composto registaram valores situados entre $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por outro lado, o HMF e o furfural, derivam da degradação das hexoses e pentoses, respetivamente, e possuem efeitos inibitórios bem estabelecidos sobre muitas espécies microbianas, incluindo a *S. cerevisiae* [81], [86]. Através da análise da Tabela 6 é notório que a concentração de HMF aumentou consideravelmente com o aumento da carga de sólidos, registando um valor de $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no ensaio BSG D_{20%} e de $1,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no respetivo ensaio com 25 % de sólidos, sugerindo uma maior degradação de hexoses com o aumento da carga de sólidos. Por outro lado, o pré-tratamento da BSG E_{25%} registou valores intermédios de HMF, com uma concentração de $0,21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os níveis de compostos inibidores são baixos comparativamente com os observados noutros estudos [63], [119], sugerindo uma adequação dos hidrolisados para a etapa fermentativa.

Comparando os resultados obtidos no ensaio da drêche E com os da drêche D pré-tratada nas mesmas condições, constata-se que o conteúdo de glucano e xilano foram semelhantes. Em oposição, a drêche E possibilitou a obtenção de concentrações bastantes superiores de GOS, o que pode ser atribuído à maior quantidade de glucano sobre a forma de polissacáridos solúveis de glucose, forma esta que é facilmente extraída para o licor por ação da temperatura. Este resultado corrobora também os resultados anteriores obtidos na sacarificação direta, demonstrando novamente que a drêche E apresenta uma alta fração de glucano facilmente acessível.

4.4 Comparação da sacarificação enzimática a diferentes cargas de sólidos da drêche tratada e não tratada

Com o intuito de apurar se a realização de uma etapa prévia de pré-tratamento proporciona melhorias efetivas no rendimento geral do processo, efetuou-se e comparou-se a sacarificação do *whole slurry* obtido após o pré-tratamento com a sacarificação da respetiva drêche não tratada, perante diferentes cargas de sólidos. Para tal, determinou-se a eficiência de conversão de glucano e a respetiva concentração de glucose decorridas 120 h de hidrólise enzimática. Os resultados alcançados encontram-se ilustrados na Figura 9.

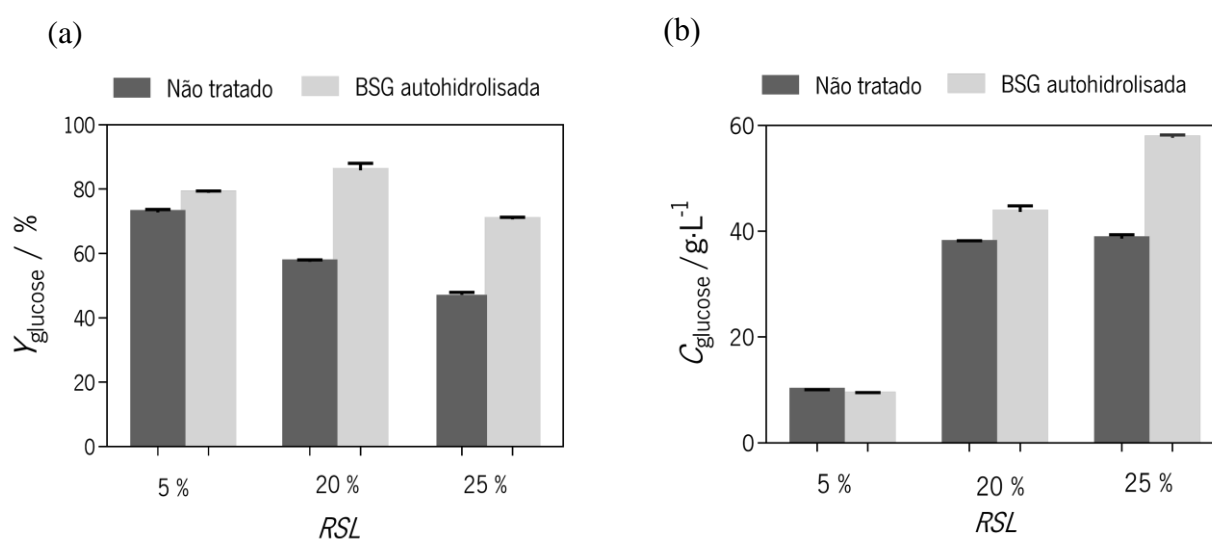


Figura 9 – Comparação entre (a) rendimento em glucose (Y_{glucose}) e (b) concentração de glucose (C_{glucose}) obtidos após sacarificação enzimática, com diferentes razões sólido-líquido (RSL), da drêche D não tratada e autohidrolisada a 160 °C, 5 min (*whole slurry*). As barras verticais correspondem ao desvio padrão da média de dois ensaios independentes.

No que concerne à sacarificação direta da drêche a diferentes cargas de sólidos, constata-se que o ensaio realizado com 5 %, em massa, de sólidos resultou numa concentração de glucose de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com um rendimento médio de 72,8 %. De modo geral, observa-se que o incremento da carga de sólidos conduziu a um decréscimo da eficiência de conversão do glucano. Encontra-se descrito que altas concentrações de sólidos podem dificultar a sacarificação enzimática em virtude das limitações de transferência de massa e de calor, que emergem devido às propriedades reológicas da densa suspensão fibrosa (elevada viscosidade) [96]. Apesar da diminuição do rendimento de sacarificação, o incremento

da carga de sólidos proporcionou um aumento da concentração de glucose (Figura 9 (b)) em todos os ensaios, exceto na carga de sólidos de 25 %. De facto, quando se aumentou a carga de sólidos de 20 % para 25 %, a perda da eficiência de sacarificação foi tal que impossibilitou um incremento da concentração de glucose.

Comparando a eficiência de sacarificação da drêche não tratada com a da respetiva drêche autohidrolisada, denota-se que a realização de uma etapa precedente de pré-tratamento teve um impacto positivo, em particular nos ensaios operados com cargas de sólidos elevadas (20 % e 25 %). Conforme pode ser observado na Figura 9 (a), a sacarificação com 20 % de sólidos da drêche pré-tratada possibilitou um incremento de 28 % na eficiência de sacarificação, em relação ao ensaio da drêche não tratada; enquanto a sacarificação com uma percentagem mássica de sólidos de 25 % da drêche pré-tratada permitiu uma melhoria de 23 %. Este aumento da eficiência viabilizou o alcance de concentrações de glucose superiores às obtidas nos ensaios da drêche *in natura*. Destaca-se particularmente os ensaios com 25 % de sólidos, no qual a sacarificação da BSG pré-tratada possibilitou a obtenção de 57,7 g·L⁻¹ de glucose, o que representa um incremento de 19 g·L⁻¹ deste açúcar comparativamente com o respetivo ensaio de sacarificação direta. Os resultados obtidos neste estudo representam uma melhoria relativamente aos reportados por Wilkinson et al. (2016), que obteve 40 g·L⁻¹ de glucose e uma eficiência de 40 %, após 72 h de sacarificação de drêche pré-tratada (1 % HCl, 121 °C durante 30 min, com uma carga de sólidos de 25 %, em massa) [96].

Em suma, analogamente aos ensaios com a drêche não tratada, a sacarificação da drêche pré-tratada registou um decréscimo do rendimento de sacarificação com o aumento da carga de sólidos de 20 % para 25 %. Contudo, e contrariamente ao observado nos ensaios de drêche não tratada, o aumento da carga de sólidos de 20 % para 25 % possibilitou um incremento da concentração de glucose alcançada. Deste modo, é possível afirmar que inclusão de uma etapa de pré-tratamento permite melhorar o rendimento global do processo, em particular para elevadas cargas de sólidos.

4.5 Sacarificação e fermentação da drêche autohidrolisada para produção de etanol

Após o estudo de diferentes condições, a estratégia de autohidrólise (160 °C, 5 min) seguida de sacarificação enzimática com uma carga de sólidos de 25 %, em base mássica, foi eleita como etapa precedente dos ensaios fermentativos. A hidrólise enzimática e a subsequente conversão dos açúcares em etanol foram efetuadas de acordo com a configuração processual HSF. Esta estratégia envolveu a

inclusão de uma etapa de sacarificação nas condições ótimas do *cocktail* enzimático por um período de 120 h, seguido de arrefecimento para a inoculação da levedura e início da fase fermentativa.

A utilização da suspensão integral do pré-tratamento (*whole slurry*), apresenta vários benefícios do ponto de vista económico e industrial: as etapas de lavagem são evitadas, o consumo de água é menor e os açúcares da fase líquida podem ser usados, aumentando a concentração de etanol [132]. No entanto, diversos compostos que são libertados durante esta etapa (como furanos, compostos fenólicos e ácidos fracos) possuem um efeito inibitório sobre os microrganismos utilizados na fermentação. Neste contexto, decidiu-se comparar a fermentabilidade das fases sólidas pré-tratadas de drêche D e E lavadas e não lavadas (*whole slurry*). O sucesso da fermentação de biomassa lenhinoceulósica é também dependente da capacidade da estirpe de levedura em lidar com os diversos stresses impostos durante estes processos. Tendo isto em consideração, achou-se pertinente estudar e comparar o desempenho fermentativo de dois tipos de leveduras distintos: *S. cerevisiae* Wyeast 1762, Abbey II belga (abreviada para BLG II) e *S. cerevisiae* PE-2. A BLG II é uma levedura tipicamente utilizada no processo cervejeiro enquanto a PE-2 é uma estirpe de bioetanol de 1ª geração, cuja a aplicação tem sido estendida à produção de bioetanol a partir de materiais lenhinoceulósicos – etanol 2ª geração [110], [133]. Ambas as leveduras apresentam elevada tolerância ao etanol (*“high gravity yeast”*).

As fermentações foram acompanhadas através da perda de massa de CO₂ e os respetivos perfis fermentativos encontram-se ilustrados na Figura 10. A concentração de etanol final e de glucose residual determinadas por HPLC bem como o rendimento de etanol (calculado a partir da glucose inicial presente no substrato utilizado: *whole slurry* ou sólido residual lavado) encontram-se apresentados na Tabela 7.

O estudo do efeito da lavagem do sólido pré-tratado foi conduzido com a levedura BLG II. Os perfis relativos aos ensaios efetuados com o sólido pré-tratado lavado da drêche D sugerem um arranque imediato da cultura. Contudo, é plausível que haja omissão de uma curta fase lag, devido ao longo intervalo de tempo entre as amostragens no tempo inicial. Observa-se uma acentuada perda de peso nas primeiras 18 h de fermentação que pode ser atribuído à metabolização da glucose inicialmente disponível no meio fermentativo. Com o decorrer da fermentação e consumo da glucose pela levedura, houve uma depleção quase total do açúcar (Tabela 7), coincidente com a entrada na fase estacionária, que foi verificada após 23 h no ensaio efetuado com o sólido lavado, e 27 h no *whole slurry*. Em contrapartida, a fermentação do *whole slurry* da drêche E exibiu uma fase lag mais longa (aproximadamente 18 h), provavelmente devido aos inibidores presentes na fração líquida, em particular o ácido acético, que registou concentrações de 1,3 g·L⁻¹. Este efeito já foi observado por Cunha-Pereira e seus colaboradores

(2011), tendo sido correlacionado com o período necessário à eliminação total dos inibidores presentes no meio fermentativo [134].

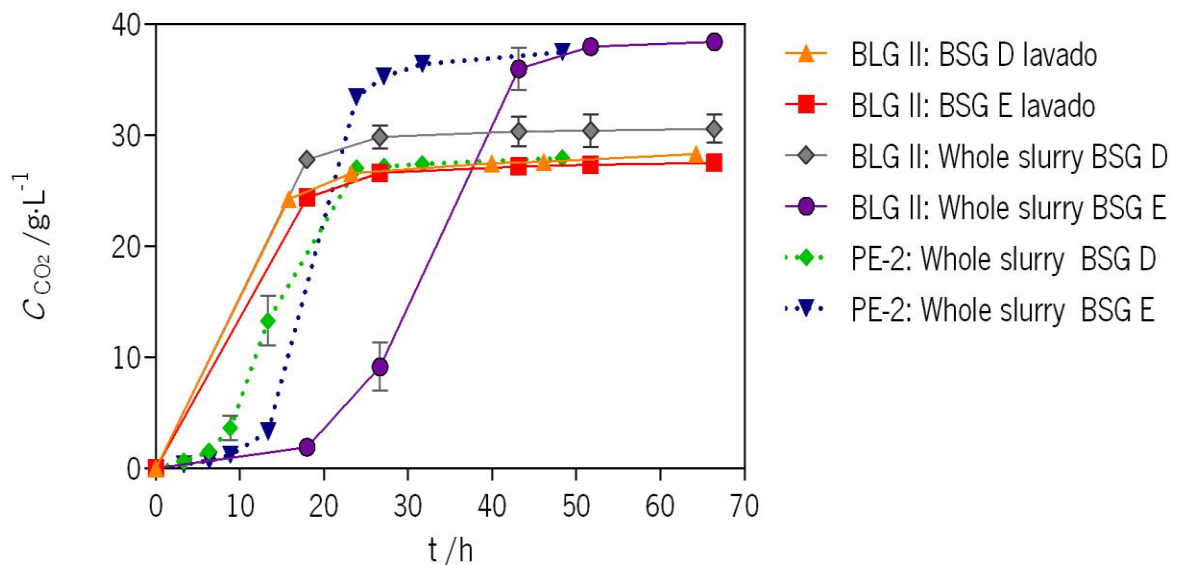


Figura 10 – Perfis de produção de (C_{CO_2}) ao longo do tempo (t) de fermentação do sólido pré-tratado lavado e sacarificado e/ou *whole slurry* sacarificado, das drêches D e E, pela *S. cerevisiae* BLG II e *S. cerevisiae* PE-2. Cada ponto está representado como valor médio \pm desvio padrão de duplicados experimentais.

Os perfis de fermentação ilustrados na Figura 10 revelam que produção de CO₂ foi notoriamente superior nos ensaios conduzidos com *whole slurry*, comparativamente com os respectivos ensaios com sólido pré-tratado lavado. Estes resultados são coerentes com a maior produção de etanol observada e apresentada na Tabela 7. Concretamente, a fermentação do *whole slurry* da drêche E conduziu à produção de 38,0 g·L⁻¹ de CO₂ e 42,3 g·L⁻¹ de etanol, enquanto a fermentação do *whole slurry* da drêche D registou valores de 30,6 g·L⁻¹ de CO₂ e 32,2 g·L⁻¹ de etanol. Por outro lado, os ensaios da drêche D e E com sólido pré-tratado lavado apresentaram um perfil de fermentação idêntico e uma concentração final de etanol de, aproximadamente, 27,0 g·L⁻¹ em ambos os casos. Estes resultados vão de encontro com o previsto, uma vez que a configuração *whole slurry* fornece uma quantidade superior de açúcares fermentescíveis (glucano do sólido e a glucose solúvel presente na fração líquida), passíveis de serem convertidos em CO₂ e etanol. O efeito negativo do descarte da fração líquida do pré-tratamento é particularmente acentuado no caso da drêche E, em virtude da elevada concentração de glucose solubilizada no licor, que não é aproveitada nos ensaios com sólido pré-tratado lavado.

Tabela 7 – Concentração de glucose residual (G_{ff}) e de etanol final (C_{EtOH}) e rendimento em etanol (Y_{EtOH}) obtidos após o processo de HSF das drêches D e E com duas leveduras distintas. Os resultados estão representados como valor médio \pm desvio padrão de duplicados experimentais

Levedura	Condição	$G_{\text{ff}}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{EtOH}}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$Y_{\text{EtOH}}/\%$
	BSG D lavado	$0,19 \pm 0,07$	$26,9 \pm 0,1$	$92,3 \pm 0,4$
	<i>Whole slurry</i> BSG D	$0,27 \pm 0,02$	$32,2 \pm 0,6$	$73,0 \pm 1,0$
BLG II	BSG E lavado	$0,34 \pm 0,07$	$27,0 \pm 0,4$	$94,0 \pm 1,0$
	<i>Whole slurry</i> BSG E	$0,23 \pm 0,04$	$42,3 \pm 0,0$	$94,0 \pm 0,6$
PE-2	<i>Whole slurry</i> BSG D	$0,08 \pm 0,00$	$28,7 \pm 0,6$	$59,5 \pm 1,2$
	<i>Whole slurry</i> BSG E	$0,26 \pm 0,01$	$40,3 \pm 0,4$	$82,0 \pm 2,0$

Relativamente ao rendimento em etanol, os ensaios com as drêches E e D registaram comportamentos dispares. No caso da drêche E, os rendimentos de etanol dos ensaios com *whole slurry* e com o sólido pré-tratado lavado foram idênticos (94 %), indicando que a eficiência de conversão da glucose potencial foi semelhante para ambos os casos. Por outro lado, o rendimento em etanol do ensaio com a drêche D sólido pré-tratado lavado (92,3 %) foi notavelmente superior ao alcançado no respetivo ensaio *com whole slurry* (73,0 %). Diante destes resultados, é possível afirmar que, no caso da drêche D, o processo de sacarificação e fermentação híbridas foi mais eficiente quando se utilizou como substrato apenas a fração sólida do pré-tratamento. O *whole slurry* desta drêche apresentou quantidades consideráveis de inibidores (secção 4.3.2 – Tabela 6), em particular de HMF ($1,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), que poderá justificar a menor eficiência de conversão de glucose em etanol observada nesta estratégia experimental. Sabe-se que a *S. cerevisiae* é capaz de converter o HMF e o furfural em compostos menos inibitórios, desde que as suas concentrações se encontrem em níveis inferiores aos considerados letais [135]. Porém, trabalhos conduzidos sobre o efeito do furfural e do HMF sobre a produção de etanol têm demonstrado que estes compostos reduzem a taxa específica de crescimento do microrganismo, o rendimento em biomassa e a produtividade específica de etanol [136]. Estudos adicionais seriam, no entanto, necessários para apurar se de facto algum destes parâmetros foi afetado pelos inibidores presentes no *whole slurry* da BSG D.

No que concerne ao efeito da estirpe de levedura utilizada, a Figura 10 mostra que a PE-2 apresenta uma fase *lag* (aproximadamente 13 h) consideravelmente mais curta do que a observada no

ensaio fermentativo conduzido com a BLG II (18 h). Uma vez que a duração da fase *lag* é influenciada pela capacidade de metabolização dos inibidores, estes resultados indicam que a PE-2 é mais eficaz na eliminação destes compostos tóxicos do que a BLG II. Estes resultados são expectáveis dado que uma estirpe cervejeira não está adaptada a este tipo de inibidores fermentativos. Em contrapartida, estudos anteriores demonstraram que a PE-2 é altamente tolerante a compostos inibitórios (HMF, furfural e ácido acético) e que proporciona altas produtividades de etanol [110], [137], em concordância com o observado neste estudo. No entanto, a BLG II permitiu a obtenção de concentrações e rendimentos de etanol superiores à PE-2. Assim, entre as condições investigadas no presente estudo, a concentração e rendimento de etanol mais elevados foram alcançadas com a fermentação do *whole slurry* drêche E pela levedura cervejeira (42,3 g·L⁻¹ e 94,0 %, respetivamente).

De modo geral, estes resultados demonstram o grande potencial das drêches oriundas de um processo de fabrico de cervejas *craft* e da metodologia proposta para a produção de etanol, permitindo a obtenção simultânea de elevados rendimentos e concentrações de etanol, sem necessitar de suplementação de açúcar ou de qualquer outro tipo de nutriente. Este facto representa um importante aspeto para a economia do processo e uma melhoria comparativamente com o trabalho realizado por Meneses e seus colaboradores (2013) [77]. Estes autores exploraram a utilização da drêche para a produção de uma bebida destilada, recorrendo à adição de sacarose ao meio fermentativo para incrementar a obtenção de etanol.

Embora a produção de uma bebida destilada a partir de drêche seja uma aplicação pouco explorada, a produção de etanol a partir deste subproduto cervejeiro tem sido amplamente investigada no âmbito da produção de biocombustíveis. Até à data, o rendimento em etanol mais elevado foi de 81 %, alcançado após o pré-tratamento alcalino da drêche com 5 % de NaOH e 25 % de sólidos, que corresponde a uma concentração final de etanol de 17,9 g·L⁻¹ [138]. Mais recentemente, Wilkinson e seus colaboradores (2015) obtiveram 22 g·L⁻¹ de etanol e um rendimento de 75 %, operando perante condições de autohidrólise mais severas do que as do presente trabalho (200 °C, 10 min) [119]. O rendimento de etanol obtido neste estudo é, portanto, o mais elevado reportado até à data para a bioconversão de drêche em etanol.

Com base nestes resultados, seleccionou-se o *whole slurry* drêche E com uma carga de sólidos de 25 % e a levedura BLG II para a realização dos subseqüentes ensaios em reator, visando o aumento de escala do processo.

4.6 Produção da bebida destilada

4.6.1 Sacarificação e fermentação em reator da drêche autohidrolisada

Após selecionada a configuração processual que proporciona, simultaneamente, bons rendimentos e elevadas concentrações de etanol, efetuou-se um aumento de escala de modo a assegurar volume suficiente para a subsequente etapa de destilação. Para o efeito, utilizou-se um reator de 3 L onde se realizou o processo de sacarificação e fermentação híbridas, operando com um volume útil de, aproximadamente, 1,2 L. Estes ensaios decorreram de acordo com a metodologia anteriormente descrita para os ensaios de HSF em Erlenmeyer, incluindo uma etapa de pré-sacarificação, a 50 °C durante 120 h, seguida da adição da levedura (*S. cerevisiae* BLG II) e início da fase fermentativa, a 30 °C. Foram realizados dois ensaios independentes que serão designados por fermentação 1 (F1) e por fermentação 2 (F2). De igual modo, o substrato utilizado para cada um dos ensaios teve origem em pré-tratamentos hidrotérmicos independentes.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores de concentração de glucose no início (G_{t0}) e fim da fase fermentativa (G_{tf}) bem como a concentração de etanol (C_{EtOH}) e o respetivo rendimento em etanol (Y_{EtOH}) de cada um dos ensaios de HSF.

Analisando-se os resultados pode-se constatar a existência de diferenças entre os *batches* realizados. Uma vez que se usou a mesma quantidade de drêche (*whole slurry*), ambos os *batches* possuíam a mesma quantidade de açúcares potenciais. Contudo, a concentração de glucose obtida após 120 h de hidrólise enzimática (G_{t0}) foi consideravelmente superior no ensaio F1, sugerindo que a eficiência da etapa de pré-sacarificação deste ensaio foi superior à do ensaio F2.

Tabela 8 – Valores de diferentes parâmetros fermentativos relativos à fermentação da drêche E em reator, após 48 h, conduzida pela *S. cerevisiae* BLG II, para duas réplicas processuais (F1 e F2).

Ensaio	$G_{t0}/g \cdot L^{-1}$	$G_{tf}/g \cdot L^{-1}$	$C_{EtOH}/g \cdot L^{-1}$	$Y_{EtOH}/\%$
F1	81,9	0,18	39,4	87,7
F2	75,6	0,26	33,7	75,0

Após o início da fase fermentativa, o consumo de substrato e a formação de produto foram acompanhados por um período de 72 h, contudo verificou-se um esgotamento praticamente total da glucose nas primeiras 48 h. Conforme pode ser verificado na Tabela 8, a glucose residual atingiu

concentrações inferiores a $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em ambos os ensaios. No que concerne à concentração e rendimento em etanol, o ensaio F1 também se demonstrou superior ao F2. Estes resultados são coerentes com a menor eficiência de sacarificação observada no F2. De facto, uma menor eficiência de sacarificação traduz-se diretamente numa quantidade inferior de glucose no meio, diminuindo assim o rendimento e a concentração de etanol obtidos. Convém, porém, ressaltar que a sacarificação continua a decorrer durante a etapa fermentativa, embora a uma taxa mais lenta, posto que ambas as etapas foram efetuadas no mesmo reator e não foi realizado nenhum procedimento de desativação das enzimas.

Comparando os resultados obtidos em reator com os alcançados em Erlenmeyer ($C_{\text{EtOH}} = 42,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $Y_{\text{EtOH}} = 94,0 \%$, secção 4.5 – Tabela 7) é perceptível que ambos os ensaios conduziram a concentrações e rendimentos de etanol mais baixos, com particular destaque para o ensaio F2. Esta dissemelhança observada entre os ensaios em reator e em matraz indica que as condições de mistura do reator não reproduziram as existentes no Erlenmeyer sendo particularmente crítico face às elevadas cargas de sólidos utilizadas. Nestas condições, as limitações de transferência de massa são superiores e a acessibilidade da enzima ao substrato é menor, diminuindo, assim, a eficiência da etapa de sacarificação.

4.6.2 Destilação dos caldos fermentativos

Ambos os fermentados obtidos anteriormente (F1 e F2) foram submetidos a um processo de destilação fracionada, visando a recuperação da maior quantidade de etanol e de aromas característicos positivos e a minimização de defeitos aromáticos (*off-flavors*). Ao longo do processo de destilação foram recolhidas quatorze frações do destilado 1 e treze frações no destilado 2. O teor de etanol presente em cada uma delas encontra-se apresentado na Tabela 9.

A análise da Tabela 9 evidencia que houve maior recuperação de etanol no destilado 1. Efetivamente, comparando o destilado 1 com o destilado 2 é perceptível que, o primeiro possibilitou a recolha de oito frações com um teor alcoólico volúmico superior a 42 %, em contraste com o destilado 2, no qual apenas seis frações possuíam um teor alcoólico situado nessa gama. Por outro lado, no destilado 1, as frações 9 a 13 apresentam ainda um teor alcoólico volúmico considerável, situado entre 30,68 % e 7,56 %, contrariamente ao destilado 2, que exibiu teores de etanol já próximos de zero. Esta diferente recuperação de etanol dos dois destilados está relacionada com o maior conteúdo de etanol do fermentados 1 (5,0 %, em volume), em relação ao fermentado 2 (4,3 %, em volume).

Tabela 9 – Temperatura de recolha (T) das distintas frações obtidas durante o processo de destilação de cada uma das réplicas processuais e respetivo teor alcoólico (C_{EtOH})

Fração	Destilado 1		Destilado 2	
	$T/^\circ\text{C}$	$C_{\text{EtOH}}/\%$	$T/^\circ\text{C}$	$C_{\text{EtOH}}/\%$
1	70	83,58	60	89,75
2	76	83,04	60	88,90
3	76	81,80	60	87,00
4	78	76,56	70	81,70
5	78	73,99	70	67,49
6	78	63,30	78	42,63
7	78	61,17	78	8,89
8	78	42,31	78	2,78
9	78	30,68	100	1,53
10	80	25,84	100	0,58
11	80	14,92	100	0,27
12	80	10,99	100	0,27
13	80	7,56	100	0,24
14	100	6,02	–	–

Adicionalmente, foi também efetuada a caracterização química das diversas frações relativamente aos compostos voláteis maioritários, resultados estes que se encontram apresentados na Tabela 10. Em geral, os compostos volatilizaram conforme descrito por Léauté (1990) [21]. Os aldeídos, os ésteres e o metanol, que apresentam menores pontos de ebulição, destilaram no início. No caso dos álcoois superiores, devido ao facto de serem solúveis em etanol e parcialmente solúveis em água, costumam volatilizar ao longo de todo o processo de destilação, embora se concentrem principalmente nas frações iniciais (na “cabeça” e “coração”). Efetivamente, a maior concentração de álcoois superiores foi registada nas frações com teor alcoólico volúmico superior a 70 %. O único álcool observado nas últimas frações recolhidas foi o 2-feniletanol, composto este que é típico da fração “cauda” [53]. Adicionalmente, a Tabela 10 evidencia que, apesar dos compostos presentes nos dois destilados serem os mesmos, as concentrações em que se encontram são, na maioria dos casos, distintas. Este facto pode estar associado com diferenças na composição dos fermentados submetidos à destilação. Considerando que

uma variação na composição de alimentação provoca um deslocamento do perfil de composição na coluna de destilação, os produtos alcançados serão, conseqüentemente, diferentes [70].

O processo de destilação deve ser controlado de modo a assegurar baixas quantidades ou até mesmo eliminação de compostos tóxicos, cujas concentrações permitidas nas bebidas destiladas encontram-se estabelecidas na legislação. Entre estes compostos encontra-se o metanol, cujo limite legal, de acordo com o Council Regulation (EEC) N°. 110/2008, é de $1000 \text{ g}\cdot\text{hL}^{-1}$ em 100 % de volume de etanol [9]. As concentrações deste composto nas diversas frações (Tabela 10) encontram-se abaixo do exigido legalmente, permitindo a utilização da totalidade das frações. Atendendo que o metanol é um álcool resultante da degradação das pectinas que ocorre durante a etapa fermentativa [50], a baixa concentração detetada é concordante com os baixos níveis de pectina presente na drêche cervejeira [139].

Uma vez que se pretendia a obtenção de um destilado final com um teor alcoólico volúmico de 40 %, diversas frações dos destilados foram misturadas de modo a atingir um teor alcoólico volúmico entre 45 % e 50 %, contemplando possíveis perdas de etanol durante a etapa subsequente de aromatização. Após a mistura das frações, o destilado 1 apresentou um teor alcoólico volúmico de 48 %, enquanto o destilado 2, cerca de 45 %. Os destilados assim obtidos foram sujeitos a um processo de aromatização com aparas de madeira de carvalho americano, visando melhorar a qualidade organolética do produto. Tal como previsto, durante a aromatização ocorreram perdas consideráveis de etanol, fazendo com que o teor alcoólico volúmico do destilado 1 diminuísse para 41 % e o do destilado 2 para 38 %.

Tabela 10 – Compostos voláteis majoritários presentes nas distintas frações (1 a 14) do destilado 1 (D1) e 2 (D2) e respectivas concentrações (*C*)

Frações	<i>C</i> /mg·L ⁻¹													
	1 e 2		3 e 4		5 e 6		7 e 8		9 e 10		11 e 12		13 e 14	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
Álcoois														
metanol	27,1	14,7	17,8	8,6	15,1	7,0	–	2,9	–	–	–	–	–	–
2-metil-1-butanol	143,0	198,4	214,1	483,4	607,2	188,8	101,0	–	–	–	–	–	–	–
3-metil-1-butanol	794,0	783,2	1329,2	1920,8	883,1	783,3	–	–	–	–	–	–	–	–
1-propanol	198,6	179,2	189,3	175,9	103,3	185,1	–	–	–	–	–	–	–	–
2-metil-1-propanol	1342,7	1328,3	644,1	1338,1	316,0	653,5	2,4	–	–	–	–	–	–	–
2-feniletanol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	53,1	99,6	133,2	31,1	–
Ésteres														
acetato de metilo	785,0	412,9	193,3	80,8	42,1	49,4	–	–	–	–	–	–	–	–
acetato de etilo	4683,9	437,5	722,1	80,9	399,3	29,4	150,8	–	–	–	–	–	–	–
lactato de etilo	–	–	–	–	–	–	–	–	23,4	20,2	16,9	5,6	–	–
Aldeídos														
acetaldeído	974,5	931,4	142,9	197,8	62,9	61,0	8,9	33,8	30,6	13,1	19,5	–	–	–

4.7 Caracterização dos compostos voláteis presentes nos fermentados, destilados e aromatizados

As bebidas destiladas são usualmente constituídas por uma variedade de compostos voláteis, subdivididos em duas classes, maioritários e minoritários, que em conjunto determinam a qualidade do produto final. Geralmente, os compostos maioritários são produzidos durante o processo fermentativo sendo sua formação influenciada principalmente pelas condições de fermentação (levedura, temperatura, etc). Por outro lado, os compostos voláteis minoritários derivam, em parte, da matéria-prima utilizada [3]. Todos estes compostos são de grande importância para a bebida, e devem estar presentes em concentrações adequadas de modo a proporcionar um sabor e aroma agradável ao destilado.

Encontra-se descrito que o perfil de voláteis de uma bebida é dominado pelos compostos formados na fermentação. Contudo, o carácter da bebida é modificado, com as quantidades absolutas e relativas das substâncias voláteis a serem alteradas durante a etapa de destilação e maturação [140]. Por este motivo, achou-se pertinente acompanhar o perfil e a concentração dos compostos voláteis presentes nas distintas etapas de produção do destilado de drêche. Foram identificados um total de 56 compostos. Salienta-se, porém, que a composição foi qualitativa e quantitativamente distinta entre as diferentes etapas processuais.

4.7.1 Compostos voláteis maioritários

Os compostos voláteis maioritários presentes nos fermentados e nos destilados antes e após aromatização foram analisados pela técnica GC-FID. Foram identificados 6 álcoois, 3 ésteres e 1 aldeído, perfazendo um total de 10 compostos, cujas respectivas concentrações se encontram apresentadas na Tabela 11.

Os álcoois superiores constituem, do ponto de vista quantitativo, a maior classe de compostos aromáticos presente nos destilados [44], [45]. Dentro desta classe, os álcoois alifáticos 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol e 1-propanol, foram os que registaram concentrações superiores, em concordância com o reportado anteriormente por outros autores [141], [142]. A biossíntese dos álcoois superiores é complexa uma vez que estes podem ser produzidos como subprodutos da via catabólica dos aminoácidos (reação de Ehrlich) ou terem origem no metabolismo dos carboidratos [143]. A presença desta classe de compostos desempenha um papel fundamental na qualidade do *flavour* da bebida [144]. Quando

presentes em concentrações inferiores a $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, os álcoois superiores contribuem para a desejada complexidade do *bouquet*. Por outro lado, as relações entre os compostos 3-metil-1-butanol/2-metil-1-propanol e 2-metil-1-propanol/1-propanol são usualmente consideradas indicadoras da qualidade da bebida, encontrando-se estabelecido que a relação deve ser superior a 1 [145]. Ambos os destilados cumprem este requisito, apresentando uma qualidade organolética aceitável para o consumo humano. Os álcoois superiores podem também aumentar algumas notas já existentes no destilado, por sinergia com outros compostos [146].

Entre os álcoois identificados, salienta-se o papel do 1-propanol e do metanol. O primeiro álcool mencionado destaca-se pelo seu forte efeito sobre o aroma da bebida. Quando presente em baixas concentrações, este composto proporciona um odor doce agradável, contudo níveis excessivos de 1-propanol podem mascarar todas as notas positivas do destilado, devido à exalação de um odor forte a solvente [147]. Contrariamente, o metanol não apresenta nenhum odor específico e, por conseguinte, não é um composto importante do ponto de vista do *flavour* da bebida. Porém, o controlo do teor de metanol presente em bebidas alcoólicas é fundamental devido à elevada toxicidade deste composto [44]. As concentrações deste composto nos destilados 1 e 2 com e sem aromatização encontram-se bastante abaixo do limite estabelecido pela lei em vigor ($1000 \text{ g}\cdot\text{hL}^{-1}$ em 100 % de volume de etanol) [9], tornando-os adequados para o consumo humano. Relativamente ao efeito da aromatização com as aparas de madeira sobre o conteúdo dos álcoois, dois efeitos distintos foram observados. No caso do metanol e do 2-feniletanol, a aromatização conduziu a um incremento das suas concentrações. O 2-feniletanol é um álcool que confere um aroma agradável ao destilado, estando associado com notas de “rosas”, “doce” e “perfumado”. Fenómenos de evaporação de etanol e consequente concentração dos compostos menos voláteis [148], podem explicar o aumento de metanol verificado. Em oposição, as concentrações de 1-propanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol registaram uma diminuição, que poderá dever-se à ocorrência de reações de oxidação [30].

Outra classe de compostos detetada foi a dos ésteres. Estes compostos são produzidos pela levedura durante a fermentação através da reação de esterificação entre os álcoois e os ácidos gordos.

Tabela 11 – Identificação dos compostos voláteis maioritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com a correspondente concentração (*C*), limiar de perceção (*PT*) e descritores aromáticos reportados

	<i>C</i> /mg·L ⁻¹						<i>PT</i> /mg·L ⁻¹	Descritor aromático
	F1	D1	DA1	F2	D2	DA2		
Álcoois								
metanol	9,59	6,42	25,53	8,11	3,32	15,59	–	–
2-metil-1-butanol	6,58	92,07	107,93	10,06	172,43	162,87	7 [149], [150] ^(c)	Álcool, banana, solvente, medicinal, doce, aromático [151], [152]
3-metil-1-butanol	28,49	423,44	423,87	39,02	635,71	609,97		
1-propanol	11,57	203,02	161,39	13,72	228,44	215,11	750 [151] ^(a)	–
2-metil-1-propanol	18,19	282,00	268,30	38,20	629,53	599,84	65 [151] ^(d)	Álcool, banana, solvente, medicinal [151], verniz [42]
2-feniletanol	18,93	24,55	57,50	18,62	38,31	46,98	7,5 [150] ^(c) 14 [149] ^(b)	Rosas, doce, perfumado [151]
Ésteres								
acetato de etilo	68,78	871,35	597,62	2,17	125,10	104,94	12,3 [149] ^(b) 17 [150] ^(c)	Solvente, frutado [44], [151], [152], verniz [153]
acetato de metilo	13,83	151,73	132,77	7,76	101,98	83,71	–	Frutado, doce [154]
lactato de etilo	9,37	6,70	6,02	8,86	5,62	4,13	–	Manteiga, frutado, coco [154]
Aldeídos								
acetaldeído	15,31	157,97	155,96	30,61	213,79	165,85	25 [151] ^(a)	Noz, xerez, folhas verdes [151]

^(a) Limiar de perceção olfativa em vinho; ^(b) Limiar de perceção olfativa numa solução modelo; ^(c) Limiar de perceção olfativa numa solução hidroalcoólica

^(d) Limiar de perceção olfativa em cerveja; ^(e) Limiar de perceção olfativa em água.

O acetato de etilo é tipicamente o éster mais abundante, derivado da condensação do ácido acético com o etanol. Este éster exerce um efeito significativo nas características organolépticas dos vinhos e dos destilados. A sua presença em baixas concentrações confere um agradável aroma frutado porém, quando encontrado em níveis superiores a $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ proporciona características de deterioração à bebida, apresentando um aroma a cola e verniz [44]. A Tabela 11 revela que a concentração deste composto aumentou notoriamente com a etapa de destilação, atingindo níveis potencialmente prejudiciais para a qualidade da bebida, em particular no lote 1. O acetato de metilo apresentou o mesmo comportamento. Contrariamente, a concentração de lactato de etilo nos destilados foi inferior à observada nos respetivos fermentados, o que se deve ao facto deste composto ser maioritariamente destilado nas últimas frações [155], que foram, em grande parte, descartadas. A presença deste composto em baixas concentrações ($< 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, em 100 % de volume de etanol) permite estabilizar o *flavour* do destilado e suavizar o sabor áspero [44]. A aromatização dos destilados com aparas de madeira levou à diminuição da concentração do acetato de etilo e do acetato de metilo. Tendo em conta que os ésteres foram produzidos em excesso durante a fermentação, o contacto com as aparas de madeira poderá proporcionar uma hidrólise gradual destes compostos até que se atinga um equilíbrio químico com os ácidos e álcoois correspondentes. Este fenómeno já foi recentemente observado por Kyraleou et al. (2016) [156].

Além dos álcoois e dos ésteres, compostos carbonílicos de baixa massa molecular como os aldeídos e as cetonas são também usualmente encontrados nas bebidas alcoólicas como subprodutos da fermentação da levedura. Contudo, a sua presença não é desejável uma vez que alguns deles conferem propriedades organolépticas desagradáveis [157]. No presente estudo, o acetaldeído foi o único composto carbonílico identificado entre os voláteis maioritários. Este composto é um intermediário da fermentação alcoólica, obtido a partir da descarboxilação do piruvato [17], e a sua concentração aumenta durante a etapa de destilação [53], tal como foi verificado neste estudo. Concentrações superiores a $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ afetam de modo negativo as propriedades organolépticas da bebida, conferindo um odor pungente irritante [50]. Apesar deste efeito negativo, a concentração registada para os destilados encontra-se dentro da faixa relatada para as aguardentes ($63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $308 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) [158].

Comparando a concentração dos compostos voláteis entre os dois lotes é perceptível a dissemelhança existente. É possível verificar que, de modo geral, o fermentado 2 (F2) apresenta concentrações de álcoois superiores mais elevadas, enquanto o fermentado 1 (F1) registou maiores quantidades de ésteres. Estes resultados corroboram a existência de diferenças no processo fermentativo

das duas réplicas processuais, já mencionadas. As diferenças observadas nos fermentados 1 e 2 foram propagadas para as etapas subsequentes de destilação e aromatização.

4.7.2 Compostos voláteis minoritários

Na categoria dos compostos voláteis minoritários foi possível identificar um total de 46 compostos, cujas concentrações se encontram na Tabela 12. Alguns destes compostos foram exclusivamente detetados numa determinada etapa processual.

A principal classe de compostos minoritários encontrada foram os ésteres. Durante a fermentação alcoólica há produção de duas classes de ésteres, os ésteres etílicos e os ésteres de acetato. Os primeiros são formados pela reação entre o etanol e os ácidos gordos ou ácidos orgânicos não voláteis. Por outro lado, os ésteres de acetato resultam da reação da acetil-CoA com os álcoois superiores formados pela degradação de aminoácidos ou de carboidratos [159].

Os ésteres de etilo de ácidos gordos são compostos tipicamente associados com o efeito *bouquet* e contribuem positivamente para o *flavour* do destilado conferindo um agradável sabor frutado e um aroma floral. Dentro desta classe de ésteres identificou-se o hexanoato de etilo, o octanoato de etilo, o tetradecanoato de etilo e o hexadecanoato de etilo, que foram detetados nos três produtos (fermentado, destilado e destilado aromatizado), tal como expectável [53]. O aumento das suas concentrações durante o processo de destilação deve-se ao facto de a maioria destes ésteres apresentar um baixo ponto de ebulição, destilando sobretudo nas frações iniciais (“cabeça” e “coração”) [155].

Relativamente aos ésteres de acetato, foram identificados dois compostos, o acetato de isoamilo e o acetato de 2-feniletilo, que conferem um carácter frutado e floral aos destilados [160]. Conforme pode ser visualizado na Tabela 12, o acetato de isoamilo foi o composto presente em maiores concentrações, tendo aparecido em todas as etapas do processo. A concentração de ésteres pode variar devido a reações de esterificação ou hidrólise química [161]. Porém, a variação da concentração dos ésteres durante a aromatização foi distinta, não sendo estabelecer uma tendência devido, possivelmente, ao curto tempo de contato do destilado com as aparas de madeira.

Foram também identificados alguns álcoois entre os voláteis minoritários, dos quais se destaca o 1-pentanol e o 1-hexanol, que registaram as concentrações mais elevadas. O 1-pentanol é produzido através de reações de oxidação lipídica [162], e confere notas de adstringência à bebida [163]. Porém, a sua presença esteve restringida aos fermentados e aos destilados, não sendo detetado nos aromatizados. Já o 1-hexanol, é um álcool que provém apenas da matéria-prima [164], e possui uma

influência positiva sobre o aroma do destilado quando presente em concentrações inferiores a $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, com uma descrição aromática de “coco”. Contrariamente, concentrações elevadas deste composto proporcionam um aroma pungente e gramíneo, afetando negativamente as características organoléticas do destilado [42]. Tendo em conta as baixas concentrações encontradas nos destilados aromatizados ($\approx 0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em ambos), pode-se considerar que este composto poderá contribuir positivamente para o *flavour* do destilado final. Ademais, também se detetou a presença de quantidades consideráveis de 4-metil-1-pentanol. Este álcool ramificado derivou, provavelmente, de reações de degradação de Strecker de aminoácidos, e encontra-se associado a descritores de aroma como “amêndoa” e “torrado” [163].

Relativamente aos ácidos, duas classes distintas foram identificadas entre os voláteis minoritários, os ácidos voláteis carboxílicos e ácidos gordos voláteis. Os primeiros derivam essencialmente da desaminação de aminoácidos seguida pela descarboxilação dos oxoácidos homólogos, enquanto os segundos constituem produtos intermediários da biossíntese lipídica [165]. A classe dos ácidos gordos voláteis assume um papel importante sobre a qualidade da bebida, em particular os ácidos de cadeia curta (ácido acético, isovalérico e isobutírico). O ácido acético é produzido em pequenas quantidades durante a fermentação e a sua presença na bebida é indesejável devido ao seu cheiro irritante e penetrante a vinagre [149], [153]. Como pode ser observado na Tabela 12 a concentração de ácido acético detetada no presente estudo foi baixa ($366,50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para lote 1 e $83,13 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para lote 2) e a sua presença restringiu-se aos fermentados. A ausência nos destilados poderá dever-se, essencialmente, ao facto de o ácido acético apresentar menor volatilidade do que o etanol [166], sendo separado aquando a destilação. Além disso, este composto está envolvido em reações de formação de outros compostos, dos quais é exemplo o acetato de etilo. Já o ácido isovalérico e o ácido isobutírico apresentaram elevadas concentrações em todas as etapas processuais. Estes ácidos têm um importante contributo para o aroma dos destilados, podendo apresentar um odor igualmente forte ao do ácido acético (vinagre) [52], [53]. Em contrapartida, de acordo com Silva e Malcata (1999), os ácidos gordos de cadeia longa (ácido pentanóico, hexanóico, heptanóico e octanóico) exercem um reduzido efeito nas propriedades organoléticas do destilado [53].

Tabela 12 – Identificação dos compostos voláteis minoritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com correspondente concentração (*C*), limiar de percepção (*PT*) e descritores aromáticos reportados

	<i>C</i> /μg·L ⁻¹						<i>PT</i> /μg·L ⁻¹	Descritor aromático
	F1	D1	DA1	F2	D2	DA2		
Álcoois								
álcool benzílico	42,21	—	—	111,81	—	—	200000 [167] ^(b)	Amêndoa, amargo [151]
4-metil-1-pentanol	49,43	402,19	343,72	41,75	447,56	394,43	50000 [168] ^(a)	Amêndoa, torrado [163]
1-hexanol	168,55	1040,23	873,66	104,99	967,14	860,05	8000 [169] ^(c)	Vegetal, erva, coco [170]
1-pentanol	1581,11	47730,31	—	9043,24	7710,03	—	64000 [171] ^(a)	Sintético, balsâmico, adstringência [163]
Ésteres								
acetato de isoamilo	110,94	871,70	818,72	24,95	560,82	384,83	30 [172] ^(c)	Banana [169]
acetato de 2-feniletilo	95,26	128,95	204,21	149,04	189,83	221,26	650 [150]; 250 [169] ^(c)	Rosas, mel, maçã, doce [151]
hexanoato de etilo	11,61	391,59	394,05	7,11	246,89	193,72	14 [168] ^(b)	Maçã, frutado, doce, anisado [151]
octanoato de etilo	—	186,28	121,07	—	269,88	270,88	5 [168] ^(b)	Maçã, frutado, doce [151]
tetradecanoato de etilo	—	79,21	65,23	—	105,14	68,34	4000 [173] ^(b)	Suave, ceroso, sabão [154]
hexadecanoato de etilo	164,44	378,14	355,79	60,83	251,27	201,77	2000 [173] ^(b)	Suave, ceroso, doce, leite, frutado [154]
Ácidos carboxílicos								
ácido benzóico	4917,25	102,02	46,73	2931,17	339,24	33,79	1000 [171] ^(a)	Químico [163]
ácido benzílico	—	42,32	23,78	—	148,46	207,70	—	—

Tabela 12 – Identificação dos compostos voláteis minoritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com correspondente concentração (*C*), limiar de percepção (*PT*) e descritores aromáticos reportados (continuação)

	<i>C</i> /μg·L ⁻¹						<i>PT</i> /μg·L ⁻¹	Descritor aromático
	F1	D1	DA1	F2	D2	DA2		
Ácidos gordos voláteis								
ácido acético	366,50	—	—	83,13	—	—	300000 [149] ^(b)	Vinagre, azedo, pungente [149], [153]
ácido isobutírico	358,44	994,38	807,73	186,08	705,79	1039,19	2300 [168] ^(b)	Suado, amargo, vinagre [151]
ácido isovalérico	437,02	4711,04	3787,84	543,10	2984,19	4124,89	33 [168] ^(a)	Ácido, rançoso, queijo [163]
ácido pentanóico	35,76	236,61	230,16	15,02	178,11	187,41	—	Queijo, ácido [174]
ácido hexanóico	52,27	226,63	359,90	35,03	247,99	509,35	420 [151] ^(a)	Queijo, suado, óleo vegetal [175]
ácido heptanóico	51,72	—	—	28,23	—	—	—	Rançoso, queijo, suor [154]
ácido octanóico	—	205,02	122,76	—	184,23	220,21	500 [168] ^(a)	Suor, queijo [170]
Fenóis voláteis								
guaiacol	89,01	416,41	483,93	92,07	734,89	760,61	10 [169] ^(c)	Fumo, especiarias, fenólico, madeira [170]
4-vinilguaiacol	102,01	4165,43	4207,40	36,04	2639,57	1617,62	130 [176]; 1100 [168] ^(b)	Fenólico, amargo [151], farmacêutico [177]
siringol	50,40	—	303,84	89,87	—	310,82	—	Fenólico, químico [7]
eugenol	—	30,47	38,53	—	37,49	46,96	6 [168]; 15 [176] ^(b)	Cravo-da-índia [175], [176]

Tabela 12 – Identificação dos compostos voláteis minoritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com correspondente concentração (*C*), limiar de percepção (*PT*) e descritores aromáticos reportados (continuação)

	<i>C</i> /μg·L ⁻¹						<i>PT</i> /μg·L ⁻¹	Descritor aromático
	F1	D1	DA1	F2	D2	DA2		
Fenóis voláteis								
4-vinifenol	—	26,16	8,06	—	21,78	18,48	180 [176] ^(b)	Farmacêutico [177], estramónio [176]
acetovanilona	—	—	31,00	—	—	39,81	1000 [167] ^(a)	Especiarias doces [171]
vanilina	—	—	1226,89	—	—	1467,32	200 [169] ^(c)	Baunilha [178]
siringaldeído	—	—	2824,30	—	—	4524,92	25000 [179] ^(c)	Suave, doce [180]
Aldeídos								
benzaldeído	119,17	452,04	548,30	—	461,54	399,45	5000[181] ^(c)	Amêndoa [171]
fenilacetaldeído	—	5252,14	4709,78	—	4945,06	4080,86	5 [149] ^(c)	Mel, doce [178]
4-etilbenzaldeído	139,5	76,0	144,8	255,7	41,6	149,9	—	—
Cetonas								
acetoína	153,25	—	—	73,83	—	—	150000 [168] ^(c)	Lático, creme [178]
1-(2-furanyl)-1-propanona	39,33	—	—	44,29	—	—	—	Frutas, doce, caramelo [154]
ciclopentanona	79,61	743,85	650,73	102,96	730,87	730,62	—	Menta, hortelã [154]
Terpenos								
α-terpineol	35,16	324,84	399,15	26,87	404,57	420,66	250 [168] ^(b)	Pinheiro, terpeno [151]
1,8-cineol	—	2942,47	2096,64	—	2285,92	2233,24	3,2 [182] ^(a)	Eucalipto, menta [182]

Tabela 12 – Identificação dos compostos voláteis minoritários detetados nos fermentados (F1 e F2), nos destilados (D1 e D2) e nos destilados após aromatização (DA1 e DA2) com correspondente concentração (*C*), limiar de percepção (*PT*) e descritores aromáticos reportados (continuação)

	<i>C</i> /μg·L ⁻¹						<i>PT</i> /μg·L ⁻¹	Descritor aromático
	F1	D1	DA1	F2	D2	DA2		
Lactonas								
γ-nonalactona	—	592,61	348,27	—	238,97	216,46	30 [183] ^(a)	Coco, doce, frutados, baunilha [184]
<i>whiskey</i> lactona I	—	—	74,42	—	—	108,61	67 [171] ^(a)	Coco, carvalho [178]
<i>whiskey</i> lactona II	—	—	847,37	—	—	520,05	—	Coco, carvalho [178]
Furanos								
2-acetilfurano	764,94	4940,27	4077,88	455,57	4837,71	4575,78	—	Amêndoa, caramelo, café [185]
5-metilfurfural	448,72	2092,72	1912,96	463,14	2713,81	2764,60	—	Doce, amêndoa torrada, caramelo [154]
furfural	597,66	—	—	164,31	—	—	14100 [171] ^(a)	Amêndoa torrada [154]
2-furanometanol	3222,30	3093,56	2467,92	1734,23	1647,85	2082,18	—	Doce, alcoólico, carne, queimado [186]
Pirazinas								
2-metil-pirazina	106,40	655,39	416,42	169,75	695,76	597,33	60 [187] ^(e)	Queimado [188]
2,5-dimetilpirazina	64,14	409,14	361,85	56,98	504,64	452,76	1700 [187] ^(e)	Cacau, avelã, torrado, café [154]
2,3,5-trimetil-pirazina	545,64	3506,16	2807,42	132,92	1379,48	1363,32	—	Nozes, queimado [139]
2,3,5,6-tetrametil-pirazina	616,95	4709,88	6946,93	620,04	5452,70	7071,66	—	—

^(a) Limiar de percepção olfativa em vinho; ^(b) Limiar de percepção olfativa numa solução modelo; ^(c) Limiar de percepção olfativa numa solução hidroalcoólica

^(d) Limiar de percepção olfativa em cerveja; ^(e) Limiar de percepção olfativa em água.

Outra classe de compostos detetada foi a dos fenóis voláteis. A maioria destes compostos apresenta um limiar de percepção olfativo bastante baixo, podendo ser facilmente detetados [143]. Contudo, a sua influência sobre o produto final pode ser positiva ou negativa dependendo das concentrações em que se encontram. Dentro desta classe de voláteis emergem dois grupos distintos de compostos: (1) os derivados da matéria-prima (drêche) e os (2) derivados da madeira de carvalho utilizada no processo de aromatização. No primeiro grupo encontram-se compostos como o guaiacol, o 4-vinilguaiacol, o siringol, o eugenol e o 4-vinifenol. O aparecimento destes compostos está associado com a degradação térmica da lenhina [189]. Parte deles é diretamente produzida durante o tratamento hidrotérmico que antecedeu a etapa de HSF, enquanto outra é produzida já durante a etapa fermentativa, através da descarboxilação de ácidos hidroxicinâmicos, num processo não oxidativo conduzido pela *S. cerevisiae* [190]. A maturação em madeira de carvalho é também um reconhecido processo que incrementa a quantidade de voláteis fenólicos encontrados na bebida [143]. Este efeito foi observado no presente estudo, com os destilados aromatizados a registarem quantidades superiores de fenóis, comparativamente com os respetivos destilados. A Tabela 12 evidencia também uma ausência dos compostos eugenol e vinifenol nos fermentados e um aparecimento nas etapas subsequentes (destilado e aromatizado). Estes resultados parecem sugerir que os compostos já estariam presentes nos fermentados, porém em concentrações inferiores ao limiar de deteção do equipamento, tornando-se apenas possível quantificá-los após o processo de destilação, como consequência do seu efeito de concentração. O guaiacol e o 4-vinilguaiacol foram os fenóis que registaram as concentrações mais elevadas. O guaiacol confere notas medicinais, doce e de fumo à bebida, e o seu limiar de percepção olfativo ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [169], foi largamente excedido em todas as amostras. Já o 4-vinilguaiacol está associado com notas fenólicas, e o seu limiar de percepção foi particularmente ultrapassado no destilado aromatizado 1 (DA1). No segundo grupo de fenóis encontram-se a acetovanilona, a vanilina e o siringaldeído, que apresentam um contributo sensorial positivo. Os primeiros dois compostos referidos possuem uma forte correlação com o aroma e sabor a baunilha, enquanto o siringaldeído confere notas de doçura suave [180]. Atendendo que estes compostos foram apenas identificados nos destilados aromatizados, é possível afirmar que derivam exclusivamente do contacto com as aparas de madeira de carvalho. Estes fenólicos provêm da degradação da lenhina e estão tipicamente presentes na madeira torrada [34].

Além dos ésteres, álcoois, ácidos e fenóis voláteis, outros componentes, incluindo aldeídos, cetonas, terpenos, lactonas, pirazinas e furanos, foram também identificados.

Entre os aldeídos presentes, o fenilacetaldéido foi o composto identificado em maior proporção. Este aldeído é um reconhecido produto de degradação de *Strecker*, do aminoácido fenilalanina [191]. Pode-se especular que esta reação ocorreu durante o processo de destilação, por ação do calor, justificando a sua ausência nos fermentados. Adicionalmente, é perceptível uma diminuição da sua concentração nos destilados aromatizados (Tabela 12), coincidente com o aumento do respetivo álcool, 2-feniletanol (Tabela 11). O fenilacetaldéido é citado na literatura como um importante odorífero, estando geralmente associado com as notas “floral” e “verde”. Por outro lado, quando presente em concentrações superiores ao seu limiar de percepção ($40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pode conferir um aroma de “madeira velha” à bebida [41]. Atendendo que as concentrações do referido composto nos destilados aromatizados excedem bastante o limiar de percepção, é possível que este composto tenha um impacto acentuado na qualidade sensorial do produto.

Dentro da classe das cetonas identificaram-se três compostos, a acetoina, a 1-(2-furanyl)-1-propanona e a ciclopentanona. Destes três, apenas a ciclopentanona foi encontrada em todos os produtos analisados (fermentado, destilado e aromatizado), e apresenta descritores de aroma como “menta” e “hortelã” [154].

Na classe dos terpenos foram apenas detetados dois compostos, o α -terpineol e o 1,8-cineol (eucaliptol). Os terpenos podem ter origem na matéria-prima ou serem libertados por ação de α -glucosidases da levedura, durante o processo fermentativo [16]. Este grupo de compostos é considerado um fator de qualidade positiva nas bebidas, contribuindo para o seu aroma e proporcionando um carácter único e diferenciado à bebida [42], [192]. O 1,8-cineol apresenta um limiar de percepção muito baixo ($3,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e aparece associado com o aroma a “eucalipto” e “menta” [182], enquanto o α -terpineol possui um limiar de percepção superior ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e confere um aroma floral ou de pinheiro [151].

A análise de compostos voláteis também evidenciou a presença de três lactonas distintas. A γ -nonalactona e os isómeros de *whiskey* lactona aparecem sobretudo associadas com o aroma de coco e doces frutados, contribuindo positivamente para as características organoléticas da bebida [129,130]. A γ -nonalactona é formada através de reações de oxidação de lípidos, constituindo um produto primário da degradação lipídica [193]. Este tipo de reações é favorecido pela existência de elevadas temperaturas [193], o que pode justificar o aparecimento deste composto após o processo de destilação. Já as *whiskey* lactonas, detetadas apenas nos aromatizados, constituem compostos que o destilado extrai da madeira durante o período de contato com as aparas de carvalho [9].

Por último, foram identificados 4 furanos e 4 pirazinas, cuja origem pode ser atribuída a reações de caramelização e de *Maillard*, respetivamente [194], [195], que ocorreram durante a etapa de pré-tratamento a 160 °C. Durante a autohidrólise, as condições ácidas e a elevada temperatura provocam a desidratação das pentoses e das hexoses, (reação de caramelização) resultando, respetivamente, na formação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) [195]. O furfural foi apenas detetado nos fermentados. A não deteção deste composto após a destilação pode ser explicada pelo facto do furfural ser maioritariamente encontrado na fração “cauda”. Por outro lado, a presença de grandes quantidades de 2-furanometanol sugerem a ocorrência de reações de redução do furfural [194], contribuindo para o desaparecimento deste composto. Adicionalmente, foram também detetados níveis consideráveis de 5-metilfurfural (produto da decomposição do HMF) [196] e em particular de 2-acetilfurano. A classe dos furanos possui uma variedade de propriedades sensoriais e apresentam importantes correlações com os descritores sensoriais olfativos “amêndoa”, “caramelo” e “torrado” [185], [154]. Já as pirazinas advêm da interação química que se estabelece entre os carboidratos e as proteínas (reações de *Maillard*), sendo que a rota de formação mais direta resulta da interação entre os α -dicarbonílicos (provenientes dos açúcares) e as aminas (derivadas dos aminoácidos) [197]. As pirazinas conferem, geralmente, notas agradáveis de sabor como “torrado”, “noz”, “manteiga”, porém descritores negativos como “fenólico”, “medicinal” e “verde” também já foram apontados [198]. O composto representante desta classe em maior quantidade foi a 2,3,5,6-tetrametilpirazina, seguido pela 2,3,5-trimetilpirazina. De maneira geral, as pirazinas e os furanos foram detetados nos fermentados e sofreram aumentos da sua concentração durante o processo de destilação, como resultado de reações de *Maillard* que também ocorrem durante a destilação [21]. Já durante a aromatização, a maioria dos compostos registou uma redução da concentração, comparativamente com o respetivo destilado.

De modo análogo ao observado nos compostos maioritários, constatou-se a existência de diferenças entre a composição dos dois lotes. A coloração do destilado ao longo do período de aromatização alterou-se, adquirindo um tom amarelado. Segundo Singleton (1995), a extração de compostos, principalmente taninos, e as suas reações de oxidação, são os principais responsáveis pelo progressivo escurecimento ou intensificação da cor amarelo-alaranjado em bebidas submetidas a maturação em barricas de madeira [179].

Em suma, a análise dos compostos voláteis, quer maioritários como minoritários, revelou a presença de diversos compostos em concentrações superiores ao seu limiar de perceção (concentração mínima para que seja possível perceber a presença de determinado composto). Entre os voláteis maioritários, destaca-se particularmente o 3-metil-1-butanol e o 2-metil-1-butanol que excederam

largamente os seus limiares de percepção, sugerindo um grande impacto sobre o aroma do produto final. Por outro lado, os fenóis voláteis e as lactonas foram as principais classes de compostos minoritários que registaram concentrações acima do respetivo limiar de percepção. Contudo, isto não implica necessariamente que estes compostos sejam os mais significativos em termos de avaliação sensorial. Embora o limiar de percepção de odor seja frequentemente utilizado para descrever a influência de um composto particular no aroma, existem diversos fatores que podem provocar variações na avaliação de uma mistura complexa. De facto, efeitos sinérgicos e/ou antagónicos podem ocorrer na percepção do odor. Por vezes, uma mistura de compostos pode ser detetada mesmo que todos os componentes estejam presentes em concentrações inferiores ao limiar. Por outro lado, alguns compostos podem ocultar a percepção de outros, fazendo com que estes não sejam detetados mesmo que estejam em concentrações superiores ao seu limiar [199], [200]. Ademais, cabe também salientar que os valores de limiar de percepção apresentados não são, na maioria dos casos, para bebidas com alto teor alcoólico, como os destilados produzidos.

4.8 Análise sensorial dos destilados aromatizados

Por fim, de modo a correlacionar e complementar os dados analíticos e avaliar a qualidade organolética dos destilados aromatizados foi realizada uma prova de análise sensorial. As duas amostras de destilados aromatizados foram avaliadas por um painel de 5 indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 24 e os 60 anos. As amostras foram analisadas considerando-se 34 atributos sensoriais, englobados nos parâmetros aparência (3), aroma (16), sabor (10) e sensação nasal/gustativa (5). Foi também avaliada a qualidade global de cada parâmetro e do produto final (impressão global de cada um dos destilados aromatizados). Os perfis sensoriais dos dois destilados encontram-se na Figura 11, a qual se apresenta em coordenadas polares, com a escala de intensidade correspondente à Ficha de Prova Sensorial (Anexo All).

A média de cada atributo foi posicionada na escala e o perfil sensorial de cada destilado foi traçado pela união dos respetivos pontos. Os atributos que apresentaram baixa intensidade (<1) para ambos os destilados foram excluídos dos diagramas. Adicionalmente, considerando que é indispensável a formação de um painel de avaliadores consonantes em relação às avaliações dos atributos sensoriais de um produto, os resultados obtidos foram previamente sujeitos a uma análise de *outliers*, caracterizados por indivíduos inconsistentes em relação aos demais. Os *outliers* identificados foram eliminados para efeitos

de cálculo da média de intensidade do atributo, para obtenção de maior precisão, mas considerados na determinação da frequência.

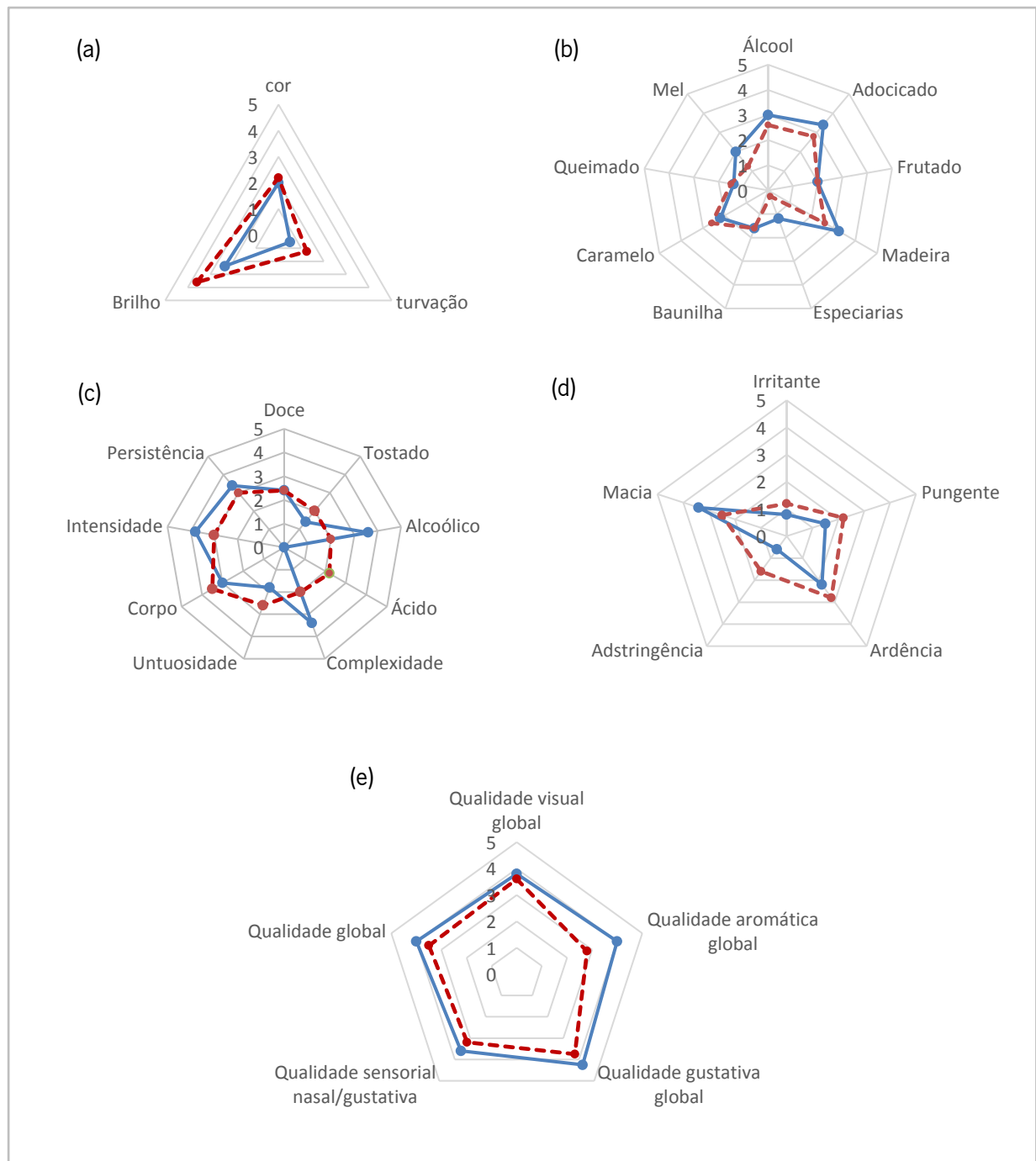


Figura 11 – Perfis sensoriais obtidos através da média da intensidade atribuída a cada descritor pelo painel de provadores, do destilado aromatizado 1 (—) e 2 (- - -); (a) análise visual, (b) análise olfativa, (c) análise gustativa, (d) sensação nasal/gustativa e (e) qualidade global de cada parâmetro e do produto final. A análise do atributo “cor” foi realizada qualitativamente, com os números de 1 a 5, estando associados a uma cor específica (1– amarelo claro; 2– amarelo dourado; 3– amarelo torrado; 4– castanho; 5– castanho avermelhado).

Os perfis sensoriais evidenciam a existência de diferenças entre os dois destilados aromatizados. Salvo duas exceções dentro do parâmetro “aroma”, foram identificados os mesmos descritores para ambos os destilados. Contudo, as intensidades atribuídas foram, na maioria dos casos, distintas, originando as dissemelhanças observadas na Figura 11.

Os atributos sensoriais identificados nas amostras e a correspondente frequência relativa (F) e intensidade (I) obtida após caracterização sensorial pelo painel de provadores encontram-se representados na Tabela 13.

Dos 16 atributos sensoriais considerados dentro do parâmetro “aroma”, três foram excluídos devido ao facto de não terem sido detetados por nenhum provador. Na análise visual, o descritor “brilho”, apresentou elevada frequência (100 % em ambos os destilados) e intensidade (3,2 no destilado 1 e 3,6 no destilado 2). Por outro lado, apenas 60 % dos avaliadores identificou turvação no destilado 1 e a intensidade atribuída foi baixa (0,5), resultados estes que diferem dos obtidos para o destilado 2, onde se registou uma frequência de 100 % e uma intensidade superior (1,25), para este atributo visual. A cor teve a avaliação mais consensual entre o painel, uma vez que todos os provadores classificaram como “amarelo dourado” ambos os destilados. A maior intensidade para a análise olfativa (aroma), em ambos os destilados, foi encontrada nos descritores “álcool/solvente”, “adocicado”, “madeira” e “caramelo”, que constituíram também os atributos com frequência mais elevada dentro deste grupo (100 %). Na análise gustativa, os descritores “corpo”, “intensidade” e “persistência” registaram valores de intensidade superiores a 3, em ambos os destilados. Outro aspeto notório é que a frequência com que estes atributos foram identificados foi de 100 % para o destilado 1 (exceto na complexidade) e de 80 % no destilado 2, embora as avaliações tenham sido mais consensuais no destilado 2, perceptível pelos desvios padrão mais baixos.

Além disso, no destilado 1 os descritores “alcoólico” e “complexidade” também foram detetados e apontados com elevada intensidade (>3). Já na análise da sensação nasal/gustativa, o descritor “macia” e “ardência” foram os que registaram maior intensidade em ambas as amostras. Contudo, a avaliação do atributo “ardência” foi bastante variada, com alguns indivíduos a atribuir uma intensidade fraca ou nula enquanto outros classificaram como muito forte. O mesmo foi verificado quanto aos atributos “frutos secos” e “fumo/cinzas”, na análise olfativa, denotando-se uma grande heterogeneidade de avaliação entre os indivíduos do painel.

Tabela 13 – Frequência relativa (*F*), Intensidade (*I*) e respetivo desvio padrão (*SD*) determinados para os descritores detetados nos destilados 1 e 2 na caracterização sensorial efetuada pelo painel de provadores

Descritores	Destilado 1		Destilado 2	
	<i>F</i> /%	<i>I</i> ± <i>SD</i>	<i>F</i> /%	<i>I</i> ± <i>SD</i>
Análise visual				
Turvação	60	0,5 ± 0,6	100	1,3 ± 0,5
Brilho	100	3,2 ± 0,6	100	3,6 ± 1,1
Análise olfativa				
Álcool/Solvente	100	3,0 ± 0,7	100	2,6 ± 0,9
Adocicado	100	3,4 ± 1,1	100	2,8 ± 1,5
Frutado	80	2,0 ± 1,6	60	2,0 ± 2,0
Madeira	100	3,3 ± 0,5	100	2,6 ± 1,8
Especiarias	60	1,2 ± 1,3	40	0,3 ± 0,5
Baunilha	80	1,6 ± 1,1	80	1,6 ± 1,1
Caramelo	100	2,2 ± 0,8	100	2,6 ± 0,6
Queimado/Torrado	80	1,4 ± 0,9	100	1,5 ± 0,6
Frutos secos	40	0,4 ± 0,5	40	0,4 ± 0,5
Fumo/cinzas	40	0,6 ± 0,9	40	0,6 ± 0,8
Café	20	0,0 ± 0,0	0,0	0,0 ± 0,0
Cola/Verniz	60	1,0 ± 1,0	40	0,3 ± 0,5
Mel	80	2,0 ± 1,4	80	1,3 ± 0,9
Análise gustativa				
Doce	100	2,4 ± 1,1	100	2,4 ± 1,7
Amargo	80	1,0 ± 0,7	80	1,0 ± 0,7
Tostado	80	1,4 ± 1,1	80	2,0 ± 2,0
Alcoólico	100	3,6 ± 1,3	60	2,0 ± 1,9
Ácido	20	0,0 ± 0,0	80	2,2 ± 1,6
Complexidade	80	3,4 ± 0,5	80	2,0 ± 1,6
Untuosidade (gorduroso)	100	1,8 ± 1,3	80	2,6 ± 1,7
Corpo	100	3,0 ± 0,7	80	3,5 ± 0,6
Intensidade	100	3,8 ± 1,3	80	3,0 ± 0,5
Persistência	100	3,4 ± 0,9	80	3,0 ± 1,0
Sensação nasal/gustativa				
Irritante	60	0,8 ± 0,8	80	1,2 ± 0,8
Pungente	100	1,5 ± 0,6	80	2,2 ± 1,6
Ardência	80	2,2 ± 2,2	80	2,8 ± 2,3
Adstringência	60	0,6 ± 0,5	80	1,6 ± 1,1
Macia	100	3,4 ± 0,9	80	2,5 ± 0,6
Qualidade				
Qualidade visual global	100	3,8 ± 0,8	100	3,6 ± 1,1
Qualidade aromática global	100	4,0 ± 0,0	100	2,8 ± 1,5
Qualidade gustativa global	100	4,3 ± 0,5	100	3,8 ± 0,5
Qualidade sensorial nasal/gustativa	100	3,6 ± 1,1	100	3,2 ± 1,3
Qualidade global	100	4,0 ± 0,7	100	3,5 ± 1,3

Os atributos sensoriais associados aos diferentes compostos estão substancialmente envolvidos no aroma da bebida, podendo ser percebidos pelos provadores. Deste modo, diferenças na composição de voláteis, ainda que reduzidas, podem conduzir a avaliações sensoriais diferentes.

A partir da Figura 11 e da Tabela 13 é possível observar que o destilado 1 apresentou, comparativamente com o destilado 2, intensidades superiores nos atributos que, em geral, contribuem positivamente para a qualidade sensorial das bebidas destiladas (aroma “adocicado”, “amadeirado” e “mel”, complexidade de sabor e uma sensação nasal/gustativa “macia”). A maior intensidade do aroma “madeira” poderá ser em grande parte justificada pela presença lactonas (γ -nonalactona e *whiskey* lactonas I e II) e fenóis voláteis, enquanto o aroma a “mel” poderá ser atribuído ao fenilacetaldéido, cujas concentrações no destilado 1 foram bastantes superiores às encontradas no destilado 2.

Cabe ainda destacar que a percepção do odor doce aparece tipicamente associada com os descritores “mel”, “baunilha” e “caramelo”. Os ésteres, em particular os ésteres de etilo, também aparecem frequentemente associados com o descritor “doce” e, tendo em conta que se verificou concentrações superiores desta classe no destilado 1, é plausível que também contribuam para as diferenças de doçura percebidas pelos provadores. Ademais, o destilado 1 também se distinguiu do 2 por apresentar maior “intensidade” e “persistência” de sabor.

Em contrapartida, o destilado 2 apresentou intensidades superiores ao destilado 1 em atributos que, quando presentes de forma não equilibrada, constituem defeitos sensoriais (pungência, ardência, irritante, adstringência e acidez). A sensação de ardência que surge quando se prova uma bebida destilada é sobretudo provocada pelos elevados níveis de etanol presente no produto, embora outros álcoois e compostos do tipo solvente também possam contribuir para essas sensações [136]. Apesar do destilado 2 ter sido classificado com maior intensidade no descritor “ardência” em comparação com o destilado 1, as avaliações foram pouco consensuais em ambas as amostras. É necessário ter em conta que o painel de provadores era constituído por indivíduos não treinados que poderão ter passado por diferentes adaptações sensoriais. Efetivamente, a repetição constante de uma mensagem sensorial no cérebro (como a ardência provocada por uma bebida com elevado teor alcoólico), levará a uma supressão da sensibilidade à fonte de estimulação [201]. Esta adaptação sensorial poderá estar na base da heterogeneidade observada na avaliação do atributo “ardência”. A sensação “pungente”, designa a percepção de ardência nas mucosas nasais e/ou bucais. A maior intensidade identificada no destilado 2 poderá estar associada com o maior nível de álcoois superiores desta amostra comparativamente com o destilado 1 (Tabela 12), que conferem um cheiro e sabor forte e pungente [190]. O descritor “irritante”

aparece intimamente relacionado com a sensação pungente. Porém, o aroma a “álcool/solvente” e o sabor “alcoólico” foram identificados com maior intensidade no destilado 1.

Por outro lado, a acidez descrita na análise gustativa é diretamente suportada pelas maiores concentrações de ácidos carboxílicos no destilado 2. Geralmente, os níveis de ácidos são demasiado baixos para ter um impacto sensorial significativo, contudo em níveis elevados podem ser percebidos pelos provadores [202], tal como verificado nesta análise sensorial. No que concerne à adstringência (percepção de secura na mucosa oral), a sua correlação com um determinado grupo de compostos voláteis é difícil, uma vez que esta percepção pode ser produzida por uma variedade de compostos, incluindo compostos fenólicos, ácidos orgânicos e agentes desidratantes como os álcoois [203].

A percepção de uma nota aromática é influenciada não só pela presença de alguns componentes cujo aroma formam a nota, mas também pela presença de outros odorantes que afetam positiva ou negativamente a percepção de tal nota aromática [204]. Deste modo, é possível que a intensidade dos defeitos sensoriais identificados no destilado 2 tenha mascarado/diminuído a percepção de alguns atributos considerados positivos para as características organoléticas da bebida, depreciando a sensação nasal/gustativa e concomitantemente a qualidade aromática e gustativa global do destilado 2.

Outros descritores detetados, embora com uma intensidade fraca, incluem o aroma “frutado”, “especiarias”, “baunilha”, “caramelo”, “queimado/torrado”, “frutos secos”, “cinzas/fumo” e “cola/verniz”. Todas estas notas aromáticas, à exceção de “cola/verniz”, são essencialmente promovidas por fenóis voláteis, furanos e pirazinas.

O destilado 1 foi considerado pelo painel de provadores uma amostra de qualidade superior ao destilado 2, reunindo cotações mais elevadas na avaliação da qualidade global de cada parâmetro (aparência, aroma, sabor e sensação nasal/gustativa) e do destilado em geral. Além disso, é também notório que a avaliação da qualidade do destilado 1 foi mais uniforme e consensual entre o painel comparativamente com a do destilado 2, no qual as avaliações foram mais divergentes.

É necessário salientar, no entanto, que a avaliação sensorial efetuada neste estudo não representa um teste analítico sensorial controlado, permitindo apenas destacar os problemas gerais do produto e ter uma noção geral das suas características organoléticas.

Em suma, sabe-se que a qualidade das bebidas destiladas é afetada por diversos fatores nomeadamente, matéria-prima utilizada, condições de fermentação (inclusive a estirpe de levedura) e de destilação selecionadas, processo de envelhecimento, entre outros [205]. Atendendo aos resultados de análise sensorial apresentados nesta secção, é possível concluir que as condições processuais utilizadas para a elaboração da bebida destilada de drêche permitiram a produção de uma bebida com

características organoléticas aceitáveis, demonstrando a sua viabilidade. Porém, o facto de as duas réplicas de destilado terem apresentado uma caracterização química (secção 4.7) e perfis sensoriais distintos evidencia que é necessário reduzir a heterogeneidade associada a cada uma das etapas processuais de modo a aumentar a reprodutibilidade do produto final.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO

Este trabalho investigou a utilização da drêche como matéria-prima única na produção de uma bebida destilada. O estudo foi conduzido no sentido de maximizar a concentração de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, de etanol obtido, procurando operar em condições processuais de máxima eficiência.

As seis drêches mostraram-se quimicamente heterogêneas, refletindo a influência das condições processuais de produção da cerveja, na sua composição química. Entre as drêches estudadas, a drêche D e a drêche E apresentaram o maior conteúdo de glucano, sendo selecionadas pelo seu alto potencial para a produção de etanol.

Os ensaios de suscetibilidade enzimática das drêches *in natura* demonstraram a presença de frações imediatamente sacarificáveis, as quais se presumiram ser polissacáridos solúveis de glucose e uma parte da fração hemicelulósica.

Relativamente aos ensaios de pré-tratamento, a autohidrólise a 160 °C durante 5 min e com uma carga de sólidos de 25 % (m·v⁻¹) revelou ser, entre as condições testadas, a que possibilita não só uma boa extração de glucose e solubilização parcial da hemicelulose, como também uma melhoria significativa na digestão enzimática, fator este importante para maximizar o rendimento na produção de etanol.

O aumento da carga de sólidos na sacarificação da drêche tratada e não tratada conduziu a um incremento da concentração de glucose, contudo provocou uma diminuição no rendimento da sacarificação. De modo geral, a realização de uma etapa prévia de pré-tratamento permitiu uma melhoria no rendimento global do processo, atingindo-se concentrações de glucose e rendimentos superiores aos alcançados na respetiva sacarificação da drêche sem pré-tratamento. Embora na sacarificação da drêche pré-tratada também se tenha observado um decréscimo no rendimento, o aumento da carga de sólidos de 20 % para 25 %, em massa, possibilitou um incremento considerável da glucose.

A sacarificação e fermentação híbridas do *whole slurry* obtido a partir do pré-tratamento da drêche E a uma carga de sólidos de 25 %, em massa, utilizando a *S. cerevisiae* Wyeast 1762, Abbey II belga, conduziu a um fermentado com um teor alcoólico volúmico de 5,4 %, ultrapassando o ponto crítico dos 4 % que torna o processo de produção de bioetanol economicamente viável. Esta estratégia conjugou uma elevada concentração e rendimento em etanol, indicando ser a mais adequada para a produção de etanol a partir de drêche cervejeira.

Numa segunda fase do trabalho, pretendeu-se avaliar a possibilidade de produzir uma bebida destilada a partir do caldo fermentativo obtido. Para tal, foi necessário efetuar o processo em reator. Os ensaios de sacarificação e fermentação híbridas em biorreator conduziram a concentrações e rendimentos de etanol mais baixos comparativamente com os ensaios em Erlenmyer, denotando dificuldades de mistura reacional.

A análise dos compostos voláteis maioritários e minoritários presentes nos fermentados, destilados e aromatizados demonstrou que ocorre uma modificação nos componentes e nas suas quantidades ao longo das diferentes etapas de produção da bebida destilada. Um total de 56 compostos voláteis foram identificados, embora apenas 49 tenham permanecido nos destilados aromatizados.

Os testes sensoriais demonstraram a aceitação dos destilados por parte do painel de provadores, com identificação de atributos favoráveis à qualidade sensorial das amostras. Foram também detetados alguns defeitos sensoriais, porém estes não inviabilizaram a aceitação. Ademais, a qualidade organolética revelou-se aceitável para o consumo.

O presente estudo mostrou assim que a produção de um destilado a partir de drêche é viável, podendo acrescentar valor a este subproduto cervejeiro e expandir o mercado dos destilados. Há, no entanto, necessidade de aprofundar os estudos. Neste sentido, a metodologia desenvolvida é um ponto de partida revelante. Na continuidade deste projeto destacam-se, entre outras, as seguintes possibilidades:

- Estudo de estratégias processuais que possibilitem ultrapassar as dificuldades de mistura reacional associadas à operação com altas cargas de sólidos. Tal poderá ser alcançado através da exploração de novas configurações de reator, que possuam um sistema de agitação mais eficiente ou através do descarte da fração sólida após a etapa de sacarificação e uso exclusivo da fração líquida como meio fermentativo.
- Otimização da etapa de destilação visando obter uma separação mais efetiva dos diversos compostos.
- Avaliação de cargas de enzimas inferiores às empregues neste estudo ($15 \text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}$) e de fontes alternativas de enzimas e/ou cocktails comerciais mais económicos.
- Estabilização e modificação da bebida recém destilada através da inclusão de uma etapa de maturação em barricas de carvalho durante um período mais alargado de tempo.
- *Scale up* do processo de produção da bebida destilada para escala piloto ou industrial.

- Exploração de alternativas para a reutilização do resíduo rico em lenhina obtido após o processo de destilação, visando o aproveitamento integral da drêche e o aumento do seu valor económico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Balcerek, K. Pielech-Przybylska, E. Strąk, P. Patelski, U. Dziekońska, "Comparison of fermentation results and quality of the agricultural distillates obtained by application of commercial amyolytic preparations and cereal malts," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 242, no. 3. pp. 321–335, 2015.
- [2] P. Poel, S. Gosepa, W. Kroes, G. Kruis, W. Berkhout, W. Wit, "The contribution of the spirits industry to the EU economy," A report commissioned by The European Spirits Companies Liaison Group in coordination with The European Spirits Organisation—CEPS and conducted by Ernst & Young Tax Advisors and Regioplan Policy Research, Amsterdam, 2010.
- [3] A. Sampaio, G. Dragone, M. Vilanova, J. Oliveira, J. Teixeira, S. Mussatto, "Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 2, pp. 557–563, 2013.
- [4] V. Bezençon, S. Blili, "Ethical products and consumer involvement: what's new?," *Eur. J. Mark.*, vol. 44, no. 9/10, pp. 1305–1321, 2010.
- [5] W. Tate, L. Ellram, J. Kirchoff, "Corporate social responsibility reports: a thematic analysis related to supply chain management," *J. supply Chain Manag.*, vol. 46, no. 1, pp. 19–44, 2010.
- [6] S. Mussatto, G. Dragone, I. Roberto, "Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications," *J. Cereal Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–14, 2006.
- [7] A. Fărcaș, S. Socaci, E. Mudura, F. Dulf, D. Vodnar, M. Tofană, L. Salanță, "Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients," in M. Kanauchi (Ed.), *Brewing Technology*, InTechOpen, Rijeka, p. 138, 2017.
- [8] S. Maisto, M. Galizio, G. Connors, "Alcohol" in *Drug use and abuse* (7nd ed.), Cengage Learning, Stamford, p. 197, 2014.
- [9] European Commission, "Regulation (EC) No 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) No 1576/89," *Off. J. Eur. Union*, vol. L39, no. 110, pp. 16–54, 2008.
- [10] N. Christoph, C. Bauer-Christoph, "Flavour of spirit drinks: raw materials, fermentation, distillation, and ageing," in R. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*, Springer, Berlin, pp. 219–239, 2007.
- [11] World Health Organization, "Alcohol Consumption," in World Health Organization Department of Mental Health and Substance Abuse (Ed.), *World Health Organization global status report on alcohol*, WHO Press, Geneva, pp. 31-32, 2014.
- [12] D. Watson, "Distilling yeasts," *Dev. Ind. Microbiol.*, vol. 25, pp. 213–220, 1984.
- [13] J. Wakely, "The production of spirits," in *The international spirits industry*, Woodhead Publishing, Cambridge, p. 27, 2001.
- [14] G. Zach, "Alcoholic Beverages," in E. Ziegler, H. Ziegler (Ed.), *Flavourings: production, composition, applications, regulations*, Wiley-VCH, Weinheim, p. 487, 2007.
- [15] D. Burroughs, N. Bezzant, "The new wine companion", Heinemann Professional Publishing, Oxford, p. 244, 1988.
- [16] G. Dragone, S. Mussatto, J. Oliveira, J. Teixeira, "Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation," *Food Chem.*, vol. 112, no. 4, pp. 929–935, 2009.
- [17] F. Zamora, "Biochemistry of Alcoholic Fermentation," in M. Moreno-Arribas, M. Polo (Eds.), *Wine*

- chemistry and biochemistry*, Springer, New York, pp. 3–21, 2008.
- [18] C. Kasavi, I. Finore, L. Lama, B. Nicolaus, S. Oliver, E. Oner, B. Kirdar, "Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass," *Biomass Bioenergy*, vol. 45, pp. 230–238, 2012.
- [19] G. Stewart, A. Hill, I. Russell, "125th Anniversary review: Developments in brewing and distilling yeast strains," *J. Inst. Brew.*, vol. 119, no. 4, pp. 202–220, 2013.
- [20] D. Watson, "The development of specialised yeast strains for use in Scotch malt whisky fermentations," in G. Stewart, I. Russel (Eds.), *Current developments in yeast research*, Pergamon Press, Toronto, pp. 57–62, 1981.
- [21] R. Léauté, "Distillation in alambic," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 41, no. 1, pp. 90–103, 1990.
- [22] A. Limayem, S. Ricke, "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects," *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 38, no. 4, pp. 449–467, 2012.
- [23] J. Faria, E. Loyola, M. López, J. Dufour "Cachaça, Pisco and Tequila," in L. Andrew, J. Piggott (Eds.), *Fermented beverage production* (2nd ed.), Springer, New York, pp. 338–357, 2003.
- [24] F. Jack, "Whisky," in C. Bamforth, R. Ward (Eds.), *Handbook of Food Fermentations*, Oxford University Press, New York, pp. 211–220, 2014.
- [25] B. Harrison, O. Fagnen, F. Jack, J. Brosnan, "The impact of copper in different parts of malt whisky pot stills on new make spirit composition and aroma," *J. Inst. Brew.*, vol. 117, no. 1, pp. 106–112, 2011.
- [26] R. Madrera, D. Gomis, J. Alonso, "Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 19, pp. 5709–5714, 2003.
- [27] U. Lima, C. Teixeira, J. Bertozzi, F. Serafim, A. Alcarde, "Influence of fast and slow distillation on ethyl carbamate content and on coefficient of non-alcohol components in Brazilian sugarcane spirits," *J. Inst. Brew.*, vol. 118, no. 3, pp. 305–308, 2012.
- [28] A. Alcarde, L. Souza, A. Bortoletto, "Formation of volatile and maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels," *J. Inst. Brew.*, vol. 120, no. 4, pp. 529–536, 2014.
- [29] A. Bortoletto, A. Correa, A. Alcarde, "Aging practices influence chemical and sensory quality of cachaça," *Food Res. Int.*, vol. 86, pp. 46–53, 2016.
- [30] A. Bortoletto, A. Alcarde, "Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods," *Food Chem.*, vol. 139, no. 1, pp. 695–701, 2013.
- [31] J. Mosedale, J. Puech, "Wood maturation of distilled beverages," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 9, no. 3, pp. 95–101, 1998.
- [32] M. Ortega-Heras, S. Pérez-Magariño, E. Cano-Mozo, M. González-San José, "Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips," *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 43, no. 10, pp. 1533–1541, 2010.
- [33] K. Nishimura, R. Matsuyama, "Maturation and maturation chemistry," in J. Piggott, R. Sharp, R. Ducan (Eds.), *Science and Technology of whiskies*, Longman Scientific & Technical, New York, pp. 235–263, 1989.
- [34] R. Aylott, W. Mackenzie, "Analytical strategies to confirm the generic authenticity of Scotch whisky," *J. Inst. Brew.*, vol. 116, no. 3, pp. 215–229, 2010.
- [35] S. Choi, "Sensory Evaluation," in S. Edelstein (Ed.), *Food Science: An Ecological Approach*, Jones and Bartlett Publisher, Burlington, pp. 84–102, 2013.
- [36] I. Tonutti, P. Liddle, "Aromatic plants in alcoholic beverages. A review," *Flavour Fragr. J.*, vol. 25, no. 5, pp. 341–350, 2010.
- [37] European Commission, "Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and the

- Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Regulation (EC) No 1601/91 of the Council, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC.,” *Off. J. Eur. Union*, vol. L354, pp. 34–50, 2008.
- [38] R. Madrera, B. Valles, “Determination of volatile compounds in cider spirits by gas chromatography with direct injection,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 45, no. 7, pp. 428–434, 2007.
- [39] B. Plutowska, W. Wardencki, “Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review,” *Food Chem.*, vol. 107, no. 1, pp. 449–463, 2008.
- [40] L. Nykänen, I. Nykänen, “Distilled Beverages,” in H. Maarse (Ed.), *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 547–580, 1991.
- [41] J. Pino, M. Fajardo, “Volatile composition and key flavour compounds of spirits from unifloral honeys,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 5, pp. 994–1000, 2011.
- [42] E. Falqué, E. Fernández, D. Dubourdiou, “Differentiation of white wines by their aromatic index,” *Talanta*, vol. 54, no. 2, pp. 271–281, 2001.
- [43] S. Cortés, R. Rodríguez, J. Salgado, J. Domínguez, “Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds,” *Food Control*, vol. 22, no. 5, pp. 673–680, 2011.
- [44] A. Apostolopoulou, A. Flourous, P. Demertzis, K. Akrida-Demertzi, “Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates,” *Food Control*, vol. 16, no. 2, pp. 157–164, 2005.
- [45] S. Diéguez, M. Peña, E. Gómez, “Concentration of volatiles in marc distillates from Galicia according to storage conditions of the grape pomace,” *Chromatographia*, vol. 53, no. 1, pp. 406–411, 2001.
- [46] A. de-la-Fuente-Blanco, M. Sáenz-Navajas, V. Ferreira, “On the effects of higher alcohols on red wine aroma,” *Food Chem.*, vol. 210, pp. 107–114, 2016.
- [47] S. Karagiannis, P. Lanaridis, “Insoluble grape material present in must affects the overall fermentation aroma of dry white wines made from three grape cultivars cultivated in Greece,” *J. Food Sci.*, vol. 67, no. 1, pp. 369–374, 2002.
- [48] S. García-Martín, C. Herrero, R. Peña, J. Barciela, “Solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) determination of volatile compounds in orujo spirits: multivariate chemometric characterisation,” *Food Chem.*, vol. 118, no. 2, pp. 456–461, 2010.
- [49] M. Lambrechts, I. Pretorius, “Yeast and its importance to wine aroma - A review,” *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, vol. 21, pp. 97–129, 2000.
- [50] M. Geroyiannaki, M. Komaitis, D. Stavrakas, M. Polysiou, P. Athanasopoulos, M. Spanos, “Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.),” *Food Control*, vol. 18, no. 8, pp. 988–995, 2007.
- [51] I. Mato, S. Suárez-Luque, J. Huidobro, “A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines,” *Food Res. Int.*, vol. 38, no. 10, pp. 1175–1188, 2005.
- [52] E. Soufleros, I. Pissa, D. Petridis, M. Lygerakis, K. Mermelas, G. Boukouvalas, E. Tsimitakis, “Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition,” *Food Chem.*, vol. 75, no. 4, pp. 487–500, 2001.
- [53] M. Silva, F. Malcata, “Effects of time of grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grape marcs,” *Zeitschrift für Leb. Und-forsch. A*, vol. 208, no. 2, pp. 134–143, 1999.
- [54] H. Lawless, H. Heymann, “Introduction and Overview–Measurement,” in *Sensory evaluation of*

- food: principles and practices*, (2nd ed.), Springer, New York, pp. 3–4, 2010.
- [55] S. Wunderlich, W. Back, “Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria,” in V. Preedy (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*, Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 1–16, 2009.
- [56] S. Mussatto, “Biotechnological potential of brewing industry by-products,” in P. Nigam, A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*, Springer, Dordrecht, pp. 313–326, 2009.
- [57] P. Johnson, J. Paliwal, S. Cenkowski, “Issues with utilisation of brewers’ spent grain,” *Stewart Postharvest Rev.*, vol. 6, no. 4, pp. 1–8, 2010.
- [58] M. Gupta, N. Abu-Ghannam, E. Gallagher, “Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, no. 3, pp. 318–328, 2010.
- [59] P. Townsley, “Preparation of commercial products from brewer’s waste grain and trub,” *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, vol. 16, pp. 130–134, 1979.
- [60] S. Mussatto, “Brewer’s spent grain: a valuable feedstock for industrial applications,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 7, pp. 1264–1275, 2014.
- [61] O. Kanauchi, K. Mitsuyama, Y. Araki, “Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer’s spent grain for the treatment of ulcerative colitis,” *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 59, no. 2, pp. 59–62, 2001.
- [62] M. Santos, J. Jiménez, B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, M. Nozal, “Variability of brewer’s spent grain within a brewery,” *Food Chem.*, vol. 80, no. 1, pp. 17–21, 2003.
- [63] F. Carvalheiro, M. Esteves, J. Parajó, H. Pereira, F. Gírio, “Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery’s spent grain,” *Bioresour. Technol.*, vol. 91, no. 1, pp. 93–100, 2004.
- [64] J. Silva, S. Sousa, J. Rodrigues, H. Antunes, J. Porter, I. Gonçalves, S. Ferreira-Dias, “Adsorption of acid orange 7 dye in aqueous solutions by spent brewery grains,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 40, no. 3, pp. 309–315, 2004.
- [65] S. Mussatto, I. Roberto, “Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer’s spent grain,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 3, pp. 268–274, 2006.
- [66] C. Xiros, E. Topakas, P. Katapodis, P. Christakopoulos, “Hydrolysis and fermentation of brewer’s spent grain by *Neurospora crassa*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 13, pp. 5427–5435, 2008.
- [67] A. Jay, M. Parker, R. Faulks, F. Husband, P. Wilde, A. Smith, C. Faulds, K. Waldron, “A systematic micro-dissection of brewers’ spent grain,” *J. Cereal Sci.*, vol. 47, no. 2, pp. 357–364, 2008.
- [68] N. Meneses, S. Martins, J. Teixeira, S. Mussatto, “Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer’s spent grains,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 108, pp. 152–158, 2013.
- [69] B. Bartolome, C. B. Faulds, and G. Williamson, “Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain,” *J. Cereal Sci.*, vol. 25, no. 3, pp. 285–288, 1997.
- [70] B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés, A. Sancho, N. Díez, P. Ferreira, J. Soliveri, J. Copa-Patiño, “Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer’s spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, no. 1, pp. 140–144, 2003.
- [71] S. Mussatto, G. Dragone, I. Roberto, “Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer’s spent grain,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 25, no. 2, pp. 231–237, 2007.
- [72] C. Faulds, S. Collins, J. Robertson, J. Treimo, V. Eijsink, S. Hinz, H. Schols, J. Buchert, K. Waldron, “Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers’ spent grain,” *J. Cereal Sci.*, vol. 50, no. 3, pp. 332–336, 2009.
- [73] A. Laca, Z. Mousia, M. Díaz, C. Webb, S. Pandiella, “Distribution of microbial contamination within cereal grains,” *J. Food Eng.*, vol. 72, no. 4, pp. 332–338, 2006.

- [74] N. Huige, "Brewery by-products and effluents," in W. Hardwick (Ed.), *Handbook of Brewing*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 501–550, 1994.
- [75] C. Xiros, P. Christakopoulos, "Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications," *Waste Biomass Valorization*, vol. 3, no. 2, pp. 213–232, 2012.
- [76] Y. Sun, J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review," *Bioresour. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 1–11, 2002.
- [77] N. Meneses, A. Sampaio, M. Vilanova, J. Teixeira, I. Mussatto, "Elaboration of distilled beverage from brewer's spent grains," in *XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, June 23–28, Cacun, p.61, 2013.
- [78] D. Perez, A. Guillemain, A. Berthelot, F. Morogues, C. Gomes, "Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels," *Cell Chem Technol*, vol. 44, pp. 1–14, 2010.
- [79] D. Maurya, A. Singla, S. Negi, "An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol," *3 Biotech*, vol. 5, no. 5, pp. 597–609, 2015.
- [80] E. Sjostrom, "Wood polysaccharides," in *Wood chemistry: fundamentals and applications*, (2nd ed.), Academic Press, San Diego, pp. 54–66, 2013.
- [81] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition," *Bioresour. Technol.*, vol. 74, no. 1, pp. 25–33, 2000.
- [82] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch, "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass," *Bioresour. Technol.*, vol. 96, no. 6, pp. 673–686, 2005.
- [83] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M. Negro, "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 4851–4861, 2010.
- [84] C. Wyman, B. Dale, R. Elander, M. Holtzapple, M. Ladisch, Y. Lee, "Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies," *Bioresour. Technol.*, vol. 96, no. 18, pp. 1959–1966, 2005.
- [85] G. Garrote, H. Domínguez, J. Parajó, "Hydrothermal processing of lignocellulosic materials," *Holz. Als. Roh. Werkst.*, vol. 57, no. 3, pp. 191–202, 1999.
- [86] H. Ruiz, R. Rodríguez-Jasso, B. Fernandes, A. Vicente, J. Teixeira, "Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 21, pp. 35–51, 2013
- [87] T. Sakaki, M. Shibata, T. Sumi, S. Yasuda, "Saccharification of cellulose using a hot-compressed water-flow reactor," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 41, no. 4, pp. 661–665, 2002.
- [88] G. Garrote, H. Domínguez, J. Parajó, "Kinetic modelling of corncob autohydrolysis," *Process Biochem.*, vol. 36, no. 6, pp. 571–578, 2001.
- [89] M. Laser, D. Schulman, S. Allen, J. Lichwa, M. Antal, L. Lynd, "A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol," *Bioresour. Technol.*, vol. 81, no. 1, pp. 33–44, 2002.
- [90] J. Pérez, I. Ballesteros, M. Ballesteros, F. Sáez, M. J. Negro, P. Manzanares, "Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production," *Fuel*, vol. 87, no. 17, pp. 3640–3647, 2008.
- [91] T. Rogalinski, T. Ingram, G. Brunner, "Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 47, no. 1, pp. 54–63, 2008.
- [92] B. Dinita, S. Malla, L. Sreerama, "Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments," *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 6, no. 8, pp. 172–182, 2011.
- [93] K. Olofsson, M. Bertilsson, G. Lidén, "A short review on SSF – an interesting process option for

- ethanol production from lignocellulosic feedstocks," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 1, no. 1, pp. 1–7, 2008.
- [94] G. Maitan-Alfenas, E. Visser, V. Guimarães, "Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products," *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 1, pp. 44–49, 2015.
- [95] A. Modenbach, S. Nokes, "Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review," *Biomass and Bioenergy*, vol. 56, pp. 526–544, 2013.
- [96] S. Wilkinson, K. Smart, S. James, D. Cook, "Maximising high solid loading enzymatic saccharification yield from acid-catalysed hydrothermally-pretreated brewers spent grain," *Biofuel Res. J.*, vol. 3, no. 2, pp. 417–429, 2016.
- [97] J. Choudhary, S. Singh, L. Nain, "Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 82–92, 2016.
- [98] H. Ruiz, D. Silva, D. Ruzene, L. Lima, A. Vicente, J. Teixeira, "Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain–Effect of process conditions," *Fuel*, vol. 95, pp. 528–536, 2012.
- [99] L. Paulova, P. Patakova, B. Branska, M. Rychtera, K. Melzoch, "Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1091–1107, 2015.
- [100] C. Cardona, Ó. Sánchez, "Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities," *Bioresour. Technol.*, vol. 98, no. 12, pp. 2415–2457, 2007.
- [101] G. Zacchi, A. Axelsson, "Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 34, no. 2, pp. 223–233, 1989.
- [102] Z. Fan, C. South, K. Lyford, J. Munsie, P. van Walsum, L. Lynd, "Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 26, no. 2, pp. 93–101, 2003.
- [103] A. Wingren, M. Galbe, G. Zacchi, "Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks," *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, no. 4, pp. 1109–1117, 2003.
- [104] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, "Determination of ash in biomass," NREL chemical analysis and testing laboratory analytical procedures, NREL/TP-510-42622, 2008.
- [105] C. Labconco, "A guide to kjeldahl nitrogen determination methods and apparatus," *Labconco Corp. Houston*, Houston, pp. 3–10, 1998.
- [106] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, "Determination of extractives in biomass," NREL chemical analysis and testing laboratory analytical procedures, NREL/TP-510-42619, 2008.
- [107] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, "Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass," NREL chemical analysis and testing laboratory analytical procedures, NREL/TP-510-42618, 2008.
- [108] T. Ghose, "Measurement of cellulase activities," *Pure Appl. Chem.*, vol. 59, no. 2, pp. 257–268, 1987.
- [109] F. Pereira, D. Gomes, P. Guimaraes, J. Teixeira, L. Domingues, "Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2," *Biotechnol. Lett.*, vol. 34, no. 1, pp. 45–53, 2012.
- [110] F. Pereira, A. Romani, H. Ruiz, J. Teixeira, L. Domingues, "Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass," *Bioresour. Technol.*, vol. 161, pp. 192–199, 2014.

- [111] W. Russ, H. Mörtel, R. Meyer-Pittroff, "Application of spent grains to increase porosity in bricks," *Constr. Build. Mater.*, vol. 19, pp. 117–126, 2005.
- [112] D. Waters, F. Jacob, J. Titze, E. Arendt, E. Zannini, "Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 235, no. 5, pp. 767–778, 2012.
- [113] R. Kuhad, A. Singh, "Lignocellulose biotechnology: current and future prospects," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 13, no. 2, pp. 151–172, 1993.
- [114] R. Viëtor, A. Voragen, S. Angelino, "Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grain from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley," *J. Inst. Brew.*, vol. 99, no. 3, pp. 243–248, 1993.
- [115] B. Gómez, B. Míguez, A. Veiga, J. Parajó, J. Alonso, "Production, purification, and in vitro evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylooligosaccharides from brewer's spent grain," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 38, pp. 8429–8438, 2015.
- [116] F. Kong, C. Engler, E. Soltés, "Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 34, no. 1, pp. 23–35, 1992.
- [117] L. Jönsson, C. Martín, "Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects," *Bioresour. Technol.*, vol. 199, pp. 103–112, 2016.
- [118] M. Kelbert, A. Romani, E. Coelho, F. Pereira, J. Teixeira, L. Domingues, "Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements," *Ind. Crops Prod.*, vol. 64, pp. 16–24, 2015.
- [119] S. Wilkinson, K. Smart, D. Cook, "Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of brewers spent grains for bioethanol production," *Ind. Crops Prod.*, vol. 62, pp. 219–227, 2014.
- [120] F. Carvalheiro, T. Fernandes, L. Duarte, S. Lopes, P. Moura, H. Pereira, F. Gírio, "Hydrothermal processing of hardwoods and agro-industrial residues: evaluation of xylo-oligosaccharides production," in *Nordic Wood Biorefinery Conference (NWBC)*, 2–4 September, Helsinki, pp. 96–102, 2009.
- [121] P. Plaza, L. Gallego-Morales, M. Peñuela-Vásquez, S. Lucas, M. García-Cubero, M. Coca, "Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*," *Bioresour. Technol.*, vol. 244, pp. 166–174, 2017.
- [122] G. Sanchez, L. Pilcher, C. Roslander, T. Modig, M. Galbe, G. Liden, "Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava," *Bioresour. Technol.*, vol. 93, no. 3, pp. 249–256, 2004.
- [123] H. Jørgensen, J. Kristensen, C. Felby, "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 1, no. 2, pp. 119–134, 2007.
- [124] J. Ko, Y. Kim, E. Ximenes, M. Ladisch, "Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, no. 2, pp. 252–262, 2015.
- [125] B. Donohoe, S. Decker, M. Tucker, M. Himmel, T. Vinzant, "Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 101, no. 5, pp. 913–925, 2008.
- [126] A. Modenbach, S. Nokes, "The use of high-solids loadings in biomass pretreatment – a review," vol. 109, no. 6, pp. 1430–1442, 2012.
- [127] R. Yáñez, A. Romani, G. Garrote, J. Alonso, J. Parajó, "Processing of *Acacia dealbata* in aqueous media: first step of a wood biorefinery," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 48, no. 14, pp. 6618–6626, 2009.
- [128] G. Garrote, J. Cruz, H. Domínguez, J. Parajó, "Non-isothermal autohydrolysis of barley husks:

- product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions," *J. Food Eng.*, vol. 84, no. 4, pp. 544–552, 2008.
- [129] D. Montané, J. Salvadó, X. Farriol, P. Jollez, E. Chornet, "Phenomenological kinetics of wood delignification: application of a time-dependent rate constant and a generalized severity parameter to pulping and correlation of pulp properties," *Wood Sci. Technol.*, vol. 28, no. 6, pp. 387–402, 1994.
- [130] M. Aoyama, K. Seki, N. Saito, "Solubilization of bamboo grass xylan by steaming treatment," *Holzforschung*, vol. 49, no. 3, pp. 193–196, 1995.
- [131] J. Luterbacher, J. Tester, L. Walker, "High-solids biphasic CO₂-H₂O pretreatment of lignocellulosic biomass," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 107, no. 3, pp. 451–460, 2010.
- [132] C. Tengborg, M. Galbe, G. Zacchi, "Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, no. 9, pp. 835–844, 2001.
- [133] J. Cunha, T. Aguiar, A. Romani, C. Oliveira, L. Domingues, "Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors," *Bioresour. Technol.*, vol. 191, pp. 7–16, 2015.
- [134] F. Cunha-Pereira, L. Hickert, N. Sehnem, P. Souza-Cruz, C. Rosa, M. Ayub, "Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 5, pp. 4218–4225, 2011.
- [135] Z. Liu, P. Slininger, B. Dien, M. Berhow, C. Kurtzman, S. Gorsich, "Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 8, pp. 345–352, 2004.
- [136] M. Ask, M. Bettiga, V. Mapelli, L. Olsson, "The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, no. 1, p. 22, 2013.
- [137] A. Romani, F. Pereira, B. Johansson, L. Domingues, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation," *Bioresour. Technol.*, vol. 179, pp. 150–158, 2015.
- [138] S. Wilkinson, K. Smart, D. Cook, "Optimisation of alkaline reagent based chemical pre-treatment of brewers spent grains for bioethanol production," *Ind. Crops Prod.*, vol. 62, pp. 219–227, 2014.
- [139] G. Beldman, J. Hennekam, A. Voragen, "Enzymatic hydrolysis of beer brewers' spent grain and the influence of pretreatments," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 30, no. 5, pp. 668–671, 1987.
- [140] H. Maarse, F. Berg, "Flavour of distilled beverages" in J. Piggott, A. Paterson, N. Kossiakoff (Eds.), *Understanding natural flavors*, Springer, Devon, p. 244, 1994.
- [141] E. Valero, L. Moyano, M. Millan, M. Medina, J. Ortega, "Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must," *Food Chem.*, vol. 78, no. 1, pp. 57–61, 2002.
- [142] T. Cabaroglu, M. Yilmaztekin, "Methanol and major volatile compounds of Turkish Raki and effect of distillate source," *J. Inst. Brew.*, vol. 117, no. 1, pp. 98–105, 2011.
- [143] J. Swiegers, I. Pretorius, "Yeast Modulation of Wine Flavor," *Adv. Appl. Microbiol.* vol. 57, pp. 131–175, 2005.
- [144] M. Balcerek, K. Pielech-Przybylska, E. Strąk, P. Patelski, U. Dziekońska, "Comparison of fermentation results and quality of the agricultural distillates obtained by application of commercial amyolytic preparations and cereal malts," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 242, no. 3, pp. 321–335, 2016.
- [145] I. Rodríguez, P. Serna, "Los whiskies escoceses. Estudio analítico de sus componentes volátiles por cromatografía de gases," *Alimentaria*, vol. 316, pp. 139–146, 2000.

- [146] R. López, N. Ortín, J. Pérez-Trujillo, J. Cacho, V. Ferreira, "Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 11, pp. 3419–3425, 2003.
- [147] M. Fundira, M. Blom, I. Pretorius, P. van Rensburg, "Selection of yeast starter culture strains for the production of marula fruit wines and distillates," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 6, pp. 1535–1542, 2002.
- [148] J. Jeffery, K. Berglund, "Extraction of wood constituents from non-conventional, small whiskey barrels," *J Food Process. Beverages*, vol. 4, no. 1, p. 7, 2016.
- [149] A. Escudero, B. Gogorza, M. Melus, N. Ortín, J. Cacho, V. Ferreira, "Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 3516–3524, 2004.
- [150] P. Salo, "Determining the odor thresholds for some compounds in alcoholic beverages," *J. Food Sci.*, vol. 35, no. 1, pp. 95–99, 1970.
- [151] M. Meilgaard, "Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles," *Tech. Quart., Master Brew. Ass. Am.*, vol. 12, pp. 151–168, 1975.
- [152] L. Mingorance-Cazorla, J. Clemente-Jiménez, S. Martínez-Rodríguez, F. Heras-Vázquez, F. Rodríguez-Vico, "Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 19, no. 3, pp. 297–304, 2003.
- [153] T. Siebert, H. Smyth, D. Capone, C. Neuwöhner, K. Pardon, G. Skouroumounis, M. Herderich, M. Sefton, A. Pollnitz, "Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 381, no. 4, pp. 937–947, 2005.
- [154] F. González, J. Zapata, C. Corona, "Microbial diversity and flavour quality of fermented beverages," in A. Grumezescu, A. Holban (Eds.), *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, Academic Press, Cambridge, pp. 135–145, 2017.
- [155] Y Y. Zhao, T. Tian, J. Li, B. Zhang, Y. Yu, Y. Wang, H. Niu, "Variations in main flavor compounds of freshly distilled brandy during the second distillation," *Int. J. food Eng.*, vol. 10, no. 4, pp. 809–820, 2014.
- [156] M. Kyrleou, E. Tzanakouli, Y. Kotseridis, K. Chira, I. Ligas, S. Kallithraka, P. Teissedre, "Addition of wood chips in red wine during and after alcoholic fermentation: differences in color parameters, phenolic content and volatile composition," *OENO One*, vol. 50, no. 4, pp. 209–222, 2016.
- [157] W. Wardencki, P. Sowiński, J. Curyło, "Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages," *J. Chromatogr. A*, vol. 984, no. 1, pp. 89–96, 2003.
- [158] S. Liu, G. Pilone, "An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications," *Int. J. food Sci. Technol.*, vol. 35, no. 1, pp. 49–61, 2000.
- [159] R. Perestrelo, A. Fernandes, F. Albuquerque, J. Marques, J. Câmara, "Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds," *Anal. Chim. Acta*, vol. 563, no. 1, pp. 154–164, 2006.
- [160] V. Ferreira, P. Hernandez-Orte, A. Escudero, R. Lopez, J. Cacho, "Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages," *J. Chromatogr. A*, vol. 864, no. 1, pp. 77–88, 1999.
- [161] M. Patrianakou, I. Roussis, "Decrease of wine volatile aroma esters by oxidation," *South African J. Enol. Vitic.*, vol. 34, no. 2, pp. 241–245, 2013.
- [162] C. Cerny, "The role of sulfur chemistry in thermal generation of aroma," in J. Parker, S. Elmore L. Methven (Eds.), *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*, Woodhead Publishing, Amsterdam, p. 196, 2015.

- [163] E. García-Carpintero, E. Sánchez-Palomo, M. Gallego, M. González-Viñas, "Volatile and sensory characterization of red wines from cv. Moravia Agria minority grape variety cultivated in La Mancha region over five consecutive vintages," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 5, pp. 1549–1560, 2011.
- [164] E. Souffleros, A. Bertrand, "Study on Tsipouro, traditional spirit made from grape pomace, precursor of ouzo," *Connaiss. Vigne Vin*, vol. 21, no. 2, pp. 93–111, 1987.
- [165] S. Liu, "Flavors and food fermentation," in Y. Hui, E. Evranuz (Eds.), *Handbook of Plant-based fermented food and beverage technology*, (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 28–30, 2012.
- [166] G. Borges, F. Gomes, F. Badotti, A. Silva, A. Machado, "Selected *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and accurate separation of distillate fractions reduce the ethyl carbamate levels in alembic cachaças," *Food Control*, vol. 37, pp. 380–384, 2014.
- [167] M. Gomez-Miguez, J. Cacho, V. Ferreira, I. Vicario, F. Heredia, "Volatile components of Zalema white wines," *Food Chem.*, vol. 100, no. 4, pp. 1464–1473, 2007.
- [168] V. Ferreira, R. Lopez, J. Cacho, "Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 80, no. 11, pp. 1659–1667, 2000.
- [169] H. Guth, "Identification of character impact odorants of different white wine varieties," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 3022–3026, 1997.
- [170] M. Vilanova, Z. Genisheva, A. Masa, J. Oliveira, "Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines," *Microchem. J.*, vol. 95, no. 2, pp. 240–246, 2010.
- [171] P. Etievant, "Wine," in H. Maarse (Ed.), *Volatile Compounds in foods and beverages*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 483–546, 1991.
- [172] H. Guth, "Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 3027–3032, 1997.
- [173] J. Pino, O. Queris, "Analysis of volatile compounds of mango wine," *Food Chem.*, vol. 125, no. 4, pp. 1141–1146, 2011.
- [174] L. Paravisini, A. Prot, C. Gouttefangeas, C. Moreton, H. Nigay, C. Dacremont, E. Guichard, "Characterisation of the volatile fraction of aromatic caramel using heart-cutting multidimensional gas chromatography," *Food Chem.*, vol. 167, pp. 281–289, 2015.
- [175] M. Czerny, M. Christlbauer, M. Christlbauer, A. Fischer, M. Granvogl, M. Hammer, C. Hartl, N. Hernandez, P. Schieberle, "Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 228, no. 2, pp. 265–273, 2008.
- [176] J. Boidron, P. Chatonnet, M. Pons, "Effects of wood on aroma compounds of wine," *Connaiss. Vigne Vin*, vol. 22, no. 4, pp. 275–294, 1988.
- [177] S. Boutou, P. Chatonnet, "Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine," *J. Chromatogr. A*, vol. 1141, no. 1, pp. 1–9, 2007.
- [178] I. Francis, J. Newton, "Determining wine aroma from compositional data," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 114–126, 2005.
- [179] V. Singleton, "Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 46, no. 1, pp. 98–115, 1995.
- [180] F. Sterckx, J. Missiaen, D. Saison, F. Delvaux, "Contribution of monophenols to beer flavour based on flavour thresholds, interactions and recombination experiments," *Food Chem.*, vol. 126, no. 4, pp. 1679–1685, 2011.
- [181] J. Moreno, L. Zea, L. Moyano, M. Medina, "Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing," *Food Control*, vol. 16, no. 4, pp. 333–338, 2005.
- [182] A. Saliba, J. Bullock, W. Hardie, "Consumer rejection threshold for 1, 8-cineole (eucalyptol) in Australian red wine," *Food Qual. Prefer.*, vol. 20, no. 7, pp. 500–504, 2009.

- [183] S. Nakamura, E. Crowell, C. Ough, A. Totsuka, "Quantitative analysis of γ -nonalactone in wines and its threshold determination," *J. Food Sci.*, vol. 53, no. 4, pp. 1243–1244, 1988.
- [184] R. Lopez, V. Ferreira, P. Hernandez, J. Cacho, "Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 79, no. 11, pp. 1461–1467, 1999.
- [185] L. Lipan, M. Hojjati, H. El-Zaeddi, L. Sánchez-Rodríguez, Á. Carbonell-Barrachina, "Volatile composition of smoked and non-smoked iranian rice," *Foods*, vol. 5, no. 4, p. 81, 2016.
- [186] I. Salmerón, R. Rozada, K. Thomas, E. Ortega-Rivas, S. Pandiella, "Sensory characteristics and volatile composition of a cereal beverage fermented with *Bifidobacterium breve* NCIMB 702257," *Rev. Agaroquímica y Tecnol. Aliment.*, vol. 20, no. 3, pp. 205–213, 2014.
- [187] R. Buttery, J. Turnbaugh, L. Ling, "Contribution of volatiles to rice aroma," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 36, no. 5, pp. 1006–1009, 1988.
- [188] R. Buffo, C. Cardelli-Freire, "Coffee flavour: an overview," *Flavour Fragr. J.*, vol. 19, no. 2, pp. 99–104, 2004.
- [189] M. Brebu, C. Vasile, "Thermal degradation of lignin – a review," *Cellul. Chem. Technol.*, vol. 44, no. 9, p. 353, 2010.
- [190] J. Swiegers, E. Bartowsky, P. Henschke, I. Pretorius, "Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour," *Aust. J. grape wine Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 139–173, 2005.
- [191] J. Baert, J. Clippeleer, P. Hughes, L. Cooman, G. Aerts, "On the origin of free and bound staling aldehydes in beer," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 46, pp. 11449–11472, 2012.
- [192] A. Calleja, E. Falqué, "Volatile composition of Mencía wines," *Food Chem.*, vol. 90, no. 3, pp. 357–363, 2005.
- [193] J. Yu, S. Huang, J. Dong, W. Fan, S. Huang, J. Liu, Z. Chang, Y. Tian, J. Hao, S. Hu, "The influence of LOX-less barley malt on the flavour stability of wort and beer," *J. Inst. Brew.*, vol. 120, no. 2, pp. 93–98, 2014.
- [194] A. Yu, A. Zhang, "The effect of pH on the formation of aroma compounds produced by heating a model system containing L-ascorbic acid with L-threonine/L-serine," *Food Chem.*, vol. 119, no. 1, pp. 214–219, 2010.
- [195] K. Lee, A. Paterson, J. Piggott, G. Richardson, "Origins of flavour in whiskies and a revised flavour wheel: a review," *J. Inst. Brew.*, vol. 107, no. 5, pp. 287–313, 2001.
- [196] P. Nikolov, V. Yaylayan, "Thermal decomposition of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (HMF) and its further transformations in the presence of glycine," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 18, pp. 10104–10113, 2011.
- [197] H. Hwang, T. Hartman, R. Rosen, J. Lech, C. Ho, "Formation of pyrazines from the maillard reaction of glucose and lysine- α -amine¹⁵N," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 42, no. 4, pp. 1000–1004, 1994.
- [198] S. Fors, "Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds. A literature review," in G. Walker, M. Feather (Eds.), *Maillard Reactions in Foods and Nutrition*, American Chemical Society, Wasington, pp. 212–228, 1983.
- [199] A. Ishii, N. Roudnitzky, N. Beno, M. Bensafi, T. Hummel, C. Rouby, T. Thomas-Danguin, "Synergy and masking in odor mixtures: an electrophysiological study of orthonasal vs. retronasal perception," *Chem. Senses*, vol. 33, no. 6, pp. 553–561, 2008.
- [200] P. Dalton, N. Doolittle, H. Nagata, P. Breslin, "The merging of the senses: integration of subthreshold taste and smell," *Nat. Neurosci.*, vol. 3, no. 5, p. 431, 2000.
- [201] D. Risky, "Effects of context and sensory adaptation in judgments of taste intensity and pleasantness," in H. Starre (Ed.), *Olfaction and taste VII*, IRL Press Limited, London, pp. 385–388, 1980.

- [202] F. Jack, "Whiskies: composition, sensory properties and sensory analysis," in J. Piggot (Ed.), *Alcoholic beverages: sensory evaluation and consumer research*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2012.
- [203] R. Ferrer-Gallego, J. Hernández-Hierro, J. Rivas-Gonzalo, M. Escribano-Bailón, "Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas," *Food Res. Int.*, vol. 62, pp. 1100–1107, 2014.
- [204] M. Aznar, R. López, J. Cacho, V. Ferreira, "Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 9, pp. 2700–2707, 2003.
- [205] E. Oliveira, H. Cardello, E. Jeronimo, E. Souza, G. Serra, "The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 21, no. 5, pp. 707–715, 2005.

ANEXO I – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO SÓLIDA E LÍQUIDA OBTIDA APÓS AUTOHIDRÓLISE

Nesta secção encontram-se os cálculos relativos à percentagem de polímero (glucano, xilano, arabinano e lenhina) que permanece no sólido pré-tratado e que é extraída para o licor. A título de exemplo será apenas apresentado o cálculo relativo ao glucano.

O rendimento de glucano, expresso como a percentagem que permanece no resíduo sólido relativamente à respetiva percentagem na matéria-prima, após hidrólise ácida foi calculada de acordo com a Equação I.

$$Gn_R = \frac{Gn \times Y_s}{Gn_{MP}} \quad \text{Equação I}$$

Onde:

- Gn_R = percentagem de glucano que permanece no sólido após o pré-tratamento, relativamente ao glucano da matéria-prima, em massa;
- Gn_{MP} = percentagem de glucano na matéria-prima, em massa;
- Y_s = rendimento mássico em sólidos.

A percentagem de cada um dos glucano solubilizada a oligossacáridos (GOS) e glucose monomérica foi determinada de acordo com a Equação II, utilizando o respetivo fator estequiométrico de conversão de glucano em glucose (162/180).

$$Gluc_R = \frac{162}{180} \times \frac{Gluc \times P_H}{Gn_{MP} \times M \times 0,01 \times \rho_H} \quad \text{Equação II}$$

Onde:

- $Gluc_R$ = percentagem de glucose recuperada no hidrolisado, em massa;
- $Gluc$ = concentração de glucose no hidrolisado;
- M = massa de amostra (drêche e água) utilizada no ensaio;
- ρ_H = massa volúmica do hidrolisado.

ANEXO II – FICHA DE PROVA SENSORIAL

Ficha de prova sensorial

Nome: _____

Idade: ____

Instruções: irá receber dois destilados individualmente. Prove cuidadosamente e avalie, assinalando com um X na posição que identifique melhor a característica avaliada, de acordo com a escala apresentada. Caso detete outro atributo que não consta na lista, por favor descreva-o.

0 – Nulo; 1 – Muito fraco; 2 – Fraco; 3 – Médio; 4 – Forte; 5 – Muito forte

Aparência	0	1	2	3	4	5
Cor ^(a)						
Turvação						
Brilho						
Qualidade visual global						

^(a) 1- Amarelo claro; 2-Amarelo Dourado; 3- Amarelo torrado; 4-Castanho

5- Catanho avermelhado

Aroma/odor	0	1	2	3	4	5
Álcool/Solvente						
Adocicado						
Frutado						
Madeira						
Especiarias						
Baunilha						
Caramelo						
Queimado/Torrado						
Frutos secos						

Aroma/odor	0	1	2	3	4	5
Fumo/cinzas						
Café						
Cola/Verniz						
Chocolate						
Mel						
Ranço						
Herbáceo						
Qualidade aromática global						

Sabor	0	1	2	3	4	5
Doce						
Amargo						
Tostado						
Alcoólico						
Ácido						
Complexidade						
Untuosidade (gorduroso)						
Corpo						
Intensidade						
Persistência						
Qualidade gustativa global						

Sensação nasal/gustativa	0	1	2	3	4	5
Irritante						
Pungente						
Ardência						
Adstringência						
Macia						
Qualidade global						

	0	1	2	3	4	5
Apreciação global do destilado						

Outros atributos detetados: _____

Comentários:
