



**Inês Ribeiro de  
Almeida**

**Identificação, quantificação e valorização dos  
subprodutos produzidos pela atividade cervejeira**



**Inês Ribeiro de  
Almeida**

**Identificação, quantificação e valorização  
dos subprodutos produzidos pela atividade  
cervejeira**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo de Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob a supervisão profissional do Engenheiro Nicolas Billard, Mestre Cervejeiro da empresa Essência D'Alma, Lda.



**o júri**

**presidente**

Professor Doutor João Filipe Colardelle da Luz  
Mano  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**arguente**

Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões  
Carriço  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**orientador**

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho  
Investigadora do Departamento de Química da Universidade de  
Aveiro

## palavras-chave

Indústria Cervejeira; Resíduos; Subprodutos; Dreche; Lúpulo; Leveduras.

## Resumo

Atualmente existe uma elevada procura de cervejas diferentes das habituais surgindo um novo mercado pautado de cervejas artesanais produzidas por microcervejeiras. A empresa Essência D'Alma, Lda., insere-se neste mercado, sendo detentora de uma das principais marcas de cerveja artesanal, a Cerveja Vadia. A recente consciencialização de um desenvolvimento sustentável e a incorporação da política de economia circular, levou a um interesse científico, ambiental e económico na redução e reutilização de resíduos aliados à valorização dos subprodutos. A empresa produz 3 importantes subprodutos: dreche, leveduras excedentárias e lúpulo residual/ *Hot trub*. A dreche é rica em fibras e proteínas, as leveduras excedentárias apresentam na sua composição  $\beta$ -glucanas e manoproteínas e na composição do lúpulo residual/ *Hot trub* destacam-se os óleos essenciais, sendo de interesse a sua valorização. Numa primeira fase quantificou-se os subprodutos ao longo de várias produções, sendo estimados os valores produzidos por hL de cerveja produzida: 28 kg de dreche, 6,4 L de lúpulo residual/ *Hot trub* e 1,7 L de leveduras excedentárias. A valorização dos subprodutos passa por um tratamento de estabilização de forma a reduzir a atividade de água. Dentro das alternativas sustentáveis, foram testados três métodos de secagem: secagem ao ar no exterior, secagem ao ar no interior e secagem em corrente de ar forçada com e sem adição de sulfuroso. O tipo de secagem com melhores resultados foi a secagem em corrente de ar forçada, com os seguintes valores de humidade: 11,2% para a dreche, 12,6% para o lúpulo residual/hot trub e 15,0% para as leveduras, sendo que não houve deterioração dos subprodutos durante o processo de secagem. A estabilização dos subprodutos permitirá a sua valorização para vários mercados, para extração de compostos de valor acrescentado ou para venda direta a empresas para incorporação como ingrediente em formulações para alimentação animal.



**Keywords**

Brewing Industry; Waste; By-products; Brewer's spent grain; Spent Hops; Brewer spent yeast.

**Abstract**

Currently, there is a high demand for different types of beers that are different from the usual ones, resulting in a new market of craft beers from microbreweries. The company Essência D'Alma, Lda. is part of this market, being the owner of one of the main brands of craft beers, the Vadia beer. The recent awareness of sustainable development and the incorporation of circular economy policy has led to a scientific, environmental and economic interest in the reduction and reuse of waste combined with the valuation of by-products. The company Essência D'Alma, Lda. produces 3 important by-products: brewer's spent grain, spent hops / hot trub and brewer spent yeasts. Brewer's spent grain is rich in fibers and proteins, brewer's spent yeasts has in their composition  $\beta$ -glucans and mannoproteins, and spent hops / Hot trub include essential oils in their composition, being of interest their valorization. The first stage for the by-products valuation was its quantification over several production, being calculated per hL of beer produced: 28 kg of brewer's spent grain, 6.4 L spent hops / Hot trub and 1.7 L of brewer's spent yeasts. The valorization of the by-products undergoes a stabilization treatment in order to reduce water activity. Within the sustainable alternatives, three methods of drying were tested: air drying on an open space outside of the industrial plant, air drying inside of the industrial plant, forced air drying with and without sulfurous addition. The type of drying with better results was forced air drying with the following results of moisture content: 11.2% for brewer's spent grain, 12.6% for spent hops/hot trub and 15% for brewer's spent yeast, which avoided the deterioration of by-products during the drying process. The stabilization of the by-products will allow their valuation to several markets, for extraction of added value compounds or for direct sale to companies for incorporation as an ingredient in feed formulations.

## Índice

<b>Índice de Figuras</b>	1
<b>Índice de Tabelas</b>	2
<b>Índice de Equações</b>	2
<b>I Revisão Bibliográfica</b>	
I.1 Contextualização da Dissertação	3
I.2 Matérias Primas da Cerveja	4
I.2.1 Água	4
I.2.2 Cevada Maltada	4
I.2.3 Lúpulo	6
I.2.4 Leveduras	7
I.3 Processo de Produção de Cerveja	8
I.3.1 Maltagem e Moagem	8
I.3.2 Brassagem e Filtração	9
I.3.3 Ebulição e Decantação	10
I.3.4 Fermentação e Maturação	12
I.3.5 Filtração, Carbonatação, Envasilhamento e Pasteurização	14
I.4 Desafios Ambientais da Produção de Cerveja	15
I.4.1 Dreche	17
I.4.1.1 Caracterização Química	17
I.4.1.2 Potencialidades Biotecnológicas	17
I.4.2 Lúpulo Residual/ <i>Hot Trub</i>	19
I.4.2.1 Caracterização Química	19
I.4.2.2 Potencialidades Biotecnológicas	19
I.4.3 Leveduras Excedentárias	20
I.4.3.1 Caracterização Química	20
I.4.3.2 Potencialidades Biotecnológicas	21
I.5 Secagem e Estabilização de Subprodutos	22

## II Desenvolvimento do Estágio Curricular na Empresa

II.1 Objetivo do Estágio Curricular	24
II.2 Apresentação da Empresa	24
II.3 Atividades desenvolvidas na Empresa	25
II.4 Metodologias	27
II.4.1 Amostras	27
II.4.2 Quantificação de Subprodutos	28
II.4.3 Secagem dos Subprodutos	28
II.4.4 Determinação da Perda de Massa e do Teor de Humidade	29
II.5 Resultados e Discussão	30
II.5.1 Gestão de Resíduos	30
II.5.2 Quantificação de Subprodutos	34
II.5.3 Secagem ao Ar no Exterior	35
II.5.4 Secagem ao Ar no Interior	38
II.5.5 Secagem em Corrente de Ar Forçada	40
<b>III Conclusão</b>	42
<b>IV Referências Bibliográficas</b>	43
<b>V Anexos</b>	
Anexo 1	48
Anexo 2	51
Anexo 3	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura química dos principais polissacarídeos da cevada. (a) Estrutura química da celulose; (b) Estrutura química da $\beta$ -glucanas; (c) Estrutura química da arabinoxilana (adaptado) .....	5
<b>Figura 2:</b> Estrutura dos $\alpha$ -ácidos (humulona, cohumulona e ad-humulona) e $\beta$ -ácidos (lupulona, co-lupulona e ad-lupulona) predominantes no lúpulo .....	6
<b>Figura 3:</b> Diferentes variedades de Cevada Maltada .....	9
<b>Figura 4:</b> Esquema elucidativo dos patamares da brassagem .....	10
<b>Figura 5:</b> Isomerização de $\alpha$ -ácidos, em que R= $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ em humulona e iso-humulona; R= $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ em cohumulona e iso-cohumulona; R= $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ em ad-humulona e iso-ad-humulona .....	11
<b>Figura 6:</b> Via metabólica fermentativa realizada pelas leveduras .....	12
<b>Figura 7:</b> Representação do processo de produção e cerveja com as respectivas matérias-primas e salientando as etapas que originam subprodutos .....	16
<b>Figura 8:</b> Curva isotérmica de sorção de alimentos com teor de humidade superior a 50%.....	22
<b>Figura 9:</b> Velocidade relativa das reações enzimáticas e não enzimáticas e do crescimento microbiano em função da atividade de água ( $a_w$ ).....	23
<b>Figura 10:</b> Quantificação dos subprodutos ao longo do mês de Outubro, onde A corresponde à densidade (g/L) da dreche, A corresponde ao volume (L) da dreche, B corresponde ao volume (L) do lúpulo residual/ hot trub, C corresponde ao volume (L) das leveduras excedentárias da purga realizada a 50% da fermentação e D corresponde ao volume (L) da purga realizada no final da fermentação.....	34
<b>Figura 11:</b> Monitorização da variação de massa dos subprodutos ao longo de três dias, nos dois testes, expostos ao ar no exterior, em que A corresponde à variação de massa por parte da dreche e B corresponde à variação de massa por parte do lúpulo residual/ hot trub.....	37

<b>Figura 12:</b> Teor de humidade das amostras recolhidas durante os três dias de secagem ao ar no exterior, relativas aos dois testes em que A corresponde à dreche, B corresponde ao Lúpulo Residual / Hot Trub.....	38
<b>Figura 13:</b> Monitorização da variação de massa do subproduto, leveduras excedentárias, ao longo de três dias, nos dois testes, expostos ao ar no interior.....	39
<b>Figura 14:</b> Teor de humidade das amostras recolhidas durante os três dias de secagem ao ar no interior, relativas aos dois testes de leveduras excedentárias.....	40
<b>Figura 15:</b> Teor de humidade das amostras no tempo 0 e ao fim de 7 dias dos subprodutos sujeitos ao ar com adição de sulfuroso.....	41

### Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Etapas do processamento de cerveja com os resíduos resultantes de cada etapa acompanhados com o respetivo código LER.....	31
<b>Tabela 2:</b> Resíduos e Subprodutos da empresa Essência D'Alma com o respetivo destino final, dividido em categorias para uma melhor organização.....	33

### Índice de Equações

<b>Equação 1:</b>	$\% \text{ de sólidos} = \frac{\text{massa seca da amostra}}{\text{massa húmida da amostra}} \times 100$	.....30
<b>Equação 2:</b>	$\text{Teor de Humidade} = 100\% - \% \text{ de sólidos}$	.....30

## I. Revisão Bibliográfica

### I.1 Contextualização da dissertação

A relação do Homem com a cerveja remonta ao tempo das antigas civilizações, as primeiras referências deste produto datam, sensivelmente, 8000 anos <sup>1</sup>, este representa provavelmente o processo biotecnológico mais antigo da humanidade. Apesar da sua história, a cerveja continua a ser uma das bebidas mais consumidas no mundo <sup>2</sup>, sendo que em Portugal, em 2017, consumiu-se 51 hL de cerveja per capita <sup>3</sup>. Este aumento do consumo de cerveja <sup>4</sup> está associado a um crescimento exponencial de cervejarias artesanais e/ou microcervejeiras. A excessiva procura de cervejas diferentes do habitual leva as microcervejeiras apresentarem uma enorme flexibilidade de produção, face às cervejeiras, pois produzem várias gamas de cerveja em instalações com poucos recursos. Consequentemente, há aumento na quantidade de resíduos e subprodutos produzidos e a necessidade de os tratar. Neste âmbito, destaca-se a empresa Essência D’Alma, Lda., onde se insere o presente estágio curricular, detentora da marca “Cerveja Vadia”.

Atualmente, com o esgotamento de recursos naturais, as alterações climáticas, as crises financeiras cíclicas e a desigualdade social, surge um novo conceito e modelo de desenvolvimento económico, o modelo de Economia Circular. Este alia conceitos como o ambiente, economia e sociedade, em contraste com o modelo económico atual de crescimento contínuo e de aumento da taxa de utilização de recursos naturais. A Economia Circular, na conjuntura da União Europeia, é vista como uma ferramenta para projetar *bottom-up* ambiental e melhorar as políticas de gestão de resíduos, privilegiando a redução e/ou a reutilização dos mesmos, originando vantagens ambientais, económicas e sociais <sup>5</sup>.

Apesar do sector cervejeiro ser visto como um setor tradicional, é uma indústria dinâmica e aberta a novos desenvolvimentos científicos e tecnológicos. Em virtude deste aspeto aliado à elevada procura de cervejas artesanais, surge a oportunidade de tratar os seus resíduos e subprodutos. A empresa Essência D’Alma, Lda. ambiciona ter um negócio inovador e contemporâneo, desejando assim estabelecer o modelo de economia circular. O corrente tema de dissertação “Identificação, quantificação e valorização dos subprodutos produzidos pela atividade cervejeira” torna-se assim bastante pertinente.

## I.2 Matérias-Primas

A cerveja, segundo a legislação portuguesa, define-se como bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Sacharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável <sup>6</sup>. Assim, os principais ingredientes são: água, cevada maltada, lúpulo e leveduras <sup>7</sup>, no entanto, é um produto bastante versátil, apresentando diversas variantes, como por exemplo cervejas do tipo *Ale* ou *Lager* (diferem pelo tipo de fermentação e floculação de leveduras).

A cerveja apresenta uma variada composição nutricional, particularmente em proteínas e carboidratos, contém minerais como cálcio, magnésio, potássio, fósforo e sódio e com vitaminas do complexo B <sup>8</sup>, esta composição está relacionada com os seus ingredientes.

### I.2.1 Água

A água potável é o principal componente da cerveja e a sua composição influencia bastante o produto, é necessária uma composição em sais minerais adequada ao tipo de cerveja. Destacando-se alguns iões como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Os três primeiros estão intrinsecamente relacionados com a dureza e o pH (os iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  diminuem o pH enquanto que o ião  $\text{HCO}_3^-$  aumenta-o), sendo também importantes no processo de produção, pois a concentração do ião  $\text{HCO}_3^-$  tem uma grande influência no pH do mosto <sup>7</sup>, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  está relacionado com a estabilização enzimática aquando o momento de brassagem e com o crescimento e a atividade metabólica das leveduras aliado com o ião  $\text{Mg}^{2+}$  <sup>9</sup>. O ião  $\text{SO}_4^{2-}$  está relacionado com sabores mais duros e secos, privilegiando o sabor do lúpulo, os iões  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  em excesso provocam sabores e cores desagradáveis através de reações de oxidação <sup>7</sup>. É de salientar que diferentes passos da produção da cerveja ocorrem de forma mais ou menos favorável dependendo do pH <sup>7</sup>.

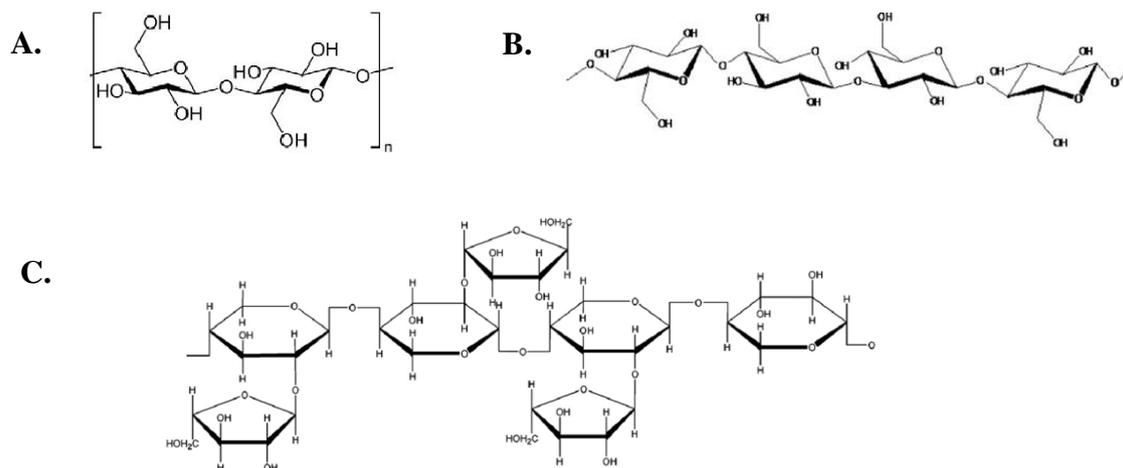
### I.2.2 Cevada Maltada

A cevada, *Hordeum vulgare* L., pertence à grande família dos cereais, Poaceae <sup>10</sup>. É o cereal mais utilizado, sendo necessário passar por um processo de maltagem (descrito no capítulo seguinte) para posterior utilização. Apesar deste destaque em prol da cevada, outros

cereais, como o trigo, centeio, arroz e mais recentemente, o sorgo, podem ser utilizados no processo de produção como adjuntos <sup>7</sup>, no entanto estes não sofrem maltagem, por conseguinte não possuem enzimas ativas, apresentando níveis elevados de amido que, por sua vez, aumenta a quantidade de açúcares disponíveis para a fermentação.

Os grãos de cevada são interessantes devido às enzimas hidrolíticas e ao amido presente, que mais tarde, no processamento de cerveja, é convertido em açúcares fermentáveis. Outra característica interessante é a nível estrutural, pois a casca permanece no grão depois da moagem e conseqüentemente, facilita a etapa de filtração. O amido, um polissacarídeo de reserva, é armazenado em amiloplastos no endosperma <sup>9</sup>, é composto por amilose (20–25%) e amilopectina (75–80%) unidas por ligações glicosídicas ( $\alpha$  1 $\rightarrow$ ,4) <sup>7</sup>.

A cevada é composta por arabinoxilanas e  $\beta$ -glucanas, celulose e açúcares simples como por exemplo sacarose <sup>11</sup>. O grão de cevada apresenta outros compostos, nomeadamente proteínas como albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas que afetam as características coloidais e a espuma <sup>12</sup>, lípidos, principalmente ácidos gordos, que afetam a estabilidade e sabor, no entanto grande parte dos lípidos são perdidos durante a produção, vitaminas, na sua maioria do complexo B e polifenóis, que se relacionam com a clarificação da cerveja e minerais <sup>7</sup>.



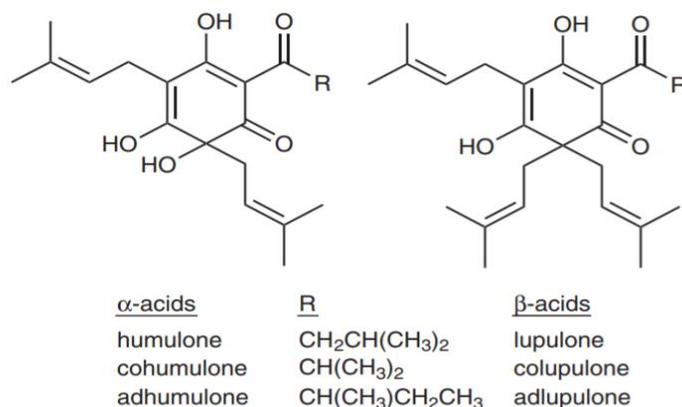
**Figura 1:** Estrutura química dos principais polissacarídeos da cevada. (a) Estrutura primária da celulose; (b) Estrutura primária das  $\beta$ -glucanas; (c) Estrutura primária das arabinoxilanas <sup>13</sup> (adaptado).

### I.2.3 Lúpulo

O lúpulo, *Humulus lupulus* L.<sup>14</sup>, é conhecido como a “especiaria” da cerveja e em tempos era adicionado com o intuito de conservar o produto. Este ingrediente é adicionado numa quantidade significativamente mais baixa no volume da cerveja em comparação com a cevada e água, no entanto influencia crucialmente a qualidade da mesma, nomeadamente no aroma, amargor e espuma<sup>15</sup>. As características antibacterianas desta planta aromática, contribuem para a proteção da cerveja face a contaminações microbiológicas<sup>16</sup>.

Em termos botânicos, o interesse da indústria debruça-se nas inflorescências das plantas femininas desta espécie, que formam os cones de lúpulo. Estes cones apresentam na sua morfologia, glândulas de lupulina que secretam essencialmente resina e óleos essenciais<sup>17</sup>. A resina compreende dois importantes componentes, os  $\alpha$  e  $\beta$ -ácidos, estes estão associados ao amargor, sendo que, neste parâmetro, os  $\alpha$ -ácidos contribuem substancialmente mais do que os  $\beta$ -ácidos, pois estes exibem pouca solubilidade no mosto e na cerveja. Em relação aos óleos essenciais, estes contribuem para o aroma a lúpulo na cerveja<sup>7</sup>.

Atualmente, o lúpulo é utilizado em forma de pellet ou em extratos, existindo uma variedade de lúpulos com características diferentes classificadas de acordo com o aroma ou o amargor, por exemplo, lúpulo que privilegie o aroma, mostra um menor teor de  $\alpha$ -ácidos e maior teor de óleos essenciais<sup>12</sup>.



**Figura 2:** Estrutura dos  $\alpha$ -ácidos (humulona, cohumulona e ad-humulona) e  $\beta$ -ácidos (lupulona, colupulona e ad-lupulona) predominantes no lúpulo<sup>18</sup>.

#### I.2.4 Leveduras

Estes microrganismos desempenham um papel fundamental no processo de produção de cerveja, incorporando-se na etapa de fermentação, estes utilizam açúcares como a glucose para produzir etanol e CO<sub>2</sub> e outros metabolitos secundários, estando fortemente associados ao sabor do produto.

Normalmente, as leveduras associadas à produção de cerveja pertencem ao género *Saccharomyces*, destacando-se a *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pastorianus* (hibrido do cruzamento espontâneo da *S. cerevisiae* e *S. bayanus*), sendo que a primeira está relacionada com as cervejas de tipo *ale* (alta fermentação) e a segunda está relacionada com as cervejas de tipo *lager* (baixa fermentação) <sup>12</sup>. Apesar de estas duas estirpes serem bastante similares apresentam algumas diferenças, como na hidrofobicidade, elasticidade e propriedades fermentativas <sup>19</sup>.

Atualmente existem inúmeras estirpes deste género com características únicas de modo a otimizar a fermentação e propriedades do produto, porém todas apresentam o mesmo comportamento. Inicialmente, estas passam por uma fase *lag*, onde há um aumento do volume celular e ativação do metabolismo, seguido de uma fase exponencial, ou *log*, em que as leveduras desenvolvem-se e crescem rapidamente, num terceiro momento ocorre uma fase de estagnação, onde a taxa de crescimento celular é igual à taxa de morte celular, por último, a fase de declínio onde a taxa de morte celular é mais elevada do que a taxa de crescimento<sup>20</sup>.

A escolha da levedura ideal para a fermentação tem que ter em conta alguns critérios, nomeadamente o seu comportamento, por exemplo estirpes características de fermentações altas (altas temperaturas) suportam temperaturas mais elevadas que outras estirpes do mesmo género, o seu desempenho, por exemplo a taxa de fermentação, capacidade de floculação e a produção/degradação de produtos secundários do metabolismo <sup>7</sup>.

O desempenho excelente de uma levedura está relacionado com as condições do meio e o mosto é o meio ideal de cultura para as leveduras. O mosto contém os principais elementos para o crescimento das mesmas, como açúcares, nomeadamente glucose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose, aminoácidos, que é essencial para propagação de leveduras e para a fermentação, minerais, que estão aliados à ativação enzimática e por fim, oxigénio, que é necessário à síntese de esteróis e ácidos gordos <sup>7</sup>.

As leveduras também contribuem, ainda que pouco, para o sabor da cerveja, mas é de salientar que diversos compostos ativos de sabor são produzidos ao longo de todo o processo, no entanto uma grande parte dessas substâncias são produzidas durante a fase de fermentação. Essas substâncias são por norma intermediários metabólicos ou subprodutos da fermentação, sendo que os principais são: álcoois superiores, ésteres, diacetilo e compostos de enxofre, como DMS (dimetilsulfureto). Os primeiros são considerados compostos voláteis desejáveis pois conferem à cerveja sabor agradável, enquanto que o diacetilo e os compostos de enxofre são prejudiciais do ponto de vista organolético <sup>21</sup>.

### **I.3 Processo de Produção de Cerveja**

O processo de produção de cerveja compreende cinco etapas: maltagem e moagem, brassagem e filtração, ebulição e decantação, fermentação e maturação e por fim, filtração/carbonatação/pasteurização/envasilhamento. Estas podem sofrer alterações consoante as condições da cervejeira ou o tipo de cerveja produzido.

#### **I.3.1 Maltagem e Moagem**

Este processo consiste na maceração do cereal e normalmente não é realizado nas cervejeiras. A cevada é submersa num leito de água a temperaturas entre 10 a 15°C, seguido por uma germinação durante 3 a 5 dias numa atmosfera onde o ar é constantemente renovado e a temperatura aumenta gradualmente até ao ponto de ativação enzimática, nomeadamente das amílases e protéases e posterior dessecação de modo a reduzir o teor de humidade sem danificar as enzimas presentes. O binómio tempo e temperatura são regulados conforme as variedades de malte, influenciando assim a torra e conseqüentemente o sabor <sup>22</sup>. Por exemplo, grãos maltados mais torrados estão associados a aromas de café, chocolate ou fumo, e neste caso são utilizados para as cervejas que privilegiem estes sabores.

Dependendo do tipo de cerveja, há variações no processo de produção, no entanto este passo está sempre presente, pois a cevada maltada contém todas as enzimas necessárias ao processo como  $\alpha$ -amilases,  $\beta$ -amilases, protéases e  $\beta$ -glucanases (ausente na cevada em bruto, mas é sintetizada durante a germinação) e, quase sempre, é a principal fonte de amido<sup>23</sup>.



**Figura 3:** Diferentes variedades de Cevada Maltada <sup>24</sup>.

O malte, por norma, é recebido como matéria-prima na unidade de produção e é encaminhado para a moagem. A moagem consiste em moer o grão de cereal maltado num tamanho ideal, facilitando assim a dispersão das partículas na água e a mobilidade das enzimas, visto que grãos com tamanho consideravelmente grande originam poucos açúcares e grãos de tamanho pequeno dificultam a filtração <sup>23</sup>. Em grandes cervejarias é frequente o uso de um moinho de seis rolos para realizar esta etapa, no entanto há vários tipos de moinhos como por exemplo moinho de pedra.

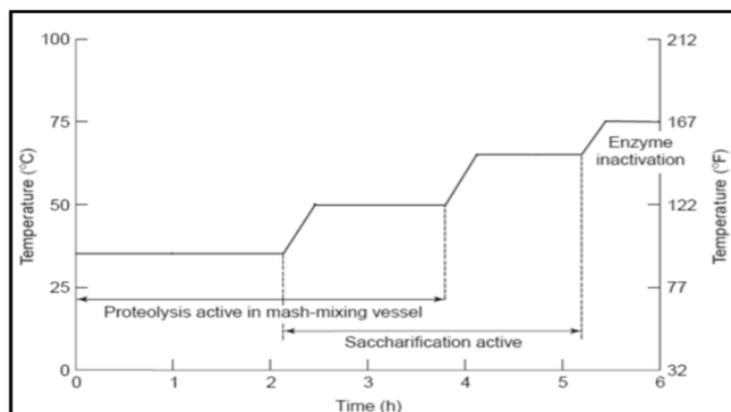
### **I.3.2 Brassagem e Filtração**

A brassagem é um processo de maceração, em que água é adicionada ao malte (no caso da utilização de adjuntos, estes também são adicionados neste momento), sendo aquecidos a temperaturas entre 50°C e 78°C, por patamares para possibilitar a atividade ótima das enzimas, permitindo que as enzimas do malte (amilases e proteases) degradem o amido, resultando no mosto. O mosto é um líquido composto por vários açúcares fermentáveis, peptídeos e aminoácidos <sup>25</sup> que depois irá ser fermentado, originando a cerveja.

Num ponto de vista mais específico, quando a panela de brassagem atinge cerca de 50°C ocorre degradação da parede celular pelas glucanases, xilanase e arabinosidases. Simultaneamente ocorre também a degradação de proteínas pelas proteases nomeadamente endopeptídates, aminopeptidases, carboxipeptidases, dipeptidases. No patamar seguinte de temperatura (sensivelmente 60°C) ocorre a quebras de ligação  $\alpha$ -1,6 do amido mediado por amiloglucosidases, dando origem a dextrinas. De seguida, a temperatura aumenta até cerca

de 65°C e há uma hidrólise parcial do amido em maltose, maltotriose, glucose e dextrinas limite pela ação  $\beta$ -amilase. Posteriormente há um aumento de temperatura até 70-75°C para que  $\alpha$ -amilase atue em maior escala, dando origem a dextrinas. A atividade da  $\beta$ -amilase depende da  $\alpha$ -amilase, pois a sua ação produz potenciais substratos à  $\beta$ -amilase<sup>26, 9</sup>.

No último patamar, 78°C há uma inativação enzimática e uma estabilização dos açúcares fermentáveis. No entanto é possível modificar o binómio tempo e temperatura dependendo do tipo de cerveja, por exemplo não realizar determinadas etapas da brassagem<sup>26</sup>.



**Figura 4:** Esquema elucidativo dos patamares da brassagem<sup>27</sup>.

O mosto, resultante da brassagem, ainda se encontra em contacto com os resíduos sólidos (grãos de cereais) e outros componentes insolúveis como lípidos e algumas proteínas, sendo necessário proceder a uma filtração para separar o mosto da fração sólida anteriormente mencionada, resultando num importante subproduto denominado de dreche (abordado no capítulo seguinte)<sup>23,28</sup>.

A filtração desdobra-se em dois momentos, o primeiro corresponde à retenção da dreche num crivo, enquanto que o segundo corresponde a uma fase de lavagem da dreche na tentativa de extrair o máximo de açúcares possíveis<sup>28</sup>.

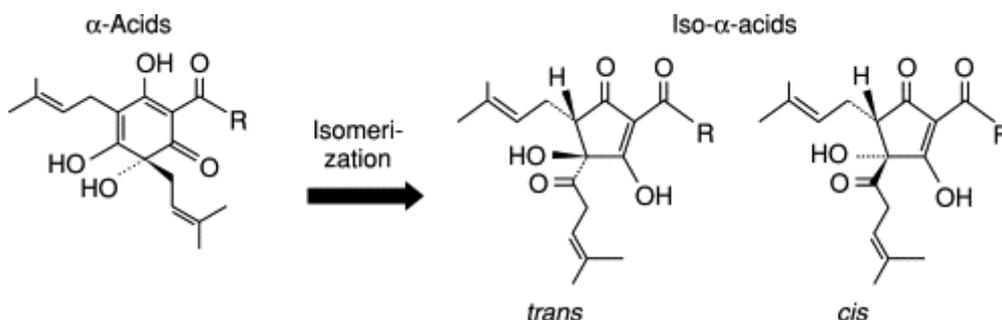
### I.3.3 Ebulição e Decantação

A ebulição tem como principal objetivo a esterilização do mosto (sem a fração sólida suspensa) e a transformação das substâncias que conferem o amargor à cerveja proveniente

do lúpulo. Nesta etapa, a flora microbiana, algumas enzimas, proteínas e compostos voláteis que causam aromas indesejáveis são eliminadas, os componentes do lúpulo são dissolvidos e o mosto torna-se mais concentrado <sup>28</sup>.

O mosto filtrado é reencaminhado novamente para a panela de brassagem onde se realiza uma ebulição e é adicionado o lúpulo, onde os  $\alpha$ -ácidos sofrem uma isomerização resultando em iso- $\alpha$ -ácidos. Os  $\beta$ -ácidos, como referi anteriormente, apresentam pouca solubilidade e a sua maioria acaba por ser eliminada, assim como os óleos essenciais e outros compostos voláteis indesejados. No entanto, pequenas frações de  $\beta$ -ácidos e óleos essenciais permanecem no mosto, influenciando o aroma do produto final <sup>17</sup>.

O momento de adição do lúpulo é crucial para as qualidades organolépticas do produto, nomeadamente o amargor, de modo a não volatilizar as substâncias aromáticas presentes. A adição de lúpulo pode ser feita no início e/ou fim e/ou durante da ebulição, por exemplo adição de todo o lúpulo no início da ebulição resulta em cervejas mais amargas <sup>12</sup>, pois os há uma maior conversão de  $\alpha$ -ácidos em iso- $\alpha$ -ácidos que confere em amargor.



**Figura 5:** Isomerização de  $\alpha$ -ácidos, em que R=  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  em humulona e iso-humulona; R=  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  em cohumulona e iso-cohumulona; R=  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$  em ad-humulona e iso-ad-humulona <sup>29</sup>.

De seguida realiza-se a decantação, que permite a separação do mosto dos resíduos do lúpulo e de outros componentes não solubilizados, como por exemplo proteínas. O resíduo líquido é denominado de *hot trub* enquanto a parte sólida corresponde a restos de lúpulo. Após esta separação, o mosto segue para a fermentação, enquanto que o *hot trub* e os lúpulos remanescentes são considerados um subproduto (abordado no capítulo seguinte).

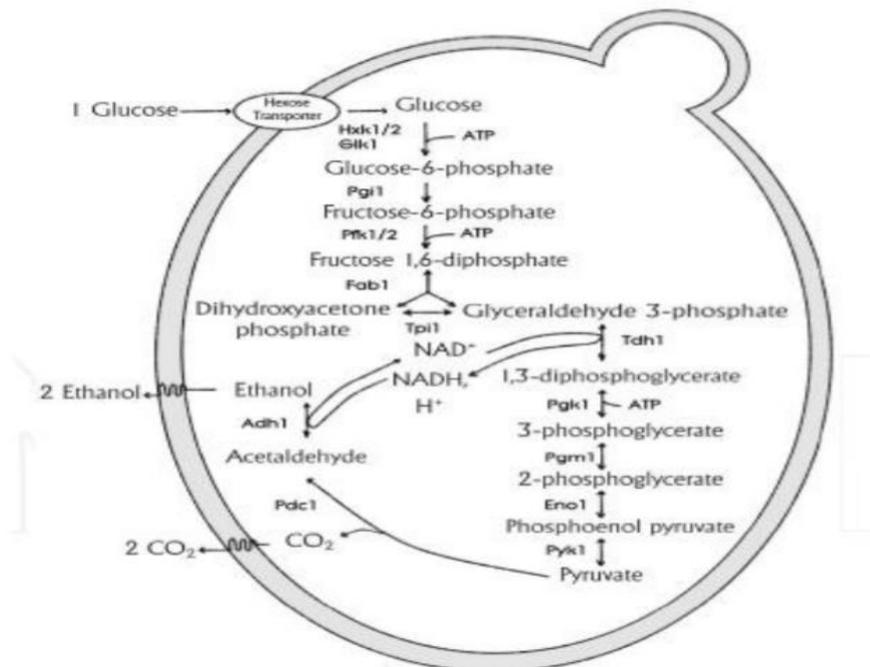
A separação destes componentes é feita, por norma, a partir do whirlpool, um equipamento desenhado especificamente para esta atividade que recorre ao princípio físico

do “paradoxo das folhas de chá” (fenómeno do qual partículas leves, como folhas de chá, se reúnem no centro de um recipiente agitado de líquido e se depositam no fundo em uma pequena pilha após a agitação) <sup>30</sup>.

É de salientar que antes da etapa seguinte (fermentação), o mosto “limpo” que sai do whirlpool passa por um permutador de placas de modo a diminuir a temperatura até ficar próxima da temperatura ótima para o desenvolvimento da levedura, podendo variar de acordo com a estirpe utilizada <sup>28</sup>.

### I.3.4 Fermentação e Maturação

De um modo geral a fermentação alcoólica compreende a transformação dos açúcares presentes no mosto em etanol e CO<sub>2</sub> mediado pelas leveduras, sendo um processo com várias reações e metabolitos intermédios. Na figura 6 é possível observar o processo completo, ou seja, as reações que ocorrem desde a glicólise (formação de piruvato a partir da glucose) até à formação de etanol.



**Figura 6:** Via metabólica fermentativa realizada pelas leveduras <sup>24</sup>.

Numa primeira etapa, como se tratasse de uma fase de adaptação, o mosto é arejado com oxigénio de forma a reunir as condições necessárias ao desenvolvimento da levedura. Esta consome os açúcares por uma ordem específica (glucose, frutose, maltose e por fim maltotriose) e o oxigénio (respiração aeróbia) produzindo energia, essencial à biossíntese de metabolitos e conseqüentemente ao seu crescimento. O mosto é o meio ideal de cultura para as leveduras, pois compreende outros componentes, para além de oxigénio e açúcares, importantes para o desenvolvimento das leveduras, como por exemplo aminoácidos que intervêm na síntese de proteínas e minerais <sup>26</sup>.

As leveduras são seres anaeróbios facultativos. Assim sendo, é necessário que as cubas de fermentação tenham o menos contacto possível com oxigénio de modo a privilegiar a fermentação face à respiração (efeito *Pasteur*). No entanto, a grande maioria das estirpes de leveduras utilizadas pelos cervejeiros são consideradas *Crabtree* positivas, ou seja, quando as concentrações de oxigénio no mosto são baixas, a levedura opta por reprimir a respiração e metabolizar os açúcares pela via fermentativa devido às elevadas concentrações de glucose (efeito *Crabtree*) <sup>31</sup>.

Como as cervejas estão compreendidas em duas grandes famílias: *Ale* e *Lager*, que compreendem dois tipos de fermentação, fermentação alta e baixa, respetivamente. Na fermentação alta, por norma, as temperaturas variam entre 15°C e 20°C e no final, as leveduras ocupam o topo do fermentador, enquanto que na fermentação baixa é caracterizada pelas leveduras flocularem para o fundo do fermentador e as temperaturas variarem entre 6°C e 14°C <sup>12</sup>.

Na fermentação é necessária uma vigilância constante, pois além dos produtos finais desta via metabólica (etanol e dióxido de carbono) há de igual forma a produção de outros produtos intermédios que influenciam bastante as qualidades organolépticas da cerveja. Os ésteres, como por exemplo acetato de etilo e acetato de isobutilo, e álcoois superiores, como propanol e 2-metil-1-butanol, exercem uma influência positiva no produto final, enquanto que o diacetilo e compostos de enxofre, como DMS (dimetilsulfureto) e sulfureto de hidrogénio, não. Apesar da produção durante a fermentação de compostos de aroma que são negativos para a cerveja, durante a etapa de maturação há a remoção de muitos destes compostos.

Finalizada a fermentação, a cerveja passa pelo um período de maturação. Nesta etapa a temperatura apresenta uma diminuição extrema, de modo a consolidar aromas e cores, sedimentar leveduras, eliminar e/ou diminuir compostos voláteis, como por exemplo o diacetilo, como também proteínas, melhorando, conseqüentemente a estabilidade coloidal<sup>32</sup>.

### **I.3.5 Filtração, Carbonatação, Envasilhamento e Pasteurização**

A filtração tem como principal objetivo tornar a cerveja o menos turva possível. A clarificação da cerveja não é exclusiva da filtração, visto que a remoção de compostos proteicos na fase de maturação resulta numa menor turbidez<sup>32</sup>. Existem vários sistemas para executar esta fase, sendo que os mais utilizados são filtros de terra de diatomáceas e filtros de cartuxo.

Depois da filtração surge a carbonatação de forma a ajustar o nível de dióxido de carbono (adequado ao tipo de cerveja). Esta pode ser realizada de forma natural e artificial. Do ponto de vista natural, por norma, as cervejeiras não realizam a filtração, assim as leveduras permaneçam no produto depois do engarrafamento com vista a “refermentar” e adquirir dióxido de carbono. De forma artificial, o dióxido de carbono é injetado para a cuba de fermentação com recurso de bombas ou de outros equipamentos.

O envasilhamento consiste na colocação do produto nos recipientes adequados, habitualmente escuros devido à sensibilidade da cerveja à luz (desenvolve aromas prejudiciais às qualidades organolépticas)<sup>12</sup>. Existe inúmeros métodos e equipamentos para executar este ponto, variando de cervejeira para cervejeira e do tipo da cerveja, por exemplo há cervejas com rolhas de cortiça e há cervejas com caricas. O envasilhamento merece especial atenção pois está sujeito a contaminações microbiológicas e alterações químicas, pois é o momento em que a cerveja abandona a cuba de fermentação e está exposta ao ar, por exemplo, se a cerveja estiver em contacto demasiado tempo com o oxigénio acaba por oxidar<sup>12</sup>.

Por fim surge a pasteurização, onde o principal objetivo eliminar agentes patogénicos e reduzir a atividade enzimática e, por sua vez, aumentar o tempo de vida do produto de forma segura. Este tratamento térmico é opcional, sendo que a sua prática é mais comum nas grandes cervejeiras face às microcervejeiras devido à elevada procura do produto. A

pasteurização consiste no aquecimento a uma determinada temperatura, por um período de tempo adequado, seguido de um arrefecimento a uma temperatura inferior, existindo inúmeras formas e equipamentos para efetuar esta etapa. Esta fase privilegia a segurança alimentar, mas é de salientar que também está interligada com a qualidade alimentar, sendo que a pasteurização em excesso influencia notoriamente o sabor da cerveja, pois podem ocorrer reações de Maillard, oxidações e desenvolvimento de aldeídos<sup>12, 7</sup>.

#### **I.4 Desafios Ambientais da Produção de Cerveja**

Atualmente, o conceito de desenvolvimento sustentável e de economia circular tornam-se cada vez mais pertinentes muito em parte devido à crescente preocupação com o estado dos recursos do planeta visto que tendem, a nível exponencial, a esgotar.

Este sector apresenta alguns constrangimentos ambientais, como por exemplo, é das indústrias que mais usa água, não só no processo propriamente dito, mas também nas etapas de limpeza para uma adequada manutenção da unidade de fabrico<sup>33</sup>. Além da água residual, ao longo do processo resultam resíduos sólidos e subprodutos, estes apresentam potencial biotecnológico que permite uma valorização dos mesmos, modificando assim o destino final para ETAR e aterros.

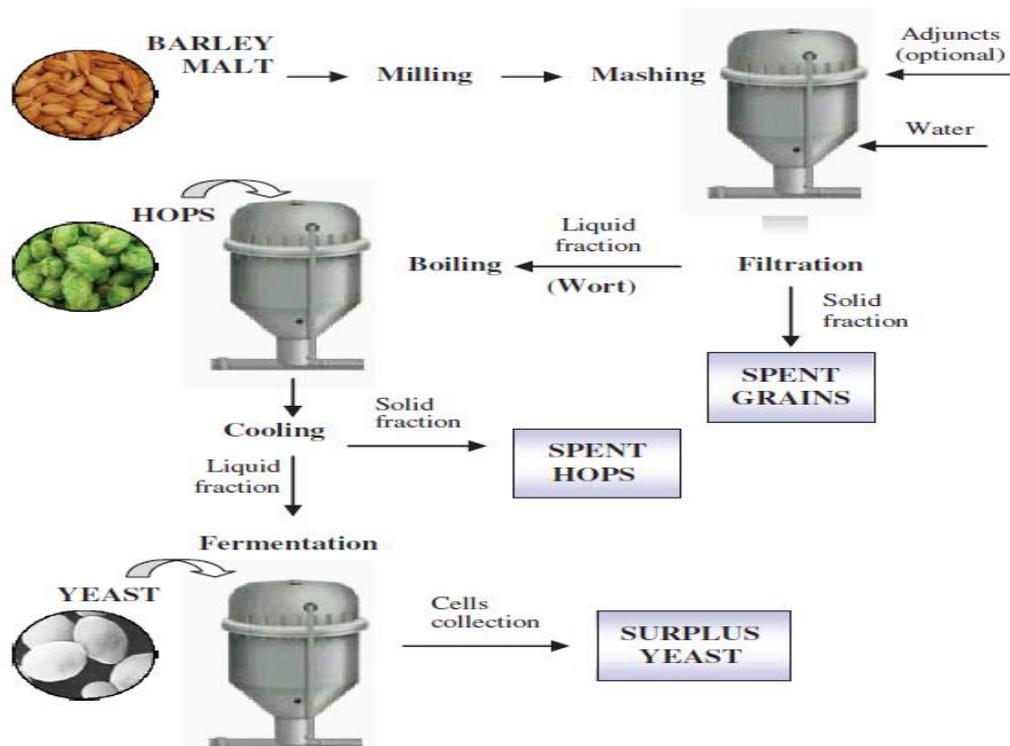
À luz do que foi mencionado previamente, a Comissão Europeia ambiciona que no futuro os resíduos e os subprodutos sejam geridos como recursos, e por isso a reciclagem e reutilização, para além de relevante, torna-se economicamente atraente, gerando assim, uma oportunidade para obtenção de novos produtos, nomeadamente a partir da transformação dos subprodutos em produtos de valor<sup>34</sup>.

É necessário ter presente que resíduos e subprodutos são conceitos diferentes, segundo a legislação portuguesa, são considerados resíduos quaisquer substâncias ou objetos de que o detentor se desfaz ou tem a intenção e/ou obrigação de se desfazer, enquanto que um subproduto é qualquer substância ou objeto resultante de um processo produtivo cujo principal objetivo não seja a sua produção, abrangendo as seguintes condições: 1) Existir a certeza de posterior utilização da substância/objeto; 2) A substância/objeto poder ser utilizado diretamente, sem qualquer outro processamento, que não seja o da prática industrial normal; 3) A produção da substância/objeto ser parte integrante de um processo produtivo;

4) A substância/objeto cumprir os requisitos relevantes como produto em matéria ambiental e de proteção da saúde e não acarretar impactos globalmente adversos do ponto de vista ambiental ou da saúde humana, face à posterior utilização específica <sup>35</sup>.

Os principais resíduos são: água, resíduos da segunda filtração, vapor de água e materiais associados à embalagem como vidro ou rótulos. No entanto, é possível destacar três subprodutos da atividade cervejeira: dreche, lúpulo residual/ *hot trub* e leveduras excedentárias.

A sustentabilidade de uma cervejeira passa por elaborar um plano de ação em que engloba a gestão de resíduos e valorização dos subprodutos. Assim sendo, entende-se por gestão de resíduos, segundo a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), o conjunto das atividades de caráter técnico, administrativo e financeiro necessárias à deposição, recolha, transporte, tratamento, valorização e eliminação dos resíduos, incluindo o planeamento e a fiscalização dessas operações, bem como a monitorização dos locais de destino final, depois de se proceder ao seu encerramento <sup>36,37</sup>. Enquanto que a valorização dos subprodutos passa por, numa primeira estância, pela pesquisa das características químicas e das respetivas aplicações futuras e culmina na transação económica.



**Figura 7:** Representação do processo de produção de cerveja com as respetivas matérias-primas e salientando as etapas que originam subprodutos <sup>38</sup>.

## **I.4.1 Dreche**

### **I.4.1.1 Caracterização Química**

A fração sólida residual no final da filtração do mosto corresponde à dreche. A dreche é o principal subproduto da atividade cervejeira, conhecido também como BSG (do inglês *Brewer's spent grain*)<sup>28</sup>.

A dreche consiste, basicamente, na casca, no pericarpo e no tegumento da semente do grão de cevada maltado, podendo variar de acordo o tipo de malte utilizado, condições de brassagem, entre outros<sup>39</sup>. Estes componentes são ricos em celulose, polissacarídeos não celulósicos e lenhina (macromoléculas polifenólicas associada à celulose nas paredes celulares)<sup>39,40</sup>.

A dreche, é um material lenhocelulósico rico em proteínas e fibras, devido ao facto da maior parte do amido ser removido durante o processamento (no entanto ainda é possível encontrar amido vestigial não hidrolisado<sup>41</sup>), contendo também, numa porção mais pequena, lípidos, matéria inorgânica como minerais e compostos bioativos como vitaminas e polifenóis<sup>39, 41</sup>.

As principais proteínas, cerca de 30% do peso seco, pertencem ao grupo das prolaminas, nomeadamente as hordeínas B, e C, sendo também possível encontrar com alguma abundância gluteninas e em porções remanescentes albuminas<sup>42</sup>. Os tecidos fibrosos são compostos principalmente por arabinoxilanas (25%), lenhina (28%) e celulose (17%)<sup>39,42</sup>.

De acordo com a composição química descrita anteriormente é possível inferir o potencial deste subproduto, sendo que atualmente, é utilizado, quase de forma exclusiva como alimento para animais, sem qualquer tipo de tratamento. O capítulo seguinte aborda as diferentes potencialidades biotecnológicas para este subproduto.

### **I.4.1.2 Potencialidades Biotecnológicas**

A dreche é o principal subproduto deste setor e como referi anteriormente, é utilizada principalmente como ração animal, maioritariamente de ruminantes, devido à sua composição rica em fibras e proteínas<sup>38,41</sup>. Além desta vertente, também é comum utilizar a

dreche como fertilizante <sup>41</sup> e em alguns casos, parte da dreche é reutilizada pelas cervejarias, é adicionada à cuba de fermentação aumentando o desempenho fermentativo da levedura não prejudicando a qualidade da cerveja <sup>38</sup>.

Outro potencial biotecnológico deste subproduto é a sua utilização como substrato para o cultivo de microrganismos e produção enzimática, pois este apresenta um elevado nível de açúcares fermentáveis, atividade de água e proteínas. Por exemplo espécies de fungos e bactérias como *Aspergillus* e *Bacillus* desenvolveram-se com sucesso neste meio. Estas características estão ligadas intimamente com a produção enzimática, ou seja, o cultivo de certos microrganismos que produzem enzimas (por exemplo a produção de xilanase por *Aspergillus awamori*) em meios que usam a dreche como substrato <sup>38</sup>.

Tendo em conta a composição da dreche, podemos descreve-la como um material lenhocelulósico composto por vários polissacarídeos, onde é viável, através de hidrolises (térmica, ácida e enzimática), obter compostos importantes como a glucose proveniente da celulose ou de xilose que pode ser convertida em xilitol proveniente das arabinoxilanas. A glucose, pode posteriormente ser utilizado em processos fermentativos e o xitol como adoçante. A dreche como fonte de compostos de valor acrescentado a um preço baixo é particularmente interessante para a indústria alimentar, obviamente que necessário passar por processos de purificação antes da utilização propriamente dita, como por exemplo a incorporação de polifenóis e flavonóis em hambúrgueres de peixe <sup>38</sup>.

Outras aplicações que visam a reutilização da dreche passam por a sua utilização como adsorvente para a remoção de compostos orgânicos voláteis ou como matéria-prima para polpas de celulose branqueadas que podem ser usadas na produção de certos tipos de papel. Outro esforço para a valorização deste subproduto é a sua incorporação na alimentação humana, a dreche sofre um tratamento do qual resulta uma farinha, sendo que depois a mesma é utilizada para o fabrico de pães e bolos <sup>41</sup>. Esta utilização resulta em alimentos funcionais ricos em fibras e proteínas, devido à composição química da dreche, no entanto a legislação portuguesa ainda não abrange a utilização deste tipo de subprodutos na alimentação humana, não sendo possível a posterior comercialização desta incorporação.

## **I.4.2 Lúpulo Residual/ *Hot Trub***

### **I.4.2.1 Caracterização Química**

O lúpulo pode ser adicionado em diferentes pontos do processo cervejeiro dependendo das diferentes gamas de cerveja, por sua vez, a remoção deste subproduto também pode ser realizada em diferentes etapas. No entanto, por norma, o lúpulo residual em conjunto com o *hot trub*, é removido antes que ocorra a fermentação, na fase de decantação.

Durante o arrefecimento do mosto, é efetuada a separação do lúpulo, e este segue posteriormente para a etapa de fermentação, sobrando o lúpulo residual e o *hot trub*, sendo que estes são descartados pela indústria. O *hot trub* corresponde ao produto resultante de uma precipitação no momento de ebulição do mosto, de polifenóis e ácidos isomerizados provenientes do lúpulo, como também proteínas derivadas do mosto <sup>38</sup>.

Por sua vez, o lúpulo residual/ *hot trub* apresenta elevadas quantidades de azoto livre, polissacarídeos (maioritariamente constituídos por resíduos de glucose e xilose) e proteínas <sup>43</sup>. Para além destes, destacam-se ainda alguns polissacarídeos pécticos, constituídos por ácido galacturónico, ramnose, arabinose e galactose <sup>38</sup> e óleos essenciais, principalmente constituídos por  $\beta$ -mirceno e  $\alpha$ -humuleno <sup>44</sup>.

### **I.4.2.2 Potencialidades Biotecnológicas**

A valorização deste subproduto é pouco documentada na literatura face à valorização da dreche, porém, tal como a dreche, o seu uso mais frequente é como fertilizante devido ao teor em azoto. Outro uso comum é a adição deste subproduto à dreche e ambos serem reutilizados como ração animal, no entanto no lúpulo residual ainda está presente substâncias amargas que podem levar à rejeição por parte do animal (a solução passa por degradar essas substâncias com recurso a fungos seletivos como por exemplo *Candida parapsilosis*) <sup>38</sup>.

À luz da composição química do lúpulo/ *hot trub*, diversos compostos de interesse industrial podem ser recuperados através de tratamentos prévios, nomeadamente as pectinas, um ingrediente importante na indústria alimentar utilizado como gelificante <sup>38</sup>.

A adição de *hot trub* ao mosto aumenta a viabilidade e o desempenho da estirpe de levedura *S. cerevisiae*, enquanto que o lúpulo pode ser reutilizado como substituto de antibióticos no controlo bacteriano de fermentações alcoólicas <sup>38, 41</sup>.

Uma outra reutilização deste subproduto é como um inseticida barato e amigo do ambiente que visa proteger alimentos armazenados, nomeadamente cereais, suscetíveis às espécies *Rhizopertha dominica* e *Sitophilus granarius*, devido a este subproduto ser uma fonte de  $\beta$ -mirceno e  $\alpha$ -humuleno com atividade repelente contra as espécies de gorgulho anteriormente mencionadas <sup>44</sup>.

### **I.4.3 Leveduras Excedentárias**

#### **I.4.3.1 Caracterização Química**

As leveduras são adicionadas no momento de fermentação e atuam de forma a converter os açúcares iniciais fermentáveis em etanol e dióxido de carbono. Durante esta etapa, as leveduras multiplicam-se inúmeras vezes, aumentando, conseqüentemente, a sua massa, resultando, no final desta etapa, num subproduto: levedura excedentária. Este subproduto pode ser recolhido no topo ou no fundo da cuba de fermentação, de acordo com o tipo de fermentação. A levedura excedentária, BSY (do inglês *Brewer's Spent Yeast*), é segundo maior subproduto da indústria cervejeira e a sua composição química apresenta alguma variabilidade, dependendo da estirpe utilizada (*S. cerevisiae* ou *S.pastorianus*) e/ou do número de ciclos fermentativos a que está sujeita.

Os principais polissacarídeos que constituem a parede celular são manoproteínas, glicogénio,  $\beta$ -glucanas e quitina <sup>45</sup>. A nível intracelular é possível encontrar proteínas, nomeadamente aminoácidos essenciais, minerais (o fósforo é o que está presente em maior quantidade) e vitaminas do complexo B <sup>38, 43</sup>. É de salientar que durante o processamento da cerveja, há várias modificações na levedura provocadas pelo stress cervejeiro, como por exemplo, as leveduras excedentárias da estirpe *S. pastorianus* apresentam polímeros de manoproteínas mais ramificados e fosforilados em comparação às leveduras inoculadas que ainda não foram sujeitas a nenhum ciclo fermentativo <sup>46</sup>.

### I.4.3.2 Potencialidades Biotecnológicas

As leveduras, apresentam quantidades mais elevadas de proteínas, vitaminas e aminoácidos face à dreche, no entanto, tal como a dreche é amplamente reutilizada como ração animal, principalmente em peixes de aquacultura <sup>41</sup>, ou suplemento nutricional depois de um tratamento prévio de secagem <sup>38</sup>.

A levedura constitui também uma ótima fonte de componentes de valor acrescentado, destaque para a extração de enzimas, vitaminas e bases púricas de DNA e RNA. Os polissacarídeos presentes nas paredes celulares das leveduras também são de interesse biotecnológico, principalmente as  $\beta$ -glucanas e manoproteínas. As  $\beta$ -glucanas são bastante relevantes para as indústrias alimentares e farmacêuticas pois com um baixo custo de produção e uma tecnologia simples de extração, existe inúmeras potencialidades, como por exemplo agente espessante, estabilizante emulsionante, entre outros <sup>38</sup>. Este polissacarídeo apresenta outras características importantes como por exemplo a sua ação antimicrobiana para *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* <sup>47</sup>. As manoproteínas têm função antioxidante e antimutagénica <sup>48</sup>.

Uma reutilização comum da levedura é como extrato de levedura, sendo já usado como aditivo na indústria alimentar, um exemplo é o vegemite® <sup>38, 41</sup>.

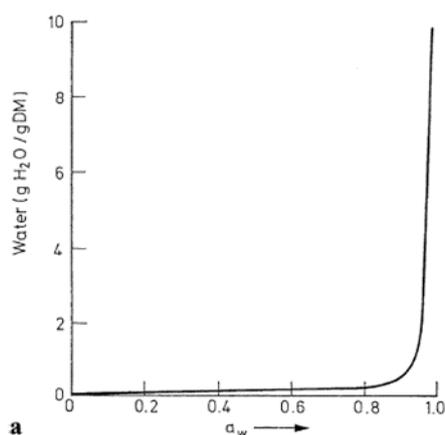
Uma característica das leveduras que também desperta interesse a nível industrial é a realização de autólise, mais concretamente a utilização de leveduras na sua forma autolisada <sup>41</sup>. Um exemplo notório desta aplicação é durante a fermentação de sumos vegetais em que o agente de fermentação é *Lactobacillus acidophilus*, a adição da levedura autolisada influencia de forma positiva a fermentação (redução do tempo de fermentação, aumento da biomassa) e, conseqüentemente enriquece a composição nutricional dos sumos <sup>38</sup>. Fazendo a ponte com a espécie mencionada anteriormente, este subproduto é um bom complemento de meios de culturas de certas espécies do género *Lactobacillus*, devido aos seus nutrientes e teor de azoto <sup>41</sup>.

Outras utilizações menos frequentes são: como substrato para a produção de metano; biorremediação de metais pesados como chumbo; adição a resíduos proveniente da indústria de papel, meio ideal para o crescimento de minhocas, que são agentes importantes na renovação do solo <sup>38</sup>.

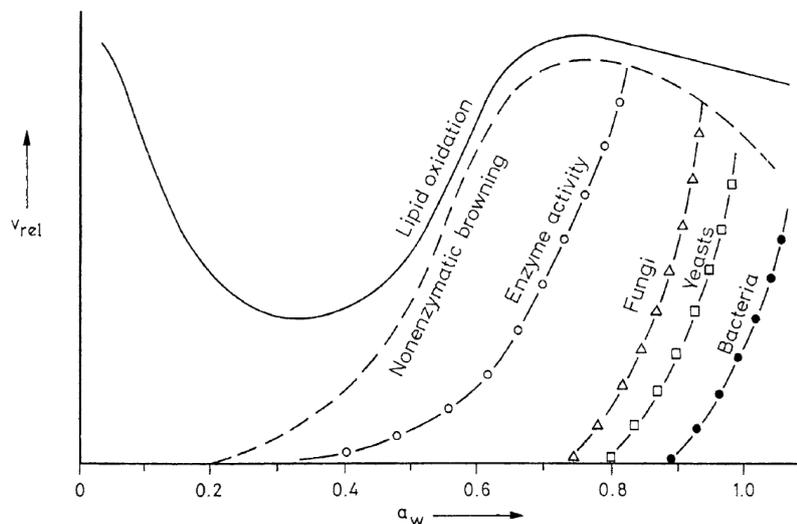
## I.5 Secagem e Estabilização de Subprodutos

Os subprodutos da indústria cervejeira apresentam alto teor de humidade, nomeadamente 70 a 80% na dreche, 75 a 80% no lúpulo residual/ *hot trub* e cerca de 90% no caso das leveduras excedentárias<sup>49, 33</sup>. Assim sendo, é necessário remover a água dos subprodutos de modo a inibir o crescimento de microrganismos e diminuir a velocidade de algumas reações que prejudicam a qualidade nutricional e organoléptica dos subprodutos. Um baixo teor de humidade prolonga o tempo de armazenamento para uma posterior valorização. No entanto, a conservação de alimentos não depende do teor de água, mas sim da atividade de água ( $a_w$ )<sup>50</sup>.

A  $a_w$  é dada pela fórmula  $a_w = P/P_0$ , em que  $P/P_0$ =humidade relativa/100, em que  $P$  é a pressão de vapor da água em equilíbrio com o alimento à temperatura  $T$  e  $P_0$  é a pressão de vapor da água pura à temperatura  $T$ , numa escala entre 0 e 1<sup>50</sup>. Porém a  $a_w$  relaciona-se com o teor de humidade através da curva isotérmica de sorção dos alimentos, representada na figura 8, para alimentos com teor de humidade superior a 50%<sup>50</sup>, sendo que é possível estimar com base na curva que os subprodutos da atividade cervejeira compreendem uma  $a_w$  superior a 0,8, ou seja, privilegiam o crescimento de fungos, leveduras e bactérias (figura 9).



**Figura 8:** Curva isotérmica de sorção de alimentos com teor de humidade superior a 50%<sup>51</sup>.



**Figura 9:** Velocidade relativa das reações enzimáticas e não enzimáticas e do crescimento microbiano em função da atividade de água ( $a_w$ )<sup>51</sup>.

Para uma  $a_w$  de 0,7 ou inferior (figura 9), podemos assegurar subprodutos estáveis microbiologicamente, então o teor de humidade relativa necessita de ser reduzido até cerca de 16% ou valores inferiores (figura 8), pois  $a_w$  0,7 compreende um valor aproximadamente de 0,2 de g de água/ g por matéria seca.

Um dos métodos mais frequentes e antigos para preservar alimento é a secagem. A secagem consiste no processo de remoção de humidade devido à transferência de calor e massa. Para além de conservar alimentos, a secagem apresenta outras vantagens tais como a redução do peso e do volume, que facilita em questões logísticas como o transporte e o armazenamento<sup>52</sup>. Outros métodos de estabilização compreendem a adição de agentes antimicrobianos, como por exemplo anidrido sulfuroso ( $SO_2$ )<sup>53</sup>.

É bastante comum na indústria alimentar associar a secagem de alimentos com a realização de um pré-tratamento químico, nomeadamente a adição de anidrido sulfuroso ( $SO_2$ ) aos produtos<sup>53</sup>. Esta associação é amplamente utilizada na secagem de frutas, como de alperces e maçãs, pois impede os processos enzimáticos, retarda a oxidação de lipídios e inibe o crescimento de vários tipos microrganismos<sup>54</sup>.

## **II Desenvolvimento do Estágio Curricular na Empresa**

### **II.1 Objetivo do Estágio Curricular**

A realização do estágio curricular é uma componente do plano de estudos do 2º ano do Mestrado de Biotecnologia, com especialização no ramo alimentar.

Como primeiro objetivo do estágio em ambiente empresarial pressupõe-se a compreensão da estrutura organizacional e da dinâmica laboral, é fundamental compreender os valores e objetivos da empresa Essência D’Alma, Lda. Numa segunda fase procura-se a integração no ambiente de trabalho como membro ativo da equipa, participando em atividades como o processamento de cerveja, análises sensoriais e de segurança alimentar, controlo de qualidade e limpeza dos equipamentos e instalações.

A dissertação “Identificação, quantificação e valorização dos subprodutos produzidos pela atividade cervejeira”, surge da aliança do contexto académico com a visão prática do mundo de trabalho, onde o objetivo passa por identificar e quantificar todos os subprodutos e resíduos resultantes do processamento de cerveja e desenvolver um plano ação de modo a reduzir e/ou reutilizar e/ou eliminar os mesmos.

### **II.2 Apresentação da Empresa**

A empresa Essência D’Alma, Lda. detentora da marca “Cerveja Vadia”, sediada em Oliveira de Azeméis, distrito de Aveiro, começou em 2006, onde três amigos (atuais sócios), Nicolas Billard, Nuno Marques e Victor Silva, decidiram embarcar na aventura de fabricar cerveja artesanal. No início perceberam a potencialidade deste produto, ambicionando desde cedo produzir e comercializar a melhor cerveja artesanal portuguesa e paralelamente contribuir para a valorização da cerveja no mercado português. Apesar do projeto ter início no ano 2006, apenas em 2012 é que começaram com a comercialização do produto.

Atualmente apresentam duas gamas de cerveja e algumas edições especiais, a gama original que compreende uma cerveja do estilo *German Pilsner* (Vadia Loira), uma *Dark*

*Lager* (Vadia Preta), uma *Wheatbeer* (Vadia Trigo), uma *Marzen* (Vadia Rubi) e uma gama de harmonização com cervejas do estilo *Doppelbock* (Vadia Extra), *American Pale Ale* (Vadia Orgânica) com certificado biológico, *Indian Pale Ale* (Vadia Thartaruga) e uma *Fruit Beer* (Vadia Ginja). Além destes produtos, a empresa em colaboração com a universidade de Aveiro, desenvolveu e produz uma Sidra eco-inovadora 100% portuguesa.

Apesar da dimensão pequena da empresa, a marca conta já com inúmeros prémios, com destaque para as medalhas de ouro, a primeira no World Beer Awards, em Inglaterra, em 2015 com a Vadia Rubi e a segunda World Cider Awards, em 2018, com a Sidra Vadia.

### **II.3 Atividades desenvolvidas na Empresa**

Ao longo do estágio curricular, foi essencial a participação nas atividades regulares da empresa, que incluíam todas as etapas de produção e higienização, assim como as análises laboratoriais. O estágio na cervejeira permitiu-me entender a realidade das microcervejeiras.

A empresa Essência D'Alma segue o processo de produção de cerveja descrito anteriormente à exceção da maltagem, ou seja, adquirem os cereais já maltados. Assim sendo, o processo começa pela moagem, num moinho de pedra (moinho de farinha) numa sala própria, sendo necessário ter atenção a certos detalhes, como a pesagem dos grãos e os diferentes tipos de malte a utilizar, pois estes são característicos de cada receita. É de salientar que a empresa é detentora de um *software*, *BeerSmith*, que permite controlar as receitas das diferentes cervejas produzidas pela marca. Os ingredientes específicos de cada gama de cervejas são introduzidos neste software e este, por sua vez, estima as características do produto final como teor alcoólico, amargor, cor, entre outros. Para além destas estimativas, o software pode indicar outras propriedades essenciais ao processo de produção como por exemplo a temperatura e tempos ótimos dos patamares da brassagem. Nesta etapa é possível verificar o que foi mencionado no capítulo anterior, nomeadamente a contribuição do malte para a cor, aroma e sabor da cerveja, por exemplo a cerveja Vadia Preta utiliza grãos de malte mais torrados, malte chocolate, que confere uma cor mais escura e um sabor com notas de café e chocolate. Para o processo também são usados grãos não maltados (adjuntos) para a produção da cerveja Vadia Trigo, porém estes seguem o mesmo protocolo de moagem que os grãos de cevada maltados.

Depois da moagem, os grãos abandonam a sala de moagem e seguem para a produção. Aqui o processo começa com a brassagem, na panela de brassagem, os patamares da mesma são regulados a partir de um *software* desenhado especificamente para a empresa, tornando o processo mais automatizado e rigoroso, não só nesta etapa como nas restantes, no entanto é necessário o controlo do mesmo. Depois da brassagem, o mosto segue para a filtração para se separar da sua fração sólida (dreche). A dreche é removida da panela de filtração manualmente e encaminhada para fora das instalações (é utilizada por um agricultor). Na empresa Essência D'Alma, de forma a rentabilizar tempo, a etapa de brassagem e de filtração são sempre realizadas para 1000L de cerveja, depois estes 1000L são reencaminhados para um pulmão e reservados, aquando a etapa seguinte, a ebulição, esta já é realizada com 2000L. De seguida, procede-se à etapa de ebulição, onde é adicionado lúpulo, que neste caso específico é em forma de pellets, onde há diferentes variedades que conferem características diferentes. Nesta etapa, a empresa adiciona minerais ao mosto, nomeadamente zinco e cloreto de cálcio. Posteriormente, o mosto segue para o whirlpool com o objetivo de se separar do lúpulo/ *hot trub*. Após esta etapa há um arrefecimento do mosto por um permutador de placas e por fim segue para a respetiva cuba de fermentação.

Na cuba de fermentação, as leveduras previamente inoculadas são empurradas por oxigénio e começa a fermentação, especificamente são leveduras secas, da espécie *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*, com diferentes estirpes (diferentes estirpes conferem diferentes particularidades ao produto). A empresa Essência d'Alma apresenta cervejas do tipo *Ale* e do tipo *Lager* na sua gama, sendo que as primeiras são fermentadas a uma temperatura de 20°C durante sensivelmente 7 dias (fermentação alta), enquanto que as segundas, inicialmente a fermentam a uma temperatura de 12°C e quando perfazem os 50% de fermentação, a temperatura aumenta para os 16°C. Em ambos o caso é realizado uma purga de leveduras aos 50% da fermentação e quando esta termina. A fase de fermentação é extremamente importante então é constantemente vigiada a nível da temperatura (para minimizar a origem de *off-flavours*), análises sensoriais, ao °BRIX, pH e ao teor alcoólico.

No período de maturação, a temperatura desce para 4°C para ambos os estilos e estas permanecem assim durante 4 dias. É no final desta etapa que são recolhidas leveduras para uma posterior avaliação da sua viabilidade para a decisão da sua reutilização ou eliminação.

A etapa de filtração nesta empresa é a realizada com filtros de cartuxo, onde as cerveja vadia preta e trigo não passam por este processo, a cerveja vadia extra é filtrada com um filtro de malha 5µm e as restantes por filtros de malha 5 e 1 µm. por fim é realizada a carbonatação com recurso a uma bomba monofásica.

A etapa de envasilhamento na empresa compreende uma linha de produção automática que conta com uma enchedora que enche as garrafas e coloca as caricas, seguindo a pasteurização e por fim a rotulagem. Nota-se que na pasteurização, há uma garrafa que contém um *data log* de forma a controlar a temperatura, para não comprometer as qualidades organoléticas e de segurança do produto final. No final da linha há um controlo de qualidade visual, da qual garrafas que não cumprem com os requisitos mínimos são descartadas. No caso específico de barris, estes são enchidos e rotulados manualmente, passando somente no pasteurizador.

A nível da higienização do espaço, todas as semanas é realizada uma limpeza semelhante a outras empresas alimentares, a empresa Essência d'Alma segue um protocolo específico de CIP (*Clean-in-place*).

## **II.4 Metodologias**

### **II.4.1 Amostras**

Os subprodutos, dreche e lúpulo residual/ *hot trub*, foram recolhidos da empresa Essência D'Alma, nos dias 3 de Abril de 2019 (primeiro teste) e 16 de Abril de 2019 (segundo teste) de uma produção de cerveja Vadia Loira.

O subproduto, leveduras excedentárias, foi recolhido da empresa Essência D'Alma no dia 06 de Maio de 2019, de uma cuba fermentativa onde se encontrava a cerveja Vadia Extra. As amostras de leveduras excedentárias compreendem uma massa de 3,300kg e 2,300 kg, para o primeiro e o segundo teste respetivamente.

### **II.4.2 Quantificação dos subprodutos**

A quantificação dos subprodutos decorreu durante o mês de Outubro de 2018 aquando a realização de produções (dreche e lúpulo residual/ *Hot Trub*) e purgas (leveduras excedentárias).

A quantificação da dreche, em gramas, baseou-se na multiplicação do volume com a densidade devido à impossibilidade de pesagem. A dreche é depositada num recipiente, após a filtração, que apresenta a forma geométrica de um cubo com  $1\text{m}^3$ . Assim sendo, para calcular o volume da dreche, inicialmente, com o auxílio de uma fita métrica mediu-se a altura máxima da dreche no recipiente e, por fim, recorrendo à fórmula matemática  $V = c \times l \times h$  calculou-se o volume da dreche. Onde  $c$  corresponde a 1m,  $l$  corresponde a 1m e  $h$  corresponde à altura da dreche medida após a filtração. A determinação da densidade realizou-se da seguinte forma: pesou-se 1 L de dreche três vezes (para diminuir erros associados), por cada produção, e posteriormente realizou-se a média das três medições de 1 L, obtendo por fim a densidade. No final efetuou-se a média dos valores obtidos.

A quantificação do lúpulo residual/ *hot trub* é realizada através da medição da altura que este subproduto atinge no whirlpool. Este equipamento é cilíndrico, onde se utilizou a fórmula matemática correspondente ao volume do cilindro ( $V = \pi r^2 h$ ), em que o raio corresponde 72,5 cm (informação retirada do desenho técnico do equipamento) e a altura é medida com uma fita métrica. No final efetuou-se a média dos valores obtidos.

As leveduras excedentárias foram quantificadas através do volume do recipiente onde eram depositadas aquando o momento das duas purgas, tanto da primeira após 50% da fermentação como da segunda, no final da fermentação, de forma individual. Este recipiente tem a capacidade máxima de 8 L e uma forma cilíndrica, onde o volume é calculado através da fórmula matemática  $V = \pi r^2 h$ , onde o raio corresponde a 14,4 cm e a altura é medida com fita métrica. No final efetuou-se a média dos valores obtidos.

### **II.4.3 Secagem dos subprodutos**

A secagem ao ar no exterior efetuou-se entre os períodos de 03 a 06 de Abril de 2019 (primeiro teste) e de 16 a 18 de Abril de 2019 (segundo teste). Os subprodutos, dreche e lúpulo residual/ *hot trub*, foram colocados num local arejado e com boa exposição solar, com temperaturas compreendidas entre os 10 e 16°C<sup>55</sup> no primeiro teste, e temperaturas compreendidas entre 12 e 19°C<sup>55</sup> no segundo teste, sendo que à noite foram recolhidos para o armazém. A massa dos subprodutos foi registada ao longo do tempo e aquando a sua

monitorização procedeu-se à recolha de amostras, que foram congeladas, para posterior análise laboratorial do teor de humidade.

As amostras de dreche e lúpulo residual/ *hot trub*, no dia 3 de abril, compreendem uma massa de 5,700 kg e 1,500 kg respetivamente, e foram colocadas numa caixa de plástico com uma massa de 1,944 kg e uma área de 0,2301 m<sup>2</sup>, forrada com papel de filtro, onde compreendeu sensivelmente 6 cm de altura de dreche e de aproximadamente 2 cm de altura de lúpulo residual/ *hot trub*. As amostras de dreche e lúpulo residual/ *hot trub*, no dia 16 de abril, compreendem uma massa de 6,000 kg e 2,800 kg respetivamente, e foram colocadas numa caixa de plástico com uma massa de 1,944 kg e uma área de 0,2301 m<sup>2</sup>, forrada com papel de filtro, onde compreenderam sensivelmente 6 cm de altura de dreche e de aproximadamente 2 cm de altura de lúpulo residual/ *hot trub*.

A secagem ao ar no interior efetuou-se entre 06 a 08 de Maio de 2019 (primeiro e segundo teste), com temperaturas compreendidas entre 12 e 18°C <sup>56</sup>. As leveduras excedentárias foram colocadas numa sala fechada, com temperaturas acima da temperatura ambiente e minimamente arejada, a sala da caldeira. A massa deste subproduto foi registada ao longo do tempo e aquando a sua monitorização procedeu-se à recolha de amostras, que foram congeladas, para posterior análise laboratorial do teor de humidade. Estas foram colocadas numa caixa de plástico com uma massa de 1,944 kg e uma área de 0,2301 m<sup>2</sup>, forrada com papel de filtro, numa cama de aproximadamente 2 cm de altura.

A secagem com adição de sulfuroso foi conduzida ao longo de sete dias ao ar no interior de uma *hotte*. Foram utilizadas três réplicas com sensivelmente 2,0 g de cada subproduto. Aplicou-se diretamente 1,0 mL e 2,0 mL de anidrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) a 2,384% às amostras havendo também um grupo de controlo (não foi adicionado sulfuroso). Posteriormente procedeu-se à análise do teor de humidade de todas as amostras.

#### **II.4.4 Determinação da perda de massa e do teor de humidade**

A determinação da perda de massa durante a secagem ao ar no exterior das instalações fabris e na secagem ao ar no interior das instalações fabris foi efetuada com uma balança digital da empresa Essência D'Alma, onde o peso mínimo é de 2 kg e o peso máximo é de 150 kg, com uma casa decimal. As amostras recolhidas foram pesadas numa balança

digital da empresa Essência D'Alma, onde o peso mínimo de pesagem é 0,002 g e o peso máximo é de 1 kg, com duas casas decimais.

Para a determinação do teor de humidade pesou-se cerca de 2g de cada amostra pretendida, com três réplicas, para uma caixa de pesagem. De seguida, colocou-se numa estufa a 105° durante 3h30, até se observar peso constante, onde foi vigiada a perda de massa ao longo deste período após o arrefecimento das caixas de pesagem num exsiccador. Por fim aplicaram-se as equações 1 e 2 aos valores obtidos e efetuou-se a média para as três réplicas.

$$\text{Equação 1:} \quad \% \text{ de sólidos} = \frac{\text{massa seca da amostra}}{\text{massa húmida da amostra}} \times 100 \quad [57]$$

$$\text{Equação 2:} \quad \text{Teor de Humidade} = 100\% - \% \text{ de sólidos}$$

## II.5 Resultados e Discussão

### II.5.1 Gestão de Resíduos

A elaboração de um plano de gestão de resíduos por norma envolve quatro etapas: envolver todos os colaboradores da empresa para uma melhor organização interna, realizar o diagnóstico atual da empresa, elaborar um plano de ação e por fim, monitorizar o plano de ação <sup>58</sup>.

Numa primeira fase, abordou-se todos os colaboradores da empresa para compreender como é efetuada a gestão de resíduos e, paralelamente realizei o diagnóstico da empresa Essência D'Alma. O diagnóstico passa por alguns fatores como perceber os procedimentos existentes, avaliar o modelo de aquisição de produtos/serviços e inventariar e/ou caracterizar (por exemplo tipo e quantidades de contentores). Assim sendo, reuniu-se uma lista de todos os resíduos, descrito na tabela 1, com o respetivo código LER (Lista Europeia de Resíduos), esta lista foi criada para uniformizar a comunicação e é constituída por 20 capítulos que agrupam resíduos segundo áreas específicas de atividade, estes capítulos apresentam mais divisões (subcapítulos) até chegar ao resíduo específico que é classificado com um código de 6 dígitos (primeiros dois correspondem ao capítulo, os segundos ao subcapítulo e os últimos ao resíduo propriamente dito) <sup>59</sup>. Este diagnóstico deu

para perceber que apesar de já estar incutida algumas ideias básicas de gestão de resíduos como a reciclagem, a falta de organização e a falta de registos na APA são as maiores lacunas.

**Tabela 1:** Etapas do processamento de cerveja com os resíduos resultantes de cada etapa acompanhados com o respetivo código LER.

<b>Etapas</b>	<b>Resíduos/Subprodutos</b>	<b>Código LER</b>
Receção de matérias primas (Malte e <i>Packaging Materials</i> )	Papel; Vidro; Rótulos; Plástico; Madeira; Caricas	15 01 01 → Papel 15 01 07 → Vidro 15 01 05 → Rótulo 15 01 02 → Plástico 15 01 03 → Madeira 12 01 01 → Caricas
Moagem	Plástico; Malte	15 01 02 → Plástico 02 07 04 → Malte
Brassagem	Não há resíduos contabilizados	-----
<b>Filtração</b>	<b>Dreche</b>	<b>02 07 04</b>
Ebulição	Vapor de água	Não há classificação
<b>Decantação</b>	<b>Hot Trub; Lúpulo</b>	<b>02 07 05 → Hot Trub/ Lúpulo</b>
<b>Fermentação</b>	<b>Leveduras</b>	<b>02 07 04</b>
<b>Maturação</b>	<b>Leveduras</b>	<b>02 07 04</b>
Filtração	Leveduras e outras partículas em suspensão; Filtros	02 07 04 → Leveduras 15 02 03 → Filtros
Carbonatação	Não há resíduos classificados	-----
Pasteurização	Água	Não há Classificação
Envasilhamento	Papel; Vidro; Rótulos; Plástico; Caricas; Madeira; Cerveja	15 01 01 → Papel 15 01 07 → Vidro 15 01 05 → Rótulo 15 01 02 → Plástico 12 01 01 → Caricas 15 01 03 → Madeira 02 07 04 → Cerveja
Limpeza e Manutenção	Água contaminada com produtos químicos	20 01 29

Com base no diagnóstico, realizei um plano de ação que passou por identificar e organizar todas as unidades de armazenamento de resíduos, pois estas não seguem o padrão de cores standardizado, por exemplo: azul para papel e cartão, amarelo para plástico e metal, verde para vidro, e não se encontravam separadas fisicamente, gerando, conseqüentemente, erros no momento da reciclagem. Associado à identificação das unidades de armazenamento, elaborei também uma lista com todos os resíduos da empresa e o seu destino final (tabela 2) evitando novamente erros. Com base no processamento da cerveja,

instalei unidades de armazenamento de resíduos na zona de enchimento (vidrão) e na sala de moagem (indiferenciado).

Numa segunda fase, atualizei os dados e agendei a recolha de resíduos da empresa na plataforma online SILIAMB (Sistema Integrado de Licenciamento do Ambiente), esta plataforma é promovida pela APA de forma a reduzir a burocracia e tornar a comunicação entre a agência e os cidadãos, produtores, entre outros, mais rápida e eficiente. Este passo é bastante importante pois, segundo a legislação portuguesa, é obrigatório que os produtores de resíduos, neste caso a empresa Essência D'Alma, emitam uma Guia de Acompanhamento de Resíduos eletrónica (eGAR), a partir do SILIAMB, para o transporte de resíduos <sup>60</sup>. A legislação portuguesa também indica a elaboração de um Mapa Integrado de Registo de Resíduos, MIRR, mas a empresa Essência D'Alma compreende menos de 10 trabalhadores e não é obrigatório.

De forma a facilitar a monitorização da gestão de resíduos elaborei um dossiê de com documentos pertinentes, nomeadamente, como funciona o SILIAMB, dados da empresa responsável pelo tratamento de resíduos, agenda da recolha de resíduos, que neste caso é de 3 em 3 meses, e as guias validadas.

O plano de ação também compreende pontos como a instalação de um tanque de aproveitamento de água debaixo do pasteurizador e a utilização de caixas montáveis. Estes pontos ainda não foram realizados.

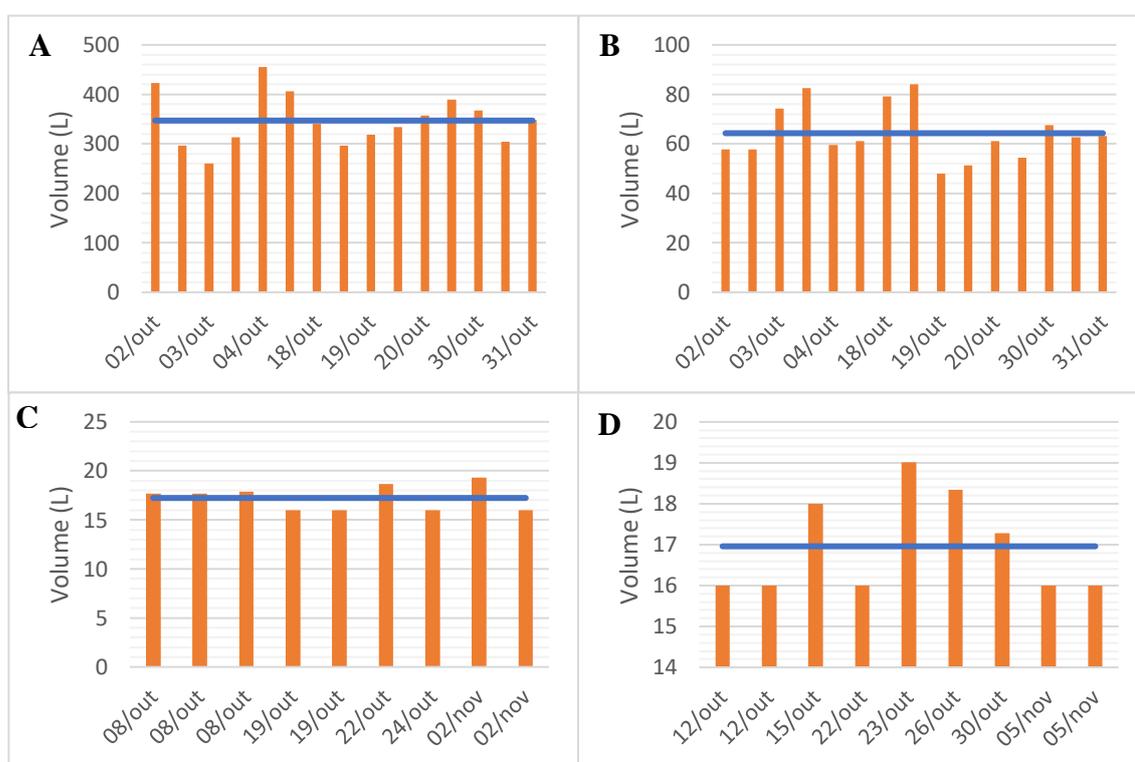
**Tabela 2:** Resíduos e Subprodutos da empresa Essência D'Alma com o respectivo destino final, dividido em categorias para uma melhor organização.

Incorporação no produto final	<b>Lúpulo</b>	Embalagem de Plástico	Contentor destinado ao Plástico e Metal
		Embalagem de Cartão	Contentor destinado ao Papel e Cartão
	<b>Malte</b>	Embalagem de Plástico	<i>Big Bags:</i> reutilização como saco para o lixo <i>Normal Bags:</i> reutilização como transportador de grão moído
		Paletes Americanas ( <i>Big Bags</i> ) ou Euro ( <i>Normal Bags</i> )	Americanas: espaço destinado à madeira
			Euro: Reutilização
	<b>Leveduras</b>	Embalagem de Cartão	Contentor destinado ao Papel e Cartão
Embalagem de Plástico		Contentor destinado ao Plástico e Metal	
Consumíveis	<b>Garrafas</b> (Vidro)	Intercalares de Plástico	Devolvidos ao Produtor
		Embalagem de Plástico	Contentor destinado ao Plástico e Metal
		Segurança (Plástico)	Contentor destinado ao Plástico e Metal
		Paletes Industriais	Atualmente são descartadas, mas no futuro podem ser reutilizáveis
	<b>Rótulos</b> (Plástico e Metal)	Embalagem de Cartão	Contentor destinado ao Papel e Cartão
		Embalagem de Plástico	Contentor destinado ao Plástico e Metal / Reutilização
	<b>Caixas</b> (Papel e Cartão)	Segurança (plástico)	Contentor destinado ao Plástico e Metal
	<b>Separadores</b> (Papel e Cartão)	Segurança (plástico)	Contentor destinado ao Plástico e Metal
	<b>Caricas</b> (Plástico e Metal)	Embalagem de Cartão	Contentor destinado ao Papel e Cartão
		Embalagem de Plástico	Contentor destinado ao Plástico e Metal
Resíduo Geral	<b>Filtros</b> (Contentor destinado a filtros)	Embalagem de Cartão	Contentor destinado ao Papel e Cartão
		Embalagem de Plástico	Contentor destinado ao Plástico e Metal

## II.5.2 Quantificação de Subprodutos

A empresa Essência D'Alma, sustenta todas as etapas do processo cervejeiro como referido anteriormente, à exceção da maltagem, onde é possível destacar três importantes subprodutos: dreche, lúpulo residual/ *hot trub* e leveduras excedentárias.

Ao longo de sensivelmente um mês (outubro) recolheu-se informação estatística acerca do volume dos três subprodutos produzidos pela atividade cervejeira, que estão representados na figura 10 e anexo 1.



**Figura 10:** Quantificação dos subprodutos ao longo do mês de Outubro, A corresponde ao volume (L) da dreche com a respetiva média (reta azul), B corresponde ao volume (L) do lúpulo residual/ *hot trub* com a respetiva média (reta azul), C corresponde ao volume (L) das leveduras excedentárias da purga realizada a 50% da fermentação com a respetiva média (reta azul) e D corresponde ao volume (L) da purga realizada no final da fermentação com a respetiva média (reta azul).

Conclui-se que para fabricar 1L de cerveja, a empresa Essência D'Alma origina, em média, 0,28 kg de dreche, 0,064 L lúpulo residual/ *hot trub* de e 0,017 L de leveduras. É de salientar que a valorização dos subprodutos compreende o volume dos mesmos para cada produção, ou seja, a quantidade de subproduto originária por cada 1000 L de cerveja

(equivale a uma produção), assim sendo, gera-se 280 kg de dreche, 64 L de lúpulo/ *hot trub* e 17 L de leveduras. Segundo dados da literatura, a quantidade de dreche é de cerca de 14 kg/hL (a empresa produz em média 28 kg/hL), o lúpulo residual/ *Hot trub* compreende entre 0,2 a 0,4% do volume do mosto aproximadamente, enquanto que as leveduras excedentárias representam sensivelmente 1,5 a 3% do volume total de produção (em peso seco) <sup>33, 49</sup>, concluindo que as quantidades de subprodutos gerados pela empresa, nomeadamente dreche e lúpulo residual/ *hot trub*, estão acima dos estudos efetuados e que a quantidade de leveduras excedentárias estão concordantes com a literatura.

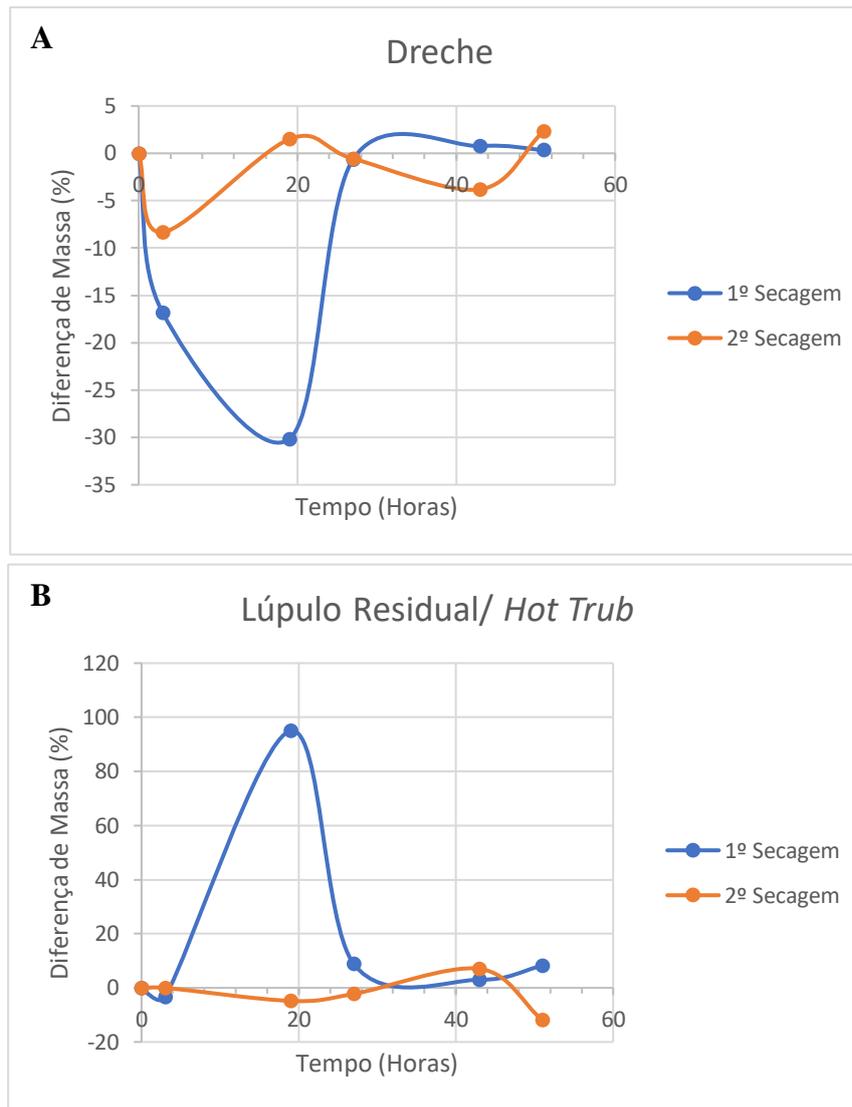
No caso das leveduras, estes valores mencionados anteriormente são referentes apenas ao excedente resultante de cada fermentação, pois no final da maturação há mais leveduras sedimentadas. Neste caso específico, as leveduras retiradas no final da maturação, ao contrário das que são retiradas ao longo da fermentação, são por norma reutilizadas em 5-7 ciclos fermentativos (*S. pastorianus*) e/ou 1-3 ciclos fermentativos (*S. cerevisiae*), depois de verificar a viabilidade das mesmas.

### **II.5.3 Estratégias de Estabilização dos Subprodutos**

A valorização dos subprodutos passa por um tratamento de estabilização, de forma a reduzir a atividade de água. Foram testadas três alternativas sustentáveis: secagem ao ar no exterior, secagem ao ar no interior (sala da caldeira da empresa Essência D'Alma) e secagem ao ar com adição de uma solução de anidrido sulfuroso (um subproduto da indústria vinícola). A estabilização dos subprodutos permitirá a sua valorização para vários mercados, desde a venda direta dos subprodutos estáveis a empresas para incorporação como ingrediente e/ou posterior processo extrativo.

#### **II.5.3.1 Secagem ao ar no exterior**

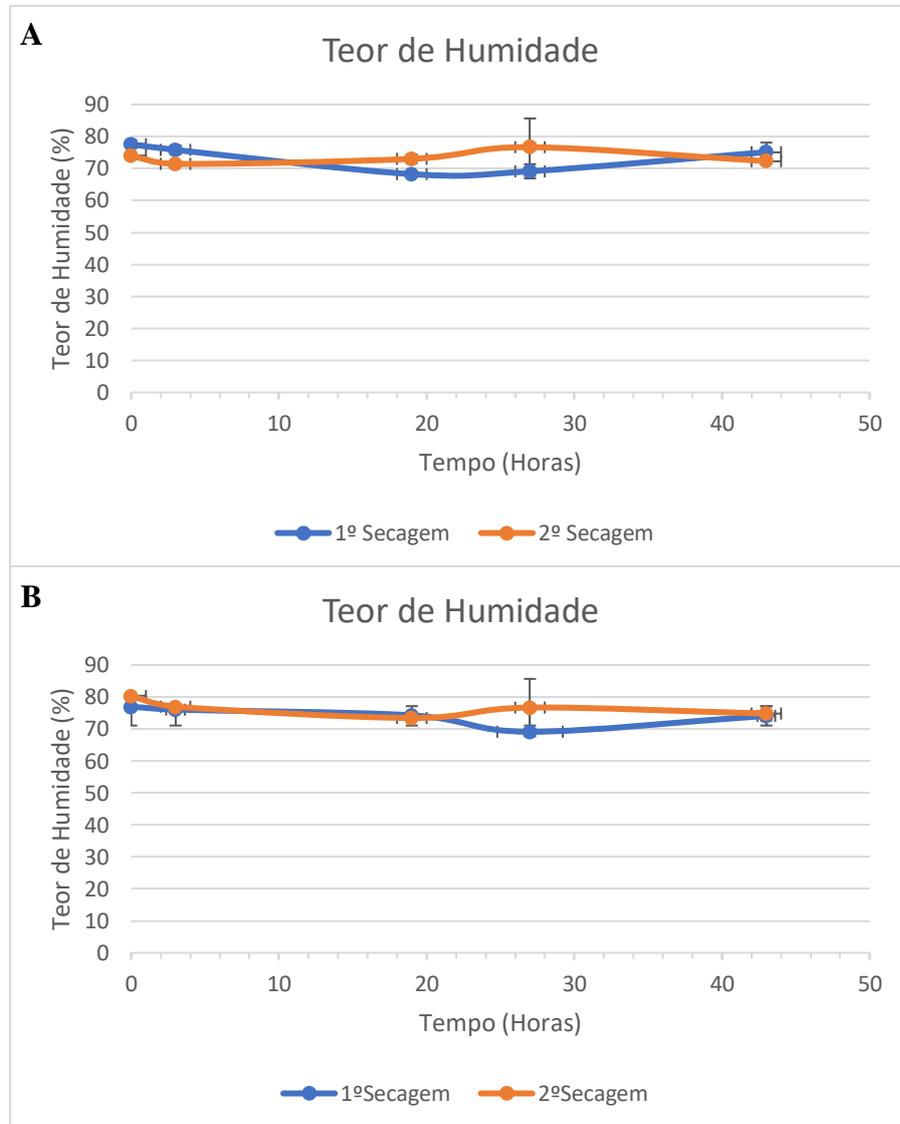
Este método de estabilização surge da adaptação do método tradicional de secagem ao sol de cereais na agricultura. Os subprodutos sujeitos a este método foram a dreche e o lúpulo residual/ *hot trub*, sendo que a variação de massa ao longo do tempo foi monitorizada (anexo 2). A perda e ganho de massa por parte dos subprodutos está representada na figura 11.



**Figura 11:** Monitorização da variação de massa dos subprodutos ao longo de três dias, nos dois testes, expostos ao ar no exterior, em que A corresponde à variação de massa por parte da dreche e B corresponde à variação de massa por parte do lúpulo residual/ *hot trub*.

Analisando a figura 11, é possível afirmar que a perda e ganho de massa por parte dos subprodutos é bastante inconstante pois está muito dependente das condições climáticas. A maior perda de massa por parte da dreche, foi registada no segundo dia, às 10h00, no primeiro teste, em que perdeu 1,718 kg (30,1% da massa total). No caso do lúpulo residual/ *Hot Trub*, foi registada também no segundo dia às 10h00, mas no segundo teste, onde perdeu 0,135 kg (4,8% da massa total). Contudo, a diferença de massa pesada ao longo do tempo não mostrou perdas de massa significativas, não representando resultados conclusivos, no entanto para cada ponto de amostragem foi medida o teor de humidade. Os

resultados da análise do teor de humidade das amostras recolhidas no momento de monitorização da variação da massa estão expostos na figura 12 e mostram que as condições climáticas influenciam a secagem.



**Figura 12:** Teor de humidade das amostras recolhidas durante os três dias de secagem ao ar no exterior, relativas aos dois testes em que A corresponde à dreche, B corresponde ao Lúpulo Residual / *Hot Trub*.

Ao analisar a figura 12 salientamos que as amostras iniciais de dreche relativas aos dois testes de secagem, que correspondem a 77,6% e a 74% de teor de humidade, respetivamente estão concordantes com os dados da literatura (teor de humidade de 70 a 80%)<sup>33,49</sup>. As amostras iniciais de lúpulo residual/ *hot trub*, apresentam um teor de humidade

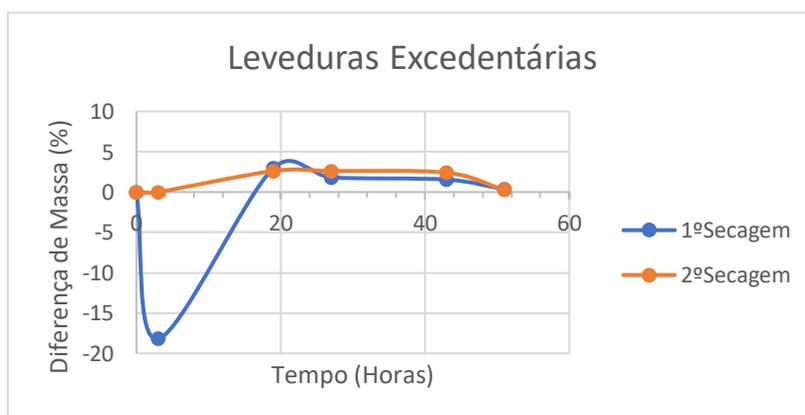
de 77% e 80% para os dois testes de secagem respectivamente, e também estão concordantes com os dados da revisão bibliográfica (teor de humidade de 75 a 80%)<sup>33,49</sup>.

No caso particular da dreche, o menor valor de teor de humidade, 68,3%, que foi registado no primeiro teste, 19h após o início da secagem, sendo que após este ponto ocorreu precipitação levando ao aumento de humidade por parte deste subproduto. Este valor de teor de humidade está longe do valor pretendido, cerca de 16%, sendo que privilegia o crescimento de microrganismos pois compreende uma  $a_w$  superior a 0,7<sup>51</sup>, ou seja, este produto não está estabilizado. Por sua vez, o lúpulo residual/ *hot trub* apresenta o menor valor de teor de humidade, 69,1%, no primeiro teste, 27h após o início da secagem. De acordo com o que foi mencionado anteriormente, também é possível afirmar que este subproduto não está estabilizado.

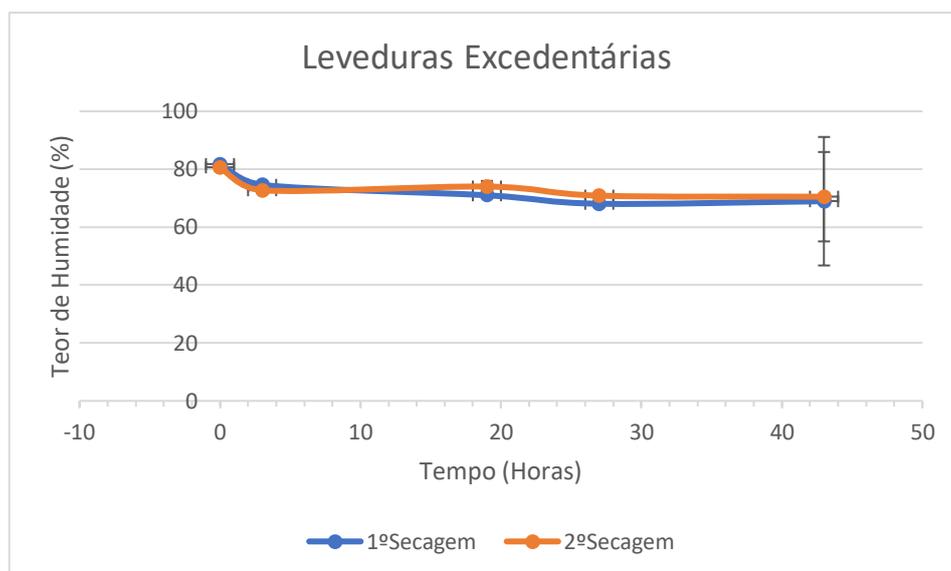
Conclui-se que este método de secagem não é o mais adequado à estabilização destes subprodutos, uma vez que depende muito fatores externos nomeadamente as condições climáticas e a redução do teor de humidade não foi suficiente para atingir o objetivo de ter um produto estabilizado.

### II.5.3.2 Secagem ao Ar no Interior

Os subprodutos sujeitos a este método foram as leveduras excedentárias, sendo que a variação de massa ao longo do tempo foi monitorizada (anexo 3). A perda e ganho de massa por parte dos subprodutos está representada na figura 13.



**Figura 13:** Monitorização da variação de massa do subproduto, leveduras excedentárias, ao longo de três dias, nos dois testes, expostos ao ar no interior.



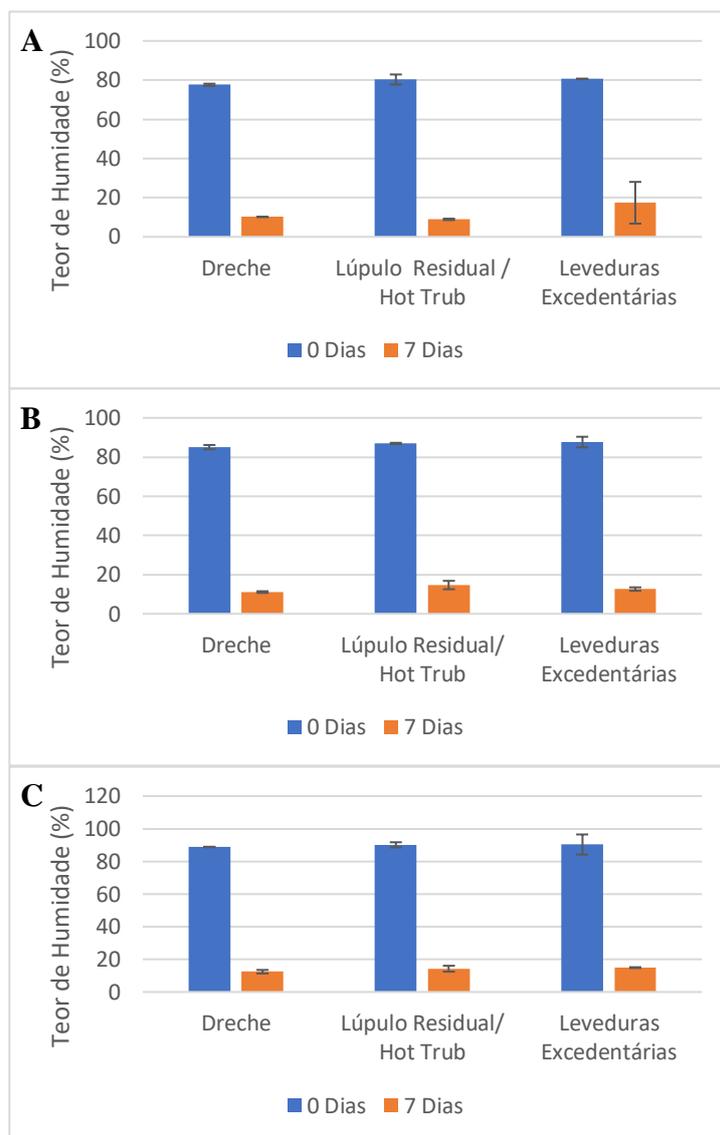
**Figura 14:** Teor de humidade das amostras recolhidas durante os três dias de secagem ao ar no interior, relativas aos dois testes de leveduras excedentárias.

A secagem ao ar no interior das instalações mostrou que ao longo dos três dias a massa não alterou de forma significativa nos dois testes de secagem (figura 13 e 14).

O teor de humidade das leveduras excedentárias, observado durante três dias de exposição ao ar no interior diminuiu 10% (figura 14), apresentando ainda um valor de cerca de 70%, que consequentemente leva à deterioração microbiológica. Conclui-se que as leveduras excedentárias também não ficam estáveis com este método, pois não atingem um valor de humidade inferior a 16%. Outro facto que apoia esta conclusão é que, segundo dados da literatura, o teor de humidade da dreche deve ser de cerca de 10% para estar estabilizado e perlongar o seu armazenamento <sup>61</sup>.

### II.5.3.3 Secagem em corrente de ar forçada

Nesta metodologia os subprodutos estão sujeitos a uma corrente de ar forçada. Tendo em conta a rápida deterioração dos subprodutos durante a secagem, nesta secagem testou-se a adição de anidrido sulfuroso (figura 15). Esta abordagem surge como uma alternativa para evitar a deterioração microbiológica durante um processo bastante lento de secagem, pois trata-se de um composto com propriedades antissépticas <sup>54</sup>. Este composto também é um subproduto da indústria vinícola, enquadrando-se assim no contexto desta dissertação.



**Figura 15:** Teor de humidade das amostras no tempo 0 e ao fim de 7 dias dos subprodutos sujeitos ao ar com adição de sulfuroso, em que A corresponde a 0 ppm de sulfuroso adicionado, B corresponde a 12 ppm de sulfuroso adicionado e C corresponde a 24 ppm de sulfuroso adicionado.

O teor de humidade dos subprodutos, ao fim dos sete dias, apresenta um valor de humidade de 11,2% para a dreche, 12,6% para o lúpulo residual/*hot trub* e 15,0% para as leveduras excedentárias. Estes valores são bastante inferiores aos valores obtidos anteriormente por secagem ao ar, apresentando valores que podemos inferir uma  $a_w$  baixa, próxima da estabilização microbiológica<sup>50,61</sup>. Estes produtos ao fim de 7 dias continuaram em excelentes condições visuais. Assim sendo, este método de secagem, a corrente de ar forçada, é o melhor método para a secagem de subprodutos. Em relação ao pré-tratamento

químico (adição de sulfuroso), também apresentou resultados semelhantes, mesmo existindo um aumento inicial da percentagem de humidade (figura 15).

Durante as secagens a redução do teor de humidade deve ser feita sem por em causa os compostos de valor acrescentado dos subprodutos, pois são importantes para uma posterior valorização. Assim sendo, é de salientar que em todas as secagens a baixa temperatura utilizada privilegia a conservação das proteínas e polissacarídeos (temperatura ambiente), ou seja, não é superior a 80°C onde a desnaturação é irreversível, e consequentemente perde as suas funções biológicas <sup>62</sup>. No entanto, uma temperatura 50 - 60°C promove também a desnaturação destes compostos, só que de forma reversível <sup>63</sup>.

### III. Conclusão

Na empresa Essência D'Alma, uma microcervejeira, os subprodutos identificados foram a dreche, o lúpulo residual/ *hot trub* e leveduras excedentárias. Adicionalmente quantificou-se que por produção, a empresa Essência D'Alma, produz por hL de cerveja produzida, em média, 28 kg de dreche, 6,4 L de lúpulo residual/ *hot trub* e 1,7 L de leveduras excedentárias, sendo que em 2018 a empresa efetuou 113 produções.

A nível da gestão de resíduos, o plano de ação implementado na empresa demonstrou resultados positivos.

Este trabalho focou-se na secagem como uma possível alternativa à estabilização dos subprodutos, sendo que foram testadas três metodologias de secagens ao ar: secagem no exterior, secagem no interior e secagem em corrente de ar forçada com e sem pré-tratamento químico (adição de anidrido sulfuroso). Dos resultados obtidos o melhor método de secagem é o uso de uma corrente de ar forçada nos subprodutos, não só apresenta a maior redução no teor de humidade em comparação com os outros dois métodos de secagem, como os subprodutos ficaram estabilizados. O teor de humidade nesta metodologia, apresenta valores entre 11 e 15%, resultando em subprodutos estabilizados. Este foi o único método em que permitiu uma redução do teor de humidade sem uma contaminação microbiana visível a olho nu. No entanto é necessário transpor esta metodologia da realidade laboratorial para o contexto de fábrica para tirar conclusões mais fundamentadas. A adição de anidrido sulfuroso também mostrou ser uma alternativa viável à conservação dos subprodutos. No entanto, é necessário combinar o uso do sulfuroso com a secagem ao ar no exterior e no interior de forma a promover a conservação dos subprodutos durante o período de secagem.

Visando a valorização destes subprodutos, tendo em conta a sua composição, nomeadamente o valor nutricional da dreche e das leveduras aliado ao possível efeito antimicrobiano dos compostos presentes do lúpulo residual, estes podem ser usados como ingredientes em rações. Futuramente, a venda dos subprodutos estabilizados a empresas de produção de alimentos compostos para animais é uma opção viável.

#### IV Referências Bibliográficas:

1. Nelson, M. *The Barbarian's Beverage: a History of Beer in Ancient Europe*. *Animal Behaviour* **69**, (Routledge, 2005).
2. Barth-Haas Group. The Barth Report 2015-2016. 32 (2016). doi:53093-1505-1002
3. Dados económicos do setor Cervejeiro. Available at: [https://www.cervejeirosdeportugal.pt/dados\\_economicos/](https://www.cervejeirosdeportugal.pt/dados_economicos/). (Accessed: 16th October 2018)
4. Consumo de cerveja em Portugal cresceu 8% em 2017 - Comércio - Jornal de Negócios. Available at: <https://www.jornaldenegocios.pt/empresas/comercio/detalhe/consumo-de-cerveja-em-portugal-cresceu-8-em-2017>. (Accessed: 24th January 2019)
5. Ghisellini, P., Cialani, C. & Ulgiati, S. A review on circular economy: The expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *J. Clean. Prod.* **114**, 11–32 (2016).
6. Economia, D. & Agricultura, Do Desenvolvimento Rural e Das Pescas, M. Portaria n.o 1/96. in *Diário da República* 320–321 (1996).
7. Wunderlich, Sascha; Back, W. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. in *Beer in Health and Disease Prevention* (ed. Preedy, V. R.) 3–16 (Academic Press, 2008).
8. Food Composition Databases Show Foods -- Alcoholic beverage, beer, regular, all. Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/14003?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=beer&ds=SR&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>. (Accessed: 17th October 2018)
9. Simpson, B. K. ; *Food Biotechnology and Food Processing*. (Wiley-Blackwell, 2012).
10. *Hordeum vulgare* L. — The Plant List. Available at: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-419563>. (Accessed: 23rd October 2018)
11. Gupta, M., Abu-Ghannam, N. & Gallagher, E. Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **9**, 318–328 (2010).
12. Bamforth, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **8**, 161–176 (2017).
13. Sinha, A. K., Kumar, V., Makkar, H. P. S., De Boeck, G. & Becker, K. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chem.* **127**, 1409–1426 (2011).
14. *Humulus* — The Plant List. Available at: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Cannabaceae/Humulus/>. (Accessed: 25th October 2018)
15. Boaventura, J. *Optimização do Processo de Filtração de Cerveja*. (Universidade do Porto, 2009). Tese de Mestrado.
16. Dūdėnas, M., Kaškonienė, V., Maruška, A., Ragažinskienė, O. & Obelevičius, K. Biologically Active Compounds of Hop (*Humulus lupulus* L.) Plant and Cones. 79 (2012).
17. Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K. & Becker, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *J. Inst. Brew.* **120**, 289–314 (2014).
18. Baker, G. A., Danenhower, T. M., Force, L. J., Petersen, K. J. & Betts, T. A. HPLC Analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Acids in Hops. *J. Chem. Educ.* **85**, 954 (2008).

19. Alsteens, D. *et al.* Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM. *Nanotechnology* **19**, (2008).
20. Michael T. Madigan; John M. Martinko; *Microbiologia De Brock*. (Pearson, 2016).
21. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T. & Vicente, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1937–1949 (2014).
22. Kourtis, L. K. Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the non-alcoholic beverage industry. *Food Rev. Int.* **17**, 451–486 (2001).
23. Linko, Matti; Haikara, Auli; Ritala, Anneli; Penttila, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Mars. Med.* **103**, 215–217 (1966).
24. Faria-oliveira, F., Puga, S. & Ferreira, C. *Yeast : World ' s Finest Chef*. Intechopen.Com (IntechOpen, 2013).
25. De Keukeleire, D. Fundamentals Of Beer And Hop Chemistry. *Quim. Nova* **23**, 108–112 (2000).
26. Willaert, R. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. *Handb. Food Prod. Manuf.* 443–507 (2007). doi:10.1002/9780470113554.ch20
27. Mattanna, C. S. Efeito Do Trans-2-Nonenal Na Qualidade Sensorial Da Cerveja. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010). Tese de Mestrado.
28. Reinold, M. R. *Manual prático de cervejaria*. (ADEN Editora e Comunicações Ltda., 1997).
29. Bamforth, C. W. Chemistry of Brewing. in *Brewing* (ed. Bamforth, C. W.) 440–447 (Woodhead Publishing, 2006).
30. Craft Beer & Brewing: Whirlpooling, The Tea Leaf Paradox. Available at: <https://beerandbrewing.com/whirlpooling-the-tea-leaf-paradox/>. (Accessed: 7th November 2018)
31. Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C. & Pi??kur, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* **14**, 826–832 (2014).
32. Gresser, A. Stability of Beer. in *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets* (ed. Michael Eßlinger, H.) 399–435 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2009). doi:10.1002/9783527623488.ch16
33. Olajire, A. A. The brewing industry and environmental challenges. *J. Clean. Prod.* **23**, 1–21 (2012).
34. Pintado, M. E & Teixeira, J. Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Bol. Biotecnol.* **6**, 10–12 (2015).
35. Sousa, M. A. P. R. de S. Diário da República, 2.<sup>a</sup> série — N.º 113 — 14 de Junho de 2011. *Diário da República* 25118–25120 (2011). doi:10.1016/j.apnum.2013.03.003
36. APA - Políticas; Resíduos; Gestão de Resíduos. Available at: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=254>. (Accessed: 7th May 2019)
37. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Decreto-Lei nº 73/2011. *D.R. 1ª série* 3251–3300 (2011).
38. Mussatto, S. I. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (eds. Nee Nigam, S. ; & Pandey, A.) 314–324 (Springer, Dordrecht, 2009). doi:10.1007/978-1-4020-9942-7

39. Mussatto, S. I., Dragone, G. & Roberto, I. C. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal Sci.* **43**, 1–14 (2006).
40. Mussatto, S. I. Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 1264–1275 (2014).
41. Skendi, A., Harasym, J. & Galanakis, C. M. Recovery of high added-value compounds from brewing and distillate processing by-products. in *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products* (ed. Galanakis, C.) 189–225 (Woodhead Publishing, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-102162-0.00007-1
42. Vieira, E. *et al.* Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Ind. Crops Prod.* **52**, 136–143 (2014).
43. Kerby, C. & Vriesekoop, F. An Overview of the Utilisation of Brewery By-Products as Generated by British Craft Breweries. *Beverages* **3**, 24 (2017).
44. Bedini, S., Flamini, G., Girardi, J., Cosci, F. & Conti, B. Not just for beer: evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. *J. Pest Sci. (2004)*. **88**, 583–592 (2015).
45. Pinto, M., Coelho, E., Nunes, A., Brandão, T. & Coimbra, M. A. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. *Carbohydr. Polym.* **116**, 215–222 (2015).
46. Bastos, R., Coelho, E. & Coimbra, M. A. Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. *Carbohydr. Polym.* **124**, 322–330 (2015).
47. Shin, M. S., Lee, S., Lee, K. Y. & Lee, H. G. Structural and Biological Characterization of Aminated-Derivatized Oat  $\beta$ -Glucan. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 5554–5558 (2005).
48. Križková, L., Ďuračková, Z., Šandula, J., Sasinková, V. & Krajčovič, J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **497**, 213–222 (2001).
49. Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P. & Daufin, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J. Clean. Prod.* **14**, 463–471 (2006).
50. Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. *Food chemistry. Food Chemistry* (Springer, 2009). doi:10.1007/978-3-540-69934-7
51. Labuza, T. P. & Dugan, L. R. Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Crit. Rev. Food Technol.* **2**, 355–405 (1971).
52. El-Sebaili, A. A. & Shalaby, S. M. Solar drying of agricultural products: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**, 37–43 (2012).
53. Mokapane, F. M., Fawole, O. A. & Opara, U. L. Strategies to preserve quality and extend shelf life of dried fruits and vegetables: A review. *Acta Hortic.* **1201**, 99–106 (2018).
54. Thakur, N. S., Bhat, M. M., Rana, N. & Joshi, V. K. Standardization of pre-treatments for the preparation of dried arils from wild pomegranate. *J. Food Sci. Technol.* **47**, 620–625 (2010).
55. Tempo em Abril em Oliveira de Azeméis 2019 - Previsão AccuWeather para Aveiro Portugal (PT-PT). Available at: <https://www.accuweather.com/pt/pt/oliveira-de-azemeis/271925/april-weather/271925>. (Accessed: 12th July 2019)
56. Tempo mensal em Oliveira de Azeméis - Previsão AccuWeather para Aveiro Portugal (PT-PT).

Available at: <https://www.accuweather.com/pt/pt/oliveira-de-azemeis/271925/month/271925?monyr=5/01/2019>. (Accessed: 20th July 2019)

57. Miller, R. Food Analysis. *Am. J. Public Heal. Nations Heal.* **31**, 1096–1097 (2008).
58. Pinheiro, Luísa; Carreira, L. *Guia de Acompanhamento da Gestão de Resíduos*. (2009).
59. Comissão Europeia. Decisão da Comissão de 18 de dezembro de 2014, 2014/955/UE, que atualiza a Lista Europeia de Resíduos. *J. Of. da União Eur.* **370**, 44–86 (2014).
60. Portaria nº 145/2017 de 26 de Abril. Definição das Regras Aplicáveis ao Transporte Rodoviário, Ferroviário, Fluvial, Marítimo e Aéreo de Resíduos em Território Nacional e Criação das Guias Eletrónicas de Acompanhamento de Resíduos (e-GAR). *Diário da República* **1**, 2052–2056 (2017).
61. Lynch, K. M., Steffen, E. J. & Arendt, E. K. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* **122**, 553–568 (2016).
62. Matsuura, Y. *et al.* Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100°C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Sci. Rep.* **5**, 1–9 (2015).
63. Pathak, J. P., Macmillan, R. H., Evans, D. G. & Murray, D. R. The effects of temperature on the retention and denaturation of protein in lucerne leaves subjected to mechanical dewatering. *J. Sci. Food Agric.* **29**, 835–838 (1978).

## V Anexos

### Anexo 1:

**Tabela 1:** Registo do volume (L) e da densidade (g/ L) da dreche durante as produções do mês de Outubro de 2018.

<b>Dreche</b>	<b>Data</b>	<b>Volume (L)</b>	<b>Densidade (g/L) *</b>
	02/10/2018	423	733
	02/10/2018	296	854,3
	03/10/2018	260	859,67
	03/10/2018	313	792
	04/10/2018	455	717,68
	17/10/2018	406	720,33
	18/10/2018	341	788,33
	18/10/2018	297	840
	19/10/2018	318	795,68
	19/10/2018	334	798
	20/10/2018	357	705,33
	30/10/2018	389	866,33
	30/10/2018	367	870,68
	31/10/2018	304	886,33
31/10/2018	348	855,67	
<b>Média</b>		<b>347,2</b>	<b>805,56</b>

**Tabela 2:** Registo da massa (g) de 1 L de dreche para determinar a densidade (g/ L) durante as produções do mês de Outubro de 2018.

<b>Data</b>	<b>Massa 1 (g)</b>	<b>Massa 2 (g)</b>	<b>Massa 3 (g)</b>
02/10/2018	760	724	715
02/10/2018	825	867	871
03/10/2018	817	892	870
03/10/2018	802	795	779
04/10/2018	724	718	711
17/10/2018	699	728	734
18/10/2018	787	802	776
18/10/2018	841	823	856
19/10/2018	759	801	827
19/10/2018	767	829	798
20/10/2018	701	691	724
30/10/2018	842	891	866
30/10/2018	868	888	856
31/10/2018	875	905	879
31/10/2018	890	843	834

**Tabela 3:** Registo do volume (L) do lúpulo residual/ *hot trub* durante as produções do mês de Outubro de 2018.

Lúpulo/ <i>Hot Trub</i>	<b>Data</b>	<b>Volume (L)</b>
	02/10/2018	57,79
	02/10/2018	57,79
	03/10/2018	74,31
	03/10/2018	82,56
	04/10/2018	59,45
	17/10/2018	61,09
	18/10/2018	79,26
	18/10/2018	84,22
	19/10/2018	47,89
	19/10/2018	51,19
	20/10/2018	61,09
	30/10/2018	54,49
	30/10/2018	67,70
	31/10/2018	62,75
	31/10/2018	63,27
<b>Média</b>		<b>64,32</b>

**Tabela 4:** Registo do volume (L) das leveduras excedentárias durante as purgas a 50 % da fermentação do mês de Outubro de 2018.

Leveduras (purga 50% fermentação)	<b>Data</b>	<b>Volume (L)</b>
	08/10/2018	17,711
	08/10/2018	17,711
	08/10/2018	17,899
	19/10/2018	16
	19/10/2018	16
	22/10/2018	18,678
	24/10/2018	16
	02/11/2018	19,331
	02/11/2018	16
<b>Média</b>		<b>17,238</b>

**Tabela 5:** Registo do volume (L) das leveduras excedentárias durante as purgas finais da fermentação do mês de Outubro de 2018.

Leveduras (purga 100% fermentação)	<b>Data</b>	<b>Volume (L)</b>
	12/10/2018	16
	12/10/2018	16
	15/10/2018	18
	22/10/2018	16
	23/10/2018	19,02
	26/10/2018	18,345
	30/10/2018	17,276
	05/11/2018	16
	05/11/2018	16
<b>Média</b>		<b>16,960</b>

**Anexo 2:**

**Tabela 1:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da primeira secagem (03 a 05 de Abril de 2019) ao ar no exterior da dreche.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	5,700 kg	1,033 kg			
	4,100 kg	0,082 kg	5,057 kg	- 0,957 kg	-16,79
<b>Dia 2</b>	2,300 kg	0,164 kg	4,018 kg	- 1,718 kg	-30,14
	2,100 kg	0,064 kg	2,136 kg	- 0,036 kg	-0,63
<b>Dia 3</b>	2,080 kg		2,036 kg	+ 0,044 kg	0,77
	2,100 kg	0,045 kg	2,080 kg	+ 0,02 kg	0,35

**Tabela 2:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da primeira secagem (03 a 05 de Abril de 2019) ao ar no exterior ao natural do lúpulo residual/*hot trub*.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	1,500 kg	0,268 kg			
	1,450 kg	0,075 kg	1,500 kg	-0,05 kg	-3,33
<b>Dia 2</b>	2,800 kg	0,033 kg	1,375 kg	+1,425 kg	95
	2,900 kg	0,245 kg	2,767 kg	+0,133 kg	8,87
<b>Dia 3</b>	2,700 kg	0,023 kg	2,655 kg	+0,045 kg	3
	2,800 kg	0,035 kg	2,677 kg	+0,123 kg	8,2

**Tabela 3:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da segunda secagem (16 a 18 de Abril de 2019) ao ar no exterior ao natural da dreche.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	6,00 kg	0,043 kg			
	5,500 kg	0,190 kg	6,000 kg	-0,5 kg	-8,33
<b>Dia 2</b>	5,400 kg	0,066 kg	5,310 kg	+0,09 kg	1,5
	5,300 kg	0,272 kg	5,334 kg	-0,034 kg	-0,57
<b>Dia 3</b>	4,800 kg	0,241 kg	5,028 kg	-0,228 kg	-3,8
	4,700 kg	0,135 kg	4,559 kg	+0,141 kg	2,35

**Tabela 4:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da segunda secagem (16 a 18 de Abril de 2019) ao ar no exterior ao natural do lúpulo residual/ *hot trub*.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	2,800 kg	0,098 kg			
	2,800 kg	0,165 kg	2,800 kg	0 kg	0
<b>Dia 2</b>	2,500 kg	0,037 kg	2,635 kg	-0,135 kg	-4,82
	2,400 kg	0,097 kg	2,463 kg	-0,063 kg	-2,25
<b>Dia 3</b>	2,500 kg	0,166 kg	2,303 kg	+0,197 kg	7,03
	2,000 kg	0,017 kg	2,334 kg	-0,334 kg	-11,93

**Anexo 3:**

**Tabela 1:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da primeira secagem no interior de leveduras excedentárias.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	3,300 kg	0,109 kg			
	2,700 kg	0,098 kg	3,300 kg	-0,6 kg	-18,18
<b>Dia 2</b>	2,700 kg	0,060 kg	2,602 kg	+ 0,098 kg	2,97
	2,500 kg	0,051 kg	2,440 kg	+ 0,06 kg	1,81
<b>Dia 3</b>	2,300 kg	0,011 kg	2,249 kg	+ 0,051 kg	1,55
	2,000 kg	0,019 kg	1,989 kg	+ 0,011 kg	0,33

**Tabela 2:** Dados referentes à massa total, à massa das amostras e diferença de massa ao longo do tempo da segunda secagem no interior de leveduras excedentárias.

	<b>1ª Medição</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Anterior</b>	<b>Diferença de Massa</b>	<b>Diferença de Massa (%)</b>
<b>Dia 1</b>	2,300 kg	0,109 kg			
	2,300 kg	0,098 kg	2,300 kg	0 kg	0
<b>Dia 2</b>	2,300 kg	0,060 kg	2,240 kg	+0,06 kg	2,61
	2,000 kg	0,051 kg	1,940 kg	+0,06 kg	2,61
<b>Dia 3</b>	2,000 kg	0,006 kg	1,945 kg	+ 0,055 kg	2,39
	1,800 kg	0,008 kg	1,794 kg	+ 0,006 kg	0,26