

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Revalorização de bolachas descartadas

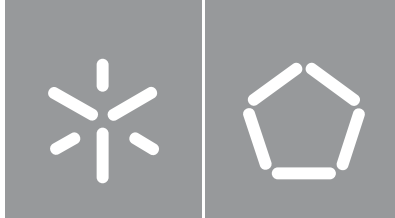
Carla Inês Dias Ferreira das Dores

UMinho|2022

Carla Inês Dias Ferreira das Dores

**Revalorização de bolachas
descartadas**

outubro de 2022



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Carla Inês Dias Ferreira das Dores

Revalorização de bolachas descartadas

Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química e Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor José António Teixeira

outubro de 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

***Licença concedida aos utilizadores do trabalho
Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)***



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Este projeto de revalorização de bolachas em etanol resulta no desafio apresentado pela empresa Vieira de Castro, de modo a resolver o seu problema de bolachas descartadas e ajudando na prevenção e proteção contra o COVID. Para isto foi necessário a colaboração com o Centro de Engenharia Biológica, onde a dita investigação se realizou, e por isto dedico esta secção para agradecer a todas as partes envolvidas e a todas as pessoas que me ajudaram ao longo deste trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à empresa Vieira de Castro, por dar a oportunidade de realizar este projeto. Também gostaria de agradecer ao Centro de Engenharia Biológica, em concreto o Laboratório de Fermentações que me acolheu e foi vital no decorrer do projeto. Dentro deste laboratório gostaria de agradecer especialmente ao doutor Eduardo Coelho que me supervisionou e ajudou a trabalhar no laboratório, tal como todas as pessoas que me ajudaram quando estava com dificuldades, como o vice-diretor do Laboratório de Fermentações, Eduardo Gudiña. Adicionalmente estou grata pela orientação e aconselhamento do professor José António Teixeira, que respondeu a todas as minhas dúvidas.

Finalmente, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram, ao longo deste tempo todos, sendo estes os meus amigos, tal como os meus colegas de curso.

Dedico esta dissertação à minha família que me apoiou e que esteve sempre comigo durante este tempo todo.

A todos, obrigado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

Revalorização de bolachas

De acordo com a FAO, cerca de um terço da produção alimentar é desperdiçada. Estes resíduos, conseguem lixiviar, apresentando um risco ambiental, e para a saúde humana.

A Vieira de Castro produz cerca de 600 toneladas de resíduos anualmente, podendo dobrar a sua quantidade nos anos seguintes. Ao mesmo tempo, a propagação do vírus SARS-CoV2, tem-se mostrado um problema para a saúde humana, sendo os desinfetantes à base de álcool, um método de prevenção e proteção pessoal contra este vírus. Assim, de modo a solucionar o problema das suas bolachas descartadas e a fornecer métodos de prevenção contra o coronavírus, a Vieira de Castro, lançou o desafio de propor um método para revalorizar as bolachas descartadas numa solução de 70 % de etanol.

O método de revalorização destas consistiu numa liquefação, seguida por uma sacarificação e fermentação, destilando depois o etanol produzido. Adicionalmente, procurou-se otimizar o processo, fazendo um *scale-up*, tal como recuperar a gordura presente nas bolachas.

As condições ótimas obtiveram-se a uma concentração de solução de 450 g/L, onde a liquefação ocorreu a 95 °C, durante 2 h e a sacarificação ocorreu a 60 °C durante 48 h. Obteve-se no *scale-up*, soluções de etanol de 9 % a 12 % (v/v), requerendo uma 2ª fermentação, durando cerca de 180 horas, a 37 °C e a pH 4,5 a 5. Depois das destilações, obteve-se soluções de 110mL com 73 % de etanol em média. Houve também uma recuperação de gordura das soluções obtendo 48 % de eficiência de recuperação, em média. Calcularam-se que, para 600 t de bolachas descartadas, produziam-se 128,3 t de etanol, obtendo 0,214 t de etanol por t de bolacha processada. Recuperou-se 0,114 g de gordura por g de bolacha, obtendo 68 t de gordura anualmente para o caso referido.

Palavras-chave: bolachas, etanol, fermentação alcoólica, gordura, hidrólise enzimática.

Abstract

Revalorization of cookie wastes

According to the FAO, about one-third of the world's food production is lost or wasted. This waste is biodegradable, and they can leach, posing an environmental risk and being a danger for human health.

The company *Vieira de Castro* makes about 600 t of discarded cookies annually and this value may double in the years that follow. At the same time, the transmission of the SARS-CoV2 virus has become a problem for human health in the which the use of alcohol-based hand sanitizers as well as surface disinfectants prevent the spread of the virus and offer a means of personal protection against it.

To solve their waste problem and to provide a means of protection against COVID-19, *Vieira de Castro* has challenged to propose a method to convert their cookie waste into a 70 % ethanol solution.

The method proposed consists in a liquification, a saccharification and the fermentation, then a distillation of the ethanol. Additionally, this method was optimized and *upscaled*, consisting also in a recovery of the lipids (fat) in the solutions.

The optimal conditions were obtained with a concentration of 450 g/L, the liquification occurred at a temperature of 95 °C for 2 h and the saccharification happened at 60 °C, during 48 h. In the scale-up, solutions with 9 to 12 % (v/v) were obtained, requiring a second fermentation, in which both lasted about 180 h, at 37 °C and a pH of 4-4,5. After distilling, solutions of 110 mL, with 73% of ethanol were obtained. As required, there was a recuperation of fat, with an efficiency of 48 %. In the end, 0,214 t of ethanol per t of processed cookie, were obtained and 0,114 t of fat per t of cookies were recovered, producing annually 68,235 t of fat and 128,299 t of ethanol, for 600 t of annual cookie waste.

Keywords: alcohol fermentation, cookies, ethanol, fat, enzymatic hydrolysis.

Índice

Índice de figuras	11
Índice de tabelas	13
Lista abreviaturas, siglas e variáveis	16
Capítulo 1. Contextualização e motivação	18
1.1. O problema de produtos alimentares descartados	18
1.2. A indústria alimentar	20
1.3. Bolachas	21
1.4. Mercado Mundial e nacional de Bolachas	21
1.5. A Vieira de Castro e desafio proposto	23
1.6. Etanol e o mercado mundial de etanol	24
1.7. O COVID-19 e a utilização de desinfetantes de álcool	24
1.8. Aumento do interesse em bioetanol e procura de bioetanol e princípio do projeto	26
1.9. Objetivos	27
1.10. Estrutura da dissertação	28
Capítulo 2. Conceitos teóricos para a contextualização do processo	29
2.1. Amido	29
2.1.1. História da utilização do Amido	31
2.1.2. Inchaço dos grânulos de amido e gelatinização do amido	33
2.1.3. Lípidos e fosfolípidos no amido	34
2.2. Processos de hidrólise do amido	35
2.2.1. Métodos de hidrólise de milho industriais	36
2.3. Enzimas de liquefazem e sacarificam o amido	38
2.3.1. Utilização de α -amilases e liquefação do amido	39
2.3.2. Enzimas de convertem o amido em glucose	40

2.4. Fermentação de açúcares em etanol.....	41
2.4.1. Processo de fermentação de glucose em etanol	42
2.4.2. Tipos de fermentação.....	45
2.4.3. Modos de fermentação: <i>Batch</i> , <i>Fed-batch</i> e contínuo	46
2.5. Método de recuperação do etanol: Destilação	48
2.6. Extração de lípidos em soluções.....	49
2.6.1. Decantação.....	51
2.7. Quantificação de açúcares e etanol.....	52
2.7.1. Grau Brix ($^{\circ}Bx$)	52
2.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	52
Capítulo 3. Materiais e métodos	56
3.1. Materiais utilizados durante toda a experiência.....	56
3.2. Ensaio pré enzimáticos: Observação da matéria-prima ao aquecimento desta.....	57
3.3. Leitura de <i>Brix</i>	58
3.4. Ensaio enzimáticos Liquefação e sacarificação	59
3.5. Fermentação alcoólica da glucose obtida a partir das bolachas	62
3.6. Destilação	65
3.7. Recuperação da gordura: Decantação.....	67
3.9. Método de quantificação de amido/ glucose e de açúcares fermentáveis utilizados.....	69
Capítulo 4. Resultados e discussão	74
4.1. Ensaio iniciais de observação de comportamento da matéria-prima ..	74
4.2. Ensaio enzimáticos de liquefação e sacarificação	74
4.2.1. Otimização de condições de liquefação e sacarificação	75
4.2.2. Segundos ensaios de otimização das condições de hidrólise enzimática.....	76

4.2.3. Ensaio finais de otimização das condições de hidrólise (P31 e T31)	77
4.2.4. Influência do pH na liquefação e na sacarificação.....	78
4.3. Resultados de fermentação	79
4.3.1. Fermentação dos matrizes de T16 e P16	79
4.3.2. Fermentações das amostras T23 e P23	80
4.3.3. Fermentações de 31 de maio	82
4.3.4. Condições ótimas obtidas de hidrólise e fermentação.....	84
4.4. Resultados de ensaios scale up de 1 L.....	85
4.4.1. Requerimentos experimentais para “shots” de 1 L	85
4.5. Resultados destilação	90
4.6. Recuperação de gorduras.....	94
4.7. Cálculo de volumes anuais de solução e de gordura recuperados	96
Capítulo 5. Conclusões e sugestões futuras	98
Bibliografia.....	100
Anexos:	107
A1. Tabelas e Resultados experimentais adicionais	107
A.1.1. Tabelas de fermentação de <i>scale-up</i> de 1L	107
A.1.2. Resultados da 2ª fermentação	108
A.1.3. Tabelas de resultados de destilação de modo a criar os gráficos de destilações:	109
A.1.4. Frações de destilação e cálculo do volume total e a correspondente percentagem de álcool da solução final e o volume desta.....	111
A.1.5. Tabelas para realizar os cálculos de produção de etanol anual ...	114
A.1.6. Tabelas e gráficos para curvas de calibração para HPLC.	115
A.1.7. Tabelas de evolução de fermentação	117
A.2. Exemplos de cálculo	118

A.2.1. Cálculo concentração de etanol numa solução 15%(v/v)	118
A.2.2. Concentração de glucose necessária para a fermentação	118
A.2.3. Cálculo de bolacha necessária para obter a dita concentração de glucose.....	118
A.2.4. Cálculo da quantidade de cocktail enzimático	119
A.2.5. Cálculo de peso de massa de bolacha acordo com o grau de <i>brix</i>	119
A.2.6. Cálculo de açúcares fermentáveis por grau Brix	121
A.2.7. Cálculo de eficiência de sacarificação	121
A.2.8. Cálculo de volume de inóculo para rácio de (1:10) em volume....	121
A.2.9. Cálculo de volume de água a ocupar de modo a deixar $\frac{1}{3}$ de volume de um frasco de 1L	122
A.2.10. Cálculo de perda de CO_2	122
A.2.11. Cálculo de % glucose convertida para amostra de 31 de maio..	123
A.2.12. Cálculo de concentração de etanol e glucose obtida a partir de HPLC	123
A.2.13. Cálculo de % de etanol numa solução de etanol com uma certa concentração	124
A.2.14. Cálculo de gordura teórica presente nas bolachas (GT)	124
A.2.15. Cálculo de gordura presente nas soluções (GS).....	125
A.2.16. Cálculo eficiência de recuperação de gordura em %	125
A.2.17. Cálculo das toneladas de etanol produzidas anualmente	125
A.3. Fichas de segurança	127
A.3.1. Ficha de segurança <i>Clearflow AA</i>	127
A.3.2. Optimax 4060 VHP	132

Índice de figuras

Figura 1. Esquema da estrutura molecular de amilose (BeMiller et al., 1996).	30
Figura 2. Esquema da estrutura molecular de amilopectina (BeMiller et al., 1996).....	31
Figura 3. Refratômetro Brix, HANNA HI96801.	58
Figura 4. Medição do peso das bolachas descartadas.	60
Figura 5. Modelo de liquefação de bolachas descartadas.	61
Figura 6. Exemplo de uma incubadora onde se irá realizar o crescimento das <i>S.cerevisiae</i>	63
Figura 7. Modelo de um fermentador em condições anaeróbias.....	64
Figura 8. Sistema de destilação da solução obtida pela fermentação.	65
Figura 9. Falcon com o etanol destilado.....	66
Figura 10. Pesagem dos gobelets sem gordura.	67
Figura 11. Frascos para centrifugação.....	68
Figura 12. Esquema de decantação.	68
Figura 13. Solução-padrão usada para HPLC.	70
Figura 14. Fase Móvel contendo 0,05 mol/L de H ₂ SO ₄ para HPLC.....	71
Figura 15. Cromatógrafo de HPLC, com (da esquerda para a direita) uma bomba isocrática, autosampler, coluna de troca iônica e detetores UV e RI.....	72
Figura 16. CO ₂ libertado ao longo do tempo das amostras de T16 e P16.....	79
Figura 17. CO ₂ libertado ao longo do tempo pelas amostras T23 e P23.....	81
Figura 18. Comparação das fermentações das amostras T23 e P23 e das amostras T31 e P31.	82
Figura 19. CO ₂ libertado na fermentação das amostras T20, T21, P20 e P21.	87
Figura 20. Evolução do CO ₂ libertado na refermentação do "shot" de 1 L.....	88
Figura 21. Falcons com as 14 frações de aproximadamente 10 mL de destilação de etanol.	90
Figura 22. Teor de álcool por volume destilado da amostra T20.....	91
Figura 23. Teor de álcool por volume destilado da amostra P20.....	91
Figura 24. Gráfico de teor de álcool por volume destilado da amostra T21. ..	92
Figura 25. Gráfico de teor de álcool por volume destilado da amostra P21. ..	92

Figura 26. Gobelés com gordura recuperada e respectivas amostras.....	95
Figura A.1. Reta de calibração de concentração de glucose por área no cromatograma.....	116
Figura A.2. Reta de calibração de concentração de etanol por área no cromatograma.....	116

Índice de tabelas

Tabela 1. Informação calórica sobre as amostras de bolachas providas pela Vieira de Castro.....	57
Tabela 2. Quantidade de matéria-prima e enzimas para os ensaios iniciais.....	60
Tabela 3. Resultados das sacarificações iniciais de 9 a 13 de maio.....	74
Tabela 4. Correlação do valor de °Bx com a massa de bolacha e o rácio bolacha/água usado.....	75
Tabela 5. Resultados da sacarificação das amostras P16 e T16.....	76
Tabela 6. Resultados das sacarificações das amostras T23, P23 e P24.....	76
Tabela 7. Resultados de sacarificação de ensaios T31 e P31 variando o tempo de contacto da enzima.....	77
Tabela 8. Resultados da hidrólise enzimática com monitorização do pH.....	78
Tabela 9. Resultados de fermentações das amostras T16 e P16.....	80
Tabela 10. Resultados das fermentações T23 e P23.....	81
Tabela 11. Resultados das hidrólises enzimáticas e fermentações das experiências realizadas.....	83
Tabela 12. Condições ótimas obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática....	84
Tabela 13. Resultados da sacarificação do “upscaling”.....	85
Tabela 14. Resultados da fermentação de upscale de 1L.....	88
Tabela 15. Concentrações de etanol e teor de etanol em v/v das 2 ^{as} fermentações.....	89
Tabela 16. Teor de álcool e volume finais dos ensaios experimentais.....	93
Tabela 17. Resultados gerais de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica.....	94
Tabela 18. Resultados das decantações e recuperação de gorduras.....	95
Tabela 19. Média de Recuperação de etanol para 600 toneladas de bolachas descartadas.....	96
Tabela 20. Média de Recuperação de etanol para 1200 toneladas de bolachas descartadas.....	97
Tabela A.1. Dados da fermentação de T20 ao longo do tempo.....	107
Tabela A.2. Dados da fermentação de P20 ao longo do tempo.....	107
Tabela A.3. Dados da fermentação de T21 ao longo do tempo.....	107

Tabela A.4. Dados da fermentação de P21 ao longo do tempo.	108
Tabela A.5. Dados da 2ª fermentação de T20 (massa das amostras, peso de CO ₂ e horas passadas).....	108
Tabela A.6. Dados da 2ª fermentação de T21 (massa das amostras, peso de CO ₂ e horas passadas).....	108
Tabela A.7. Dados da 2ª fermentação de P20 (massa das amostras, peso de CO ₂ e horas passadas).....	108
Tabela A.8. Dados da 2ª fermentação de P21 (massa das amostras, peso de CO ₂ e horas passadas).....	109
Tabela A.9. Resultados gerais da 2ª fermentação das amostras de 1 L.	109
Tabela A.10. Volume destilado e as percentagens de álcool T20, de modo a obter o gráfico da Figura 22.....	109
Tabela A.11. Volume destilado e as percentagens de álcool T21, de modo a obter o gráfico da Figura 23.....	110
Tabela A.12. Volume destilado e as percentagens de álcool P20, de modo a obter o gráfico da Figura 24.....	110
Tabela A.13. Volume destilado e as percentagens de álcool P21, de modo a obter o gráfico da Figura 25.....	111
Tabela A.14. Frações da amostra T20 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.....	112
Tabela A.15. Frações de T21 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.....	112
Tabela A.16. Frações de P20 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.....	113
Tabela A.17. Frações de P21 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.....	113
Tabela A.18. Gordura recuperada e eficiências de recuperação.	114
Tabela A.19. Gordura recuperada anualmente para caso de 600 toneladas de bolachas descartadas.	114
Tabela A.20. Volume de água utilizado nos "scale-ups" tal como as massas de bolachas e a quantidade de etanol obtido para calcular as taxas de produção de álcool e recuperação de gordura.	114

Tabela A.21. Volumes finais de solução de 70 % do scale-up” para 1L e as respectivas concentrações(v/v) de etanol, tal como as gramas de etanol produzidas por grama de matéria-prima e ml de etanol por g de bolacha...	115
Tabela A.22. Concentrações de glucose das soluções-padrão com a área calculada de glucose cromatograma.....	115
Tabela A.23. Concentrações de etanol das soluções-padrão com a área calculada de glucose cromatograma.....	115
Tabela A.24. Evolução dos pesos do fermentador da fermentação das amostras P16.....	117
Tabela A.25. Evolução da quantidade de CO ₂ libertada (g) ao longo do tempo para as fermentações das amostras P23 e T23.....	117
Tabela A.26. Evolução da quantidade de CO ₂ libertada (g) ao longo do tempo para as fermentações das amostras P31 e T31.....	117
Tabela A.27. Concentração de bolacha g/L com o respetivo brix e a glucose obtida.	119
Tabela A.28. Quantidade de Optimax em µL utilizados nas sacarificações e açúcares reais e teóricos respetivos	120

Lista abreviaturas, siglas e variáveis

CO_2 - Dióxido de Carbono

μL - Microlitros

AF- Açúcares fermentáveis

B/A- Rácio de bolacha e água numa solução aquosa de bolachas descartadas

B/A- Razão massa de bolacha processada com volume de água utilizada

BD- Bolacha descartada

BP- Bolacha Processada

$C_6H_{12}O_6$ -Glucose

CAGR - *Compound annual growth rate*

CDC/CCPD- *Centers for Disease Control and Prevention*/Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

CEt- Concentração de etanol

CGR- Concentração de Glucose Restante

CGS- Concentração de Glucose obtida na sacarificação

CGT- Concentração de Glucose Teórica presente nas bolachas

CG- Percentagem de Conversão de Glucose em Etanol e CO_2 , na fermentação

Da- Medida de peso molecular ou massa molecular (Dalton).

EPA- Etanol Produzido Anualmente

ER- " Etanol Red"

ES- Eficiência de sacarificação

EtOH- Etanol

FAO- Food and Agriculture Organization

FW/CD- Food Waste/ Comida desperdiçada

GRA-Gordura recuperada anualmente

GR-Gordura recuperada

HPLC/CLAE- *High Performance Liquid Chromatography*/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Kg- quilogramas

L- Litros

mL- Mililitros

NAD - Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida.

°B- Valor de *Brix*

RL- Razão de volume de suspensão de levedura por volume de solução a inocular

TRE- Taxa de recuperação de etanol

TRG- Taxa de recuperação de gordura

USD-Dólares americanos

VHG- Very High Gravity Fermentation

WHO/OMS- *World Health Organization*/Organização Mundial de Saúde

YPD- *Yeast Extract-Peptone-D-glucose*.

Capítulo 1. Contextualização e motivação

1.1. O problema de produtos alimentares descartados

De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization*), o relatório de perdas de alimentos global e sobre desperdício alimentar de 2011, indica que cerca de um terço da comida produzida para consumo humano é perdida ou descartada, cerca de 1.3 biliões de toneladas por ano, significando que grandes quantidades de comida são utilizadas em vão. As emissões de gases de efeito estufa e os materiais utilizados para a produção alimentar de alimentos que são perdidos ou descartados são também usados em vão (Blakeney, 2019).

A matéria-prima de produtos alimentares, comida ou produtos alimentares são descartados ou perdidos ao longo da cadeia de produção/ ciclo de produção, desde a fase de produção agrícola, recolha da matéria-prima até ao consumidor final. Na seção de produtos vegetais, por exemplo, existem perdas na produção agrícola (por exemplo, perdas devido a dano mecânica da colheita de fruta ou derramamentos durante a colheita dos produtos), na fase após a colheita e consequente armazenamento da matéria prima (Perdas devido a degradação dos alimentos durante o armazenamento e transporte da quinta onde se colhe os vegetais e o local onde estes são distribuídos ou processados), durante o processamento destes produtos pode ocorrer perdas devido à sua danificação durante o processamento (por exemplo ocorrer derramamentos de matéria prima na produção de sumo ou na produção de pão). Na fase de distribuição dos produtos processados, os produtos podem ser perdidos ou desperdiçados no sistema mercantil, por exemplo, quando num supermercado as maçãs à venda não se encontram nos padrões de qualidade (em padrões de cosmética, não parecem frescas, por isso são descartadas). E finalmente na fase em que o produto se encontra no consumidor final este é descartado devido ao consumo a nível doméstico (Blakeney, 2019).

Em países com médio a alto salário os produtos alimentares são descartados nas fases finais da cadeia de produção, descartando alimentos que são adequados para consumo humano, ao contrário dos países menos

desenvolvidos, onde as perdas se encontram nas primeiras fases da cadeia de produção alimentar.

No entanto, nos países com maior industrialização há uma enorme perda de alimento nas fases iniciais e a meio do ciclo de produção alimentar, deste modo, de acordo com este estudo (Blakeney, 2019) há mais perdas alimentares por pessoa nos países mais industrializados, do que nos países em desenvolvimento, onde na Europa e na América do Norte a perda de alimentos *por capita*, é de 95 a 115 kg por ano enquanto que na região subsariana de África e no Sul e sudeste de Ásia são apenas perdidos 6 a 11 kg por ano, por pessoa (Blakeney, 2019).

Deste modo, a comida desperdiçada pode ser material alimentar não cozinhado, tal como material residual de comida já cozinhada e processada. A comida que é “desperdiçada” ou deitada fora representada uma grande parte dos resíduos sólidos municipais, onde na China representa cerca de 37 a 62 % dos resíduos sólidos municipais (RSM) e nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, tal com a Inglaterra representa cerca de 12 a 30 % dos RSM (Galanakis, 2012). A maior parte dos resíduos alimentares contêm água, tal como substâncias biodegradáveis (carboidratos, lípidos e proteínas) e minerais, podendo constituir sólidos voláteis (SV) (cerca de 80 % dos 12-34% sólidos totais nos resíduos alimentares. Como estes resíduos são maioritariamente líquidos, como anteriormente afirmado, estes resíduos contem 12 a 34 % de sólidos totais, e como contem substâncias biodegradáveis, estes são facilmente biodegradáveis, podendo ter vários usos, mas também tem um grande potencial de poluir o ambiente, podendo produzir lixiviados e outros componentes secundários, que são poluentes e também podendo ser uma ameaça para a saúde humana (Q. Wang et al., 2020).

Assim, de modo a evitar e diminuir este desperdício de comida é necessário informar os consumidores e adotar medidas de modo a evitar a produção de resíduos de comida ou reduzi-los (Q. Wang et al., 2020), haver um controlo mais exigente de modo a não haver perdas de produtos alimentares na indústria, mas também pensar em usos alternativos para o material descartado.

Uma das soluções alternativas para diminuir a quantidade de comida descartada será transformar este material descartado em produtos de interesse económico. Um exemplo para isto seria transformar desperdícios de produtos alimentares em etanol, a partir da fermentação destes.

1.2. A indústria alimentar

A indústria alimentar é uma das maiores indústrias do mundo, sendo avaliada em 8,66 triliões de dólares americanos (USD) em 2022, esperando um aumento de volume de vendas em 3,1% em 2023. O consumo mediano por pessoa é de 337,8 kg em 2022 (Statista, 2022), gerando cerca de 1 153.00 USD por capita. Dos segmentos do mercado mundial para comida, o segmento de confeitarias e de *snacks* foi o que mais vendeu, gerando 1.53 triliões USD em 2022.

Em 2020, havia 5 902 empresas alimentares em Portugal, gerando um volume de 13 315 milhões de euros, empregando 87 226 pessoas ao serviço. Cerca de 56,78% das empresas alimentares de Portugal são empresas de produtos de padaria e geraram 11,28% do volume de negócios (BPstat, 2022).

Em contexto nacional, de acordo com um estudo realizado na indústria alimentar de Portugal em 2020, a indústria alimentar e de bebidas é um dos fatores mais importantes na economia portuguesa, exportando em 2019 um total de 6,1 milhões de USD em produtos alimentares e importando 9,1 milhões de USD em produtos. A indústria alimentar é cada vez mais competitiva, procurando alternativas mais saudáveis, comidas à base de plantas/vegetais e apostando na sustentabilidade especialmente em termos de embalagem. Esta também procura ser mais eficiente no uso de energia e na gestão dos produtos descartados, como no caso do problema das bolachas descartadas (Report et al., 2021) que vai ser discutido a seguir.

1.3. Bolachas

As bolachas ou biscoitos são conhecidos na maioria dos países por serem pequenos produtos preparados comercialmente (cozidos) a partir de farinha, açúcar, gordura e água podendo ter também emulsificantes. As bolachas são diferentes dos outros produtos de pastelaria, como o pão ou bolos, uma vez que as bolachas têm um teor mais baixo de humidade e percentagem de água, que normalmente se situa nos 4% de modo a ter uma vida útil mais longa do que os produtos anteriormente mencionados. A maior parte das bolachas é feita a partir de farinha de trigo sendo o ingrediente principal das bolachas e o componente com mais relevância. Esta farinha tem normalmente um conteúdo em humidade de cerca de 14%, uma percentagem em proteína entre 7 e 9 % e um conteúdo de amido abaixo de 80 %, estando por volta dos 70 a 75 %. (Mamat & Hill, 2018). Assim, os biscoitos ou bolachas são constituídos principalmente por farinha, açúcar e gordura (por exemplo manteiga) (e lípidos), sendo os lípidos compostos em 2% a 4% em massa, do grão do trigo. As gorduras e óleos existem em quase todos os produtos na seção de pastelaria, as gorduras são ésteres de ácidos gordos e de glicerol que formam triglicerídeos nos quais três ácidos estão ligados a uma molécula de glicerol (Kaur et al., 2014).

As gorduras mais usadas em produtos de pastelaria são banha, gorduras de carne bovina e óleos vegetais. A manteiga é usada para adicionar sabor. O óleo de algodão e soja são os óleos vegetais processados mais comuns. Os óleos de milho, amendoim e coco são usados de forma limitada. Outros ingredientes como as gemas de ovos e chocolate contêm gordura (Mamat & Hill, 2018).

1.4. Mercado Mundial e nacional de Bolachas

De acordo com o estudo realizado pela *Million Insights* publicado em 2020, o mercado global de bolachas, em 2018, encontrou-se nos 30.62 bilhões de dólares (USD), sendo esperado um aumento a um *compound annual growth rate* (CAGR) de 5,3% de 2019 a 2025, sendo esperado em 2025, a partir de um estudo pela Grand View Research de com a mesma taxa de crescimento anual, o mercado global de bolachas um valor de 44.01 bilhões de USD (Grand View

Research, 2022), sendo a alta demanda de bolachas de chocolate em países como os EUA, Alemanha e Reino Unido, inovação nas embalagens, e lançando novos sabores, como por exemplo bolachas com sabor, um dos fatores para o crescimento deste mercado. Os maiores produtores de bolachas incluem as empresas *Danone S.A.*; *Britannia Industries Ltd.*; *The Kellogg Company*, *Parle Products Private Limited*, *Nestlé*, *United Biscuits*, *Pepsico Inc.* Em 2018, a região da América do Norte foi a região que dominou o mercado de bolachas, de acordo com o *Million Insights*. O maior foco por dietas saudáveis e a preocupação por doenças cardiovasculares, por exemplo, aumenta a procura de alternativas mais saudáveis. Assim as bolachas digestivas, em barras, são os tipos de bolacha que obtêm mais vendas mundialmente (Million Insights, 2020) (Business Insights, Fortune, 2021).

Em Portugal, as bolachas são o produto que representou, em 2018, 3% de todo o valor gerado pelos bens alimentares, de acordo com Eduardo Serra. Sendo as bolachas sem açúcar, sem sal e bolachas de pequeno almoço, representando 27% do volume de bolachas comercializado anualmente, correspondendo a 35% do valor gerado pela categoria, enquanto que as bolachas maria, tarteletes, de chocolate, as de manteiga, recheadas, correspondem a 73% do volume vendido, dominando o mercado, de acordo com Serra (2018).

A partir do Instituto Nacional de Estatística (INE), a secção de fabricação de bolachas, biscoitos, tostas e pastelaria de conservação vendeu 126 549 toneladas de bolachas em 2019 (Agropress, 2020), gerando 296 767 000 euros (Portal do INE, 2020). De acordo com a *Tecnoalimentar*, as duas maiores preocupações dos consumidores em Portugal são a saúde e o equilíbrio entre a vida pessoal e profissional, aumentando assim a procura de produtos mais saudáveis e funcionais. As empresas nacionais de bolachas são relativamente poucas, mas têm o foco de satisfazer as preocupações dos clientes e assegurar melhor qualidade. Exemplos de empresas de bolachas em Portugal são *Diatosta*, *DanCake*, *Cerealto* e *Vieira de Castro* (Jornal de Notícias, 2018).

1.5. A Vieira de Castro e desafio proposto

A Vieira de Castro Produtos Alimentares, S.A., é uma empresa sediada em Vila Nova de Famalicão, que fabrica, como o nome indica, vários produtos alimentares. Fundada em 1943, com a confeitaria e salão de chá “A Vieira de Castro” numa das principais e mais movimentadas ruas da cidade, famosa na região pelos deliciosos bolo rei e pão-de-ló, levando a sua fama e procura pelos seus produtos levaram eventualmente à transformação de haver uma confeitaria para a criação de uma fábrica, passando as suas vendas a nível nacional em vez de local, criando assim a Vieira de Castro & Filhos Lda., produzindo bolachas, amêndoas e rebuçados, com criações icónicas como a Bolacha de Água e Sal, as irresistíveis Amêndoas Cláudias e os Originais Rebuçados Flocos de Neve (Vieira de Castro S. A., 2023).

A Vieira de Castro é exportadora para mais de 40 países (virtualmente toda a Europa), bem como para os Estados Unidos, Austrália, China, outros países asiáticos e também um grande número de países africanos (Correio da Manhã, 2016) (Larguesa, António, 2018).

Nestes últimos anos, a Vieira de Castro encontra-se com um problema acerca do destino final dos seus resíduos, ou seja, das bolachas descartadas. Em contexto, de acordo com a informação da Vieira de Castro, esta produz, anualmente, 600 toneladas de bolachas descartadas, podendo aumentar este valor para o dobro, ou seja, 1 200 toneladas. Uma solução que esta empresa propôs foi a revalorização destas em produtos de interesse económico. Com o problema do COVID-19, que será explicado e contextualizado a seguir, e como um meio de proteção contra esta pandemia é o uso de álcool para a desinfeção, a produção de etanol é um conceito interessante, que poderá ser aplicado como uma solução para o problema das bolachas descartadas. A seguir, para entender a importância do que foi dito anteriormente, irá ser apresentada uma explicação sobre o etanol, o COVID-19, o papel do etanol como desinfetante e para prevenir a doença, e o seu consequente aumento da procura deste no mercado e o respetivo interesse em produzir o etanol.

1.6. Etanol e o mercado mundial de etanol

Etanol (ETOH) ou álcool etílico, é um líquido volátil, incolor, transparente, com um odor característico. O interesse por etanol tem aumentado em anos recentes, assim, o aumento do mercado de etanol mundial é esperado devido à maior procura deste para biocombustíveis, estimando que a procura deste excederia 125 a 30 bilhões de litros em 2020 (Niphadkar et al., 2018), para a indústria de bebidas e comidas e também tem aumentado a procura de álcool etílico no ramo farmacêutico e medicinal, e também no ramo de cuidado pessoal, para desinfetar superfícies, tal como para uso pessoal (Fortune Business Insights, 2021) como por exemplo, géis álcool para desinfetar as mãos devido à pandemia do COVID-19 e à maior preocupação em utilizar medidas de proteção e prevenção desta doença (Fortune Business Insights, 2021).

1.7. O COVID-19 e a utilização de desinfetantes de álcool

De acordo com (Berardi et al., 2020), o COVID-19 é uma doença infecciosa, causada por um novo coronavírus, denominado SARS-CoV2, primeiramente identificada em dezembro de 2019, em Wuhan, China (León Molina & Abad-Corpa, 2021)(Zhu et al., 2020) e denominado de COVID-19 em Fevereiro de 2020 pela OMS (Organização Mundial de Saúde) ou WHO (*World Health Organization*) (Khan et al., 2020), espalhando rapidamente por todo o mundo, sendo esta doença declarada como um risco global e assim, pela Organização Mundial de Saúde como uma pandemia (León Molina et al., 2021)(Berardi et al., 2020). O nome coronavírus deriva do nome *corona*, que significa coroa em latim, cuja estrutura deste vírus se assemelha, na superfície. Os sintomas do COVID-19 incluem febre, tosse, falta de ar, dores de garganta e nariz a pingar entre os sintomas mais comuns (Khan et al., 2020). De acordo com a *World Health Organization* (WHO), o vírus que causa o COVID-19 é transmitido de pessoa a pessoa por partículas respiratórias (partículas que são lançadas para o ar através do sistema respiratório) (Meyers et al., 2021; OMS, 2021) através do contacto, a cerca de 1 metro de distância, com a pessoa infetada (OMS, 2021) ou pelo contacto direto com superfícies ou objetos que estiveram em

contacto direto ou na proximidade de uma pessoa com a doença (Khan et al., 2020; OMS, 2021).

De acordo com Saha et al. (2021), o vírus SARS-CoV-2 consegue sobreviver durante 28 dias a temperatura ambiente em superfícies, tal como mencionado anteriormente.

O Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a utilização de medidas de precaução, de modo a evitar a transmissão do vírus a partir de partículas no ar, através de contacto direto com a pessoa infetada ou com superfícies infetadas. Uma das medidas de prevenção é a desinfeção de superfícies e também a utilização de géis de álcool para as mãos para uso pessoal, sendo esta importante na prevenção e diminuição da transmissão da doença (Khan et al., 2020)(Saha et al., 2021).

Os desinfetantes das mãos podem ser à base de álcool ou uma preparação em líquido, gel ou espuma sem álcool, para uma aplicação rápida nas mãos com uma secagem rápida, eliminando a necessidade de sabão, água ou auxílio para a secagem destes (Saha et al., 2021). Para os desinfetantes à base de álcool, a concentração ótima para eliminar atividade bacteriana e microbiana encontra-se entre os 60 % e os 95 % por volume (v/v). O álcool consegue dissolver as membranas lipídicas e desnatura as proteínas dos microrganismos, inativando-os, eliminando bactérias, fungos e vírus encapsulados (León Molina et al., 2021).

A desinfeção de superfícies faz-se de acordo com os protocolos comuns estabelecidos, com uma mistura de 62–71 % etanol, 0,5 % peróxido de hidrogénio, ou 0,1 % de Hipoclorito de sódio (León Molina et al., 2021), mostrando-se eficaz contra o coronavírus em superfícies pequenas (León Molina et al., 2021). A eficácia desta desinfeção depende da concentração da mistura, do tempo de exposição ao desinfetante ao germe, do tipo de microrganismos e do tipo de superfície (Khan et al., 2020).

De acordo com León et. al (2021), o etanol é um agente desinfetante que, na presença de água, é empregado na desinfeção de superfícies, desnaturalizando as proteínas dos microrganismos.

Assim, como as instituições medicinais e farmacêuticas, vários negócios e famílias por todo o mundo rapidamente precisavam de reagentes para desinfetar superfícies e para a sanitização completa dos seus espaços de modo a prevenir contra o COVID-19 nas superfícies necessitam de desinfetá-las com maior frequência. Com isto, verifica-se o facto de que houve um rápido aumento da necessidade ou procura de desinfetantes eficazes e uma necessidade de desinfetar superfícies com eficiência, resultando na escassez dos desinfetantes de mãos de superfícies existentes (Meyers et al., 2021).

Quando a frequente lavagem de mãos e sanitização de superfícies foram recomendados por várias agências públicas de saúde à volta do mundo, observou-se um aumento de vendas de desinfetantes de mãos de 300 % nas últimas semanas de fevereiro de 2020 e um aumento de 470 % nas últimas semanas de março de 2020, em comparação com o ano anterior (Berardi et al., 2020).

Assim, o mercado mundial de etanol em 2020 foi valorizado em 93.7 biliões de USD (Precedence Research, 2021), sendo esperado, pela *Global Industry Analysts, Inc* atingir os 105 biliões em 2025 com um crescimento anual de 6,2 %, e sendo esperado pela *Globe Newswire* atingir os 155,6 biliões de USD em 2030 com um CAGR de 5,2% entre 2021 e 2030 (Precedence Research, 2021) Entretanto, o mercado mundial para bioetanol, etanol produzido através de processos biológicos, valorizou-se por \$43,2 biliões USD em 2019, esperando aumentar para 64,8 biliões de USD em 2025, com uma taxa de crescimento de 14 % entre 2020 e 2025 (Resarch & Markets, 2020).

1.8. Aumento do interesse em bioetanol e procura de bioetanol e princípio do projeto

Como o interesse em etanol, tal como em bioetanol, aumentou nestes últimos anos e como o aumento da preocupação no problema de desperdícios alimentares ou em produtos alimentares descartados produzidos pela indústria alimentar ou por desperdícios alimentares ao nível de lar comum, há um interesse em produzir etanol a partir da fermentação destes alimentos descartados. Este etanol é produzido a partir de materiais orgânicos e a

produção deste consiste comumente em três fases, sendo a primeira fase a hidrólise do material (sacarificação), onde converte o material em glucose, a segunda fase é a fermentação da glucose, convertendo-a em etanol e CO_2 , e por último a separação do etanol e a purificação deste através de destilação. Leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* ou a bactéria *Zymomonas Mobilis* são as mais utilizadas para a fermentação de etanol (Q. Wang et al., 2020). Com isto, o projeto desenvolvido nesta dissertação envolve a proposta de um método de revalorizar os resíduos alimentares de uma empresa alimentar (em concreto de bolachas) em Portugal, cuja empresa, a Vieira de Castro ofereceu o desafio.

1.9. Objetivos

Este projeto consiste na revalorização de bolachas descartadas em etanol, ou seja, propor e investigar um método de produzir etanol a partir de bolachas, como as bolachas contem uma grande percentagem de amido, este processo será baseado na produção de etanol a partir de milho. Terá a cooperação do CEB com a Vieira de Castro, sendo a maior parte do estágio realizado no CEB. O objetivo principal deste trabalho será propor um método de produção de bioetanol a partir de bolachas descartadas, de modo a produzir uma solução com 70 % de etanol. De acordo com esta informação e com o processo produtivo de etanol este objetivo divide-se nos seguintes objetivos:

- Revalorizar as bolachas descartadas num produto de valor acrescentado, neste caso bioetanol.
- Determinar o melhor processo de fermentação de amido em etanol para a matéria-prima em questão.
- Otimizar o processo de fermentação de etanol a partir das bolachas descartadas.
- Fazer o *scale-up* do processo.
- Recuperar a gordura das bolachas, calculando a quantidade e a eficiência de recuperação.

1.10. Estrutura da dissertação

Esta dissertação será composta pelo primeiro capítulo, que será uma introdução ao trabalho realizado, explicando a motivação começando pelo problema apresentado que é de resíduos de comida, seguido de uma breve introdução à indústria alimentar mundial, tal como em Portugal, falando sobre as bolachas, que serão o material a ser utilizado neste projeto tal como a motivação para este trabalho, demonstrando a importância do etanol e o interesse da produção deste. No segundo capítulo falar-se-á de conceitos que serão importantes para contextualizar o trabalho realizado, dando uma explicação sobre o amido, o processo de hidrólise deste, incluindo as enzimas utilizadas e os problemas de liquefação que estas solucionam. Também se explicará o processo fermentativo das hexoses em etanol e os processos de separação e purificação de etanol envolvidos. Finalmente falar-se-á dos processos de recuperação de lípidos e o processo utilizado, tal como os processos de quantificação e análise de compostos em soluções. Para o terceiro capítulo serão descritos os materiais e métodos realizados durante o projeto, seguido dos resultados obtidos e a discussão destes no capítulo quatro. No capítulo cinco será feita a conclusão e sugestões para melhorar o processo no futuro.

Capítulo 2. Conceitos teóricos para a contextualização do processo

2.1. Amido

O amido é um dos bio-polímeros funcionais alimentares mais importantes. É um carboidrato complexo e um dos produtos vegetais mais abundantes, servindo como uma reserva de energia para as plantas, estando então presente em qualquer planta (Mamat & Hill, 2018). As plantas sintetizam amido como resultado da fotossíntese, processo em que a energia solar (luz) recebida é convertida em energia química. O amido é sintetizado nos plastídeos das plantas, tal como nos amiloplastos de tubérculos, raízes e sementes, onde grandes quantidades deste são acumulados em grânulos. (Mamat & Hill, 2018; Van Der Maarel et al., 2002). Estes grânulos são densos, insolúveis na água e são semi-cristalinos (Mamat & Hill, 2018)(Chakraborty et al., 2022). Nos cloroplastos o amido é transitório e é acumulado durante a fase dependente da luz da fotossíntese (fotoquímica), sendo utilizado como uma fonte de energia na fase independente da luz da fotossíntese (fase química) (Moreira, 2013). Normalmente, o amido é armazenado e acumulado nos órgãos de reserva das plantas (sendo estes pólen, folhas, caules, raízes, tubérculos, boubas, rizoma, frutas, flores, péricarpas, embriões, endospermas das sementes (Zobel et al., 2016)(Pérez et al., 2009), sendo o milho, o trigo, a cevada, o arroz e as batatas exemplos de plantas com alto conteúdo de amido.

O amido é um grande polímero, composto por várias moléculas de D-glucose ligadas umas às outras de modo a formar um polímero linear, denominado de amilose, cuja estrutura molecular é ilustrada pela Figura 1, ou um polímero ramificado que é a amilopectina (Figura 2), ambos existindo no amido (Pérez et al., 2009), sendo as propriedades do amido influenciadas pelo rácio de amilose e amilopectina, onde no amido presente nas plantas existe cerca de 20 a 30 %

de amilose e com 70 a 80 % de amilopectina (Mamat et al., 2018).

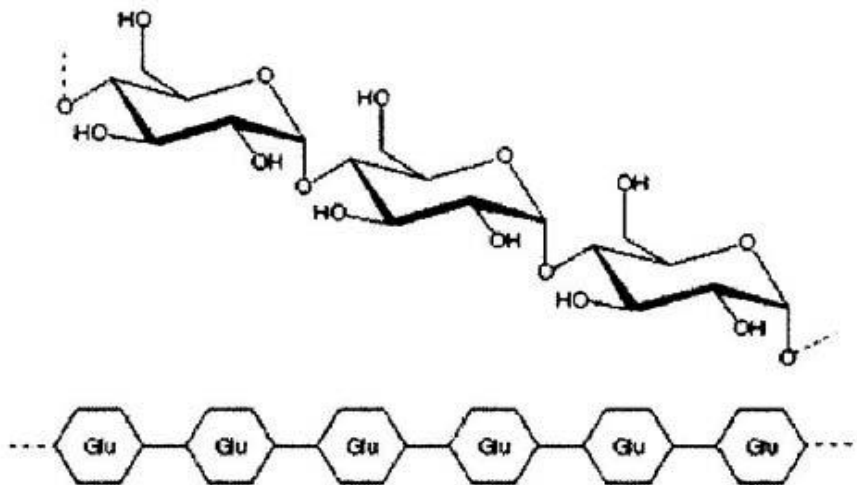


Figura 1. Esquema da estrutura molecular de amilose (BeMiller et al., 1996).

Fan et al. classificam o amido de acordo com a sua capacidade de se hidrolisar enzimaticamente e de acordo com a sua estrutura física e química. o amido é classificado como amido glicêmico, sendo subdividido em amido rapidamente digerível, digerível lentamente e amido resistente (Fan et al., 2021)(Zobel & Stephen, 2016). As culturas alimentares mais comuns de amido, como o milho, arroz, e batatas contêm 70 a 80 % de amilopectina e apenas 20 a 30 % de amilose. Um método usado para determinar o conteúdo de amilose no amido é a afinidade do iodo a uma solução sem gordura de amido e a cor azul obtida a partir do complexo de amilose e iodo, no entanto os resultados deste método são afetados pela presença de lípidos e pela estrutura da amilopectina, pois este também é capaz de se unir ao iodo e obter uma cor azul (Jane, 2009).

Na amilose, as subunidades de glucose estão ligadas através de ligações entre carbono anomérico de uma subunidade e um carbono 4 da subunidade vizinha, sendo a ligação denominada (1→4). As cadeias de amilose contêm entre 500 a 2000 subunidades de glucose, sendo o peso molecular entre 105 Da a 106 Da (Pérez et al., 2009; Van Der Maarel et al., 2002).

Na amilopectina as subunidades também estão ligadas numa configuração (1→4) nas partes lineares deste polissacarídeos, no entanto, como mencionado anteriormente, a amilopectina (Figura 2) é um polímero ramificado, por isso

ramificações acontecem a cada 24 a 30 subunidades de glucose, onde a glucose final é ligada com uma ligação a (1→6), paralelamente, a uma cadeia de amilose, conferindo a estas ramificações uma resistência a hidrólise por várias amilases, sendo algumas totalmente incapazes de hidrolisar as ligações 1→6, no entanto algumas são capazes de hidrolisá-las, mas mais lentamente do que as ligações 1→4 (Park et al., 2018; Robyt, 2009)(Jane, 2009; Pérez et al., 2009; Zobel et al., 2016).

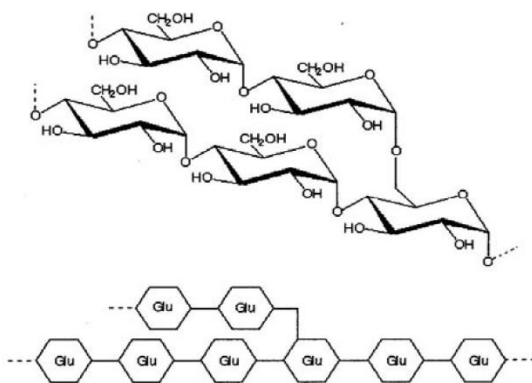


Figura 2. Esquema da estrutura molecular de amilopectina (BeMiller et al., 1996).

Embora as moléculas de amilose são consideradas lineares, muitas destas são incapazes de hidrolisar completamente por α -amilase. De acordo com Pérez et al., 2009, a amilose consegue ser hidrolisada para maltose, a partir de uma mistura de pululanases e α -amilase (Castro et al., 2011; Pérez et al., 2009; Robyt, 2009)

2.1.1. História da utilização do Amido

Os humanos desde a antiguidade, sempre consumiram comidas e alimentos com amido, sendo estes baseados em sementes, raízes e tubérculos. As primeiras culturas agrícolas cerealíferas foram de cevada, arroz, trigo e milho, tendo este último se tornado uma das maiores fontes de amido. Foram encontrados vestígios de arroz, quando datados revelam que estas culturas existiram há 11500 anos, sendo a cultura mais antiga de cevada indicada ter

existido há 10000 anos, na China. Os plantios de cereais mais importantes que é indígena no continente americano, sendo a cultura mais antiga de milho encontrada em *Tehuacan*, no México, datando de 7000 anos atrás. O trigo é o cereal mais consumido por seres humanos, cuja produção desta supera as de milho e de arroz, onde se acredita que se originou no Médio Oriente em, ou até antes de 6700 AC (Schwartz & Whistler, 2009).

Um dos usos de amido e de produtos de amido mais antigo foi desenvolvido quando os egípcios na época pré-dinástica (começando em 6000 a.C., acabando em 3000 a.C. (Leprohon & Doxey, 2013) colavam tiras de papiro umas às outras com adesivo feito de amido, sendo este feito de farinha de trigo fina fervida com vinagre diluído. A massa obtida é espalhada sobre as tiras de papiro, sendo depois batido com uma marreta, depois adiciona-se tiras de papiro adicionais nas pontas/bordas das páginas obtendo uma folha mais ampla e preservando o material, uma vez que papiros foram encontrados ainda com uma qualidade boa após 200 anos. O amido também foi utilizado para branquear roupas e para pó de cabelo, tal como foi usado, para revestir documentos chineses, para adicionar uma resistência à penetração de tinta nestes (Schwartz & Whistler, 2009).

Na época medieval, modificou-se o amido, hidrolisando ligeiramente este com vinagre, sendo o seu principal uso para endurecer tecidos ou roupas. No décimo sexto século, foi popularizado em França, o uso de amido para talco de cabelo. No século dezanove surgiu um aumento da procura de amido para as indústrias têxteis e de papel, devido à descoberta que o amido poderia ter transformado num produto tipo goma, denominado por dextrina, sendo feitos substitutos de gomas a partir de amido produzidos nos 1800's.

Em 1811, G.S.C. Kirchoff descobriu que o amido de batata poderia ser transformado numa substância doce aquecendo com ácido diluído, desenvolvendo assim uma hidrólise com ácido do amido tornando-o em açúcares mais simples (Höfer, 2015; Schwartz & Whistler, 2009). Esta descoberta ocorreu pelo facto do Kirchoff tentar desenvolver um substituto para Goma arábica, usada como um ligante solúvel para argila. Em 1831, foi

construída a primeira fábrica nos Estados Unidos a produzir xaropes de amido. Em 1866 começou-se a produzir dextrose partir de amido, sendo a produção de dextrose cristalina começado em 1882 (Schwartz & Whistler, 2009). A partir do ano 1900 muitas empresas americanas produtoras de amido comercial a partir de milho foram também fundadas, um exemplo sendo a *Western Glucose Company* fundada em 1906 (Schwartz & Whistler, 2009).

2.1.2. Inchaço dos grânulos de amido e gelatinização do amido

A maioria dos grânulos de amido são insolúveis em água fria, podendo sofrer inchaço limitado, reversível por secagem, devido a difusão e absorção de pequenas quantidade de água nas regiões amorfas do grânulo, quando esta é adicionada (Mamat et al., 2018). Quando o amido, na presença de água, é aquecido, sofre mudanças irreversíveis, dependendo da quantidade de água adicionada e do calor no sistema. O inchaço dos grânulos é influenciado pelo tamanho dos grãos de amido, conteúdo de amilose, dano no amido, e temperatura (Mamat et al., 2018), variando estes fatores de acordo com a sua origem.

Os amidos que provêm de cereais passam por um processo de “inchaço” de duas fases. Durante a primeira fase, de 60 °C a 75 °C, o inchaço do grão devido á quantidade de água é limitado, ocorrendo inchaço considerável a 75 °C a 90 °C e a difusão extensiva de amilose dos grânulos (Chakraborty et al., 2022; Mamat et al., 2018). Quando o amido é aquecido na presença de água em excesso os grânulos de amido submetem-se a um inchaço, e a organização cristalina no amido decompõe-se, formando regiões amorfas (Chakraborty et al., 2022; Mamat et al., 2018). Esta desorganização das moléculas, que destrói a sua organização da estrutura cristalina é denominada por gelatinização.

Como mencionado anteriormente, o inchaço dos grânulos aumenta com a temperatura e torna-se irreversível quando a gelatinização ocorre. Os polímeros existentes no amido, com o aumento da temperatura, começam a vibrar de tal modo que as ligações intermoleculares quebram, permitindo a ligação com as moléculas de água presentes. Isto leva a um aumento de separação de cadeias

de amido, contribuindo para a diminuição de tamanho das regiões cristalinas levando à total perda de cristalinidade, resultante do aquecimento contínuo (Chakraborty et al., 2022; Mamat et al., 2018).

O inchaço dos grânulos irá sempre envolver perda de cristalinidade e a hidratação do amido. Desde que a água no sistema seja abundante a gelatinização ocorre, geralmente a temperaturas entre 60 e 70 °C. Nestas condições, os grânulos são ricos em amilopectina, uma vez que ocorre a difusão da amilose durante a gelatinização, contribuindo para a fase “gelatinosa” que se encontra fora dos grânulos, convertendo-se então em partículas gelatinosas, resultando num aumento da viscosidade do sistema, ou solução de água e amido. (Biliaderis, 2009; Chakraborty et al., 2022; Jane, 2009; Mamat et al., 2018; Pérez et al., 2009). As diferenças de temperaturas de “inchaço dos grânulos”, que resultam numa subsequente gelatinização, variam de acordo com a origem botânica do amido, devido às diferenças de grau de cristalinidade, sendo as temperaturas de gelatinização mais elevadas, quanto maior o grau de cristalinidade, uma vez que confere estabilidade estrutural, sendo o amido mais resistente a gelatinização, assim sendo necessária uma temperatura maior para decompor a dita estrutura (Biliaderis, 2009; Castro et al., 2011; Chakraborty et al., 2022; Mamat & Hill, 2018; Van Der Maarel et al., 2002) tal como a quantidade de cadeias longas (de amilose) nas amilopectinas, contribuindo para o aumento de temperatura de gelatinização (Mamat et al., 2018). A gelatinização é controlada em parte pela estrutura da amilopectina, a composição do amido tal como o rácio de amilose e amilopectina e fosfato, o rácio de regiões amorfas e cristalinidade dos grânulos de amido (Mamat et al., 2018).

2.1.3. Lípidos e fosfolípidos no amido

Os lípidos, ou as gorduras, não se encontram apenas nos produtos de pastelaria, como por exemplo, nas bolachas, nos bolos, nos pães, estes também podem se encontrar no próprio amido.

Em amido de cereais, os lípidos são encontrados em pequenas quantidades, incluindo ácidos gordos e fosfolípidos. No entanto, em amido proveniente de arroz a quantidade de fosfolípidos e de ácidos gordos encontrados é substancial. Para a maioria do amido presente nos cereais, os lípidos encontrados são proporcionais ao conteúdo de amilose. Deste modo os amidos de origem cereal que contêm um alto conteúdo de amilose apresentam-se como o amido que aparenta um maior conteúdo de lípidos, enquanto amido provindo de tubérculos ou de raízes apresentam valores baixos aparentes de lípidos. Os lípidos e fosfolípidos costumam formar complexos estáveis de cadeias longas de amido, incluindo amilose e amilopectina, podendo resultar na gelatinização dos grânulos de amido (Biliaderis, 2009; Jane, 2009).

2.2. Processos de hidrólise do amido

Para se realizar a hidrólise e para que esta seja rápida e completa, é necessário um catalisador da reação, normalmente sendo utilizados ácidos e enzimas (Carvalho, 2016). A hidrólise do amido quebra a cadeia molecular principal em pequenas cadeias, em açúcares mais simples, de um modo muito resumido.

Kirchhoff descobriu que quando uma solução de amido foi tratada com ácido diluído, obteve-se um xarope doce a partir desse amido. A partir daí, durante várias décadas foram desenvolvidas tecnologias para hidrolisar o amido à escala industrial. Apenas em 1921, Newkirk reportou um método comercial para a produção de glucose a partir de amido, onde, no processo em *batch*, o amido é misturado com água, fervida de modo a serem libertadas a amilose e a amilopectina na água, sendo depois tratada com ácido, pressão e temperatura. A solução aquosa de amido é aquecida rapidamente para temperaturas no intervalo de 100 °C a 175 °C, passando depois para um reator de hidrólise para tratamento enzimático.

A doçura do xarope de amido depende da intensidade/grau de hidrólise. Quando a hidrólise é completa produz-se apenas glucose ou dextrose (denominada dextrose nos EUA ou no Reino Unido), sendo a sua quantidade quantificada em *DE* ou "*Dextrose Equivalent*". Este valor apresenta os redutores equivalentes em

unidades de glucose por peso seco, calculado a partir da fórmula $DE=180/(162 \times n+18) \times 100$, sendo n o grau de polimerização médio, com isto, a glucose, por exemplo, tem um DE de 100, a maltose tem um DE de 53 e o amido tem um DE de quase 0 (Van Der Maarel et al., 2002). Com o passar do tempo e com a evolução da tecnologia começou-se a preferir processos enzimáticos sobre os processos que utilizam ácidos. Os processos de hidrólise enzimática apenas começaram a ser generalizados a partir do ano 1960. Neste método, como as temperaturas de hidrólise descritos anteriormente são bastante elevados e a 60 °C, em excesso de água o amido começa a gelatinizar será necessário um processo de redução de viscosidade da mistura e de liquefação, para isso utilizam-se amilases, que quebram as cadeias de amido em polímeros mais pequenos, reduzindo a sua viscosidade, depois submetendo a um processo de sacarificação, que será descrito nos subcapítulos seguintes.

2.2.1. Métodos de hidrólise de milho industriais

Para a produção de bioetanol a partir de milho existem dois métodos principais, de trituração, a seco ou a moagem húmida. Para as matérias-primas de amido fermentarem em bioetanol é necessária uma quebra das cadeias de amido em moléculas mais simples, uma destas sendo a glucose. Para isto, é requerido uma hidrólise, que enquadra uma liquefação do material diminuindo a viscosidade desta a altas temperaturas para se realizar uma sacarificação, que quebra os polímeros longos (oligossacarídeos) produzidos na liquefação em monossacarídeos, ou seja em glucose (Höfer, 2015; Melendez et al., 2022; Niphadkar et al., 2018; Ritslaid et al., 2010).

Na hidrólise de amido existem dois métodos diferentes mencionados antes, cada um sendo utilizado dependendo dos produtos finais desejados. A liquefação de moagem a seco é ótima para indústrias de pequena escala, preferindo apenas bioetanol como produto final. A liquefação de moagem a húmido é preferida por grandes indústrias, onde as várias frações da semente do milho são separadas, obtendo produtos diversos, tal como bioetanol, e subprodutos como o xarope de milho, a glucose e dextrose, plásticos

biodegradáveis, óleo de milho, e ração animal. No entanto este processo requer um grande investimento (Melendez et al., 2022; Shad et al., 2021).

De acordo com Shad et al. (2021), no processo de produção de bioetanol a partir de milho, cerca de 90 % da produção nos Estados Unidos, onde os 10 % restantes são produzidos pela moagem a húmido, sendo o processo de moagem/trituração do milho a seco preferencialmente utilizado devido a este método ser mais eficiente e a requerer menos investimento em infraestrutura.

2.2.1.1. Moagem a seco

Na moagem a seco, os grãos de milho são moídos de modo a reduzir o tamanho das partículas, tornando o milho num pó para maximizar o rendimento de produção de etanol, aumentando a acessibilidade dos nutrientes para as enzimas e os microrganismos que realizam a fermentação (Shad et al., 2021).

Depois da fase de moagem, o processo da hidrolisação enzimática do milho é comum para a moagem a seco como para moagem húmida. Nesta etapa, adiciona-se água e resíduos de fermentação para a infiltração de proteínas, açúcares e lípidos solúveis necessárias à fermentação, depois a mistura é aquecida (cozinhada) com enzimas amilolíticas (como a amilase). A mistura é cozinhada a 120 °C e depois passa para um tanque de liquefação a 80 °C a 90 °C durante 30 min, adicionando amilases termoestáveis, diminuindo a viscosidade da mistura. Depois esta é sacarificada, hidrolisando as longas cadeias de amido em glucose, por exemplo. Depois, estes açúcares são transformados em etanol pela ação de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* a 33 °C a um pH de 4 durante 48 a 72 h (Höfer, 2015; Kim et al., 2011; Shad et al., 2021)

2.2.1.2. Moagem húmida

Na moagem húmida os grãos de milho são submersos numa solução com uma concentração baixa de ácido sulfúrico de modo a separar os componentes do grão para produzir uma variedade de produtos. De seguida evapora-se a solução de modo a aumentar a percentagem de sólidos na solução de 4 % a 8 % para 35 % a 40 % permanecendo ainda um resto desta “água”, seguindo uma

separação de frações de miolo e fibras a partir das diferenças de densidade e tamanho de partícula (através da centrifugação do miolo e com uma peneira para a fração de fibra, de um modo simples). Adicionalmente, centrifuga-se a solução de modo a separar as proteínas do amido, obtendo uma "pasta" ou lama de amido com apenas 3 % de proteínas ou lípidos, submetendo a lama a hidrociclones de modo a separar estas proteínas residuais de modo a obter uma concentração de amido superior a 90 %.

O próximo passo, inclui o aquecimento da "pasta", uma liquefação e subsequente sacarificação, obtendo a glucose, onde, de modo a produzir bioetanol é fermentada (pelo processo que será descrito nos capítulos a seguir) (Bothast et al., 2005; Höfer, 2015; Shad et al., 2021).

2.3. Enzimas de liquefazem e sacarificam o amido

Existem quatro tipos de enzimas que são responsáveis em quebrar as cadeias do amido, a que hidrolisam as ligações α -D-glicosídicas (1 \rightarrow 4) denominadas amilases, as glucosiltransferases, que transferem as ligações (1 \rightarrow 4), as isoamilases que hidrolisam as ligações (1 \rightarrow 6), e as enzimas tipo α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) transferases (Robyt, 2009).

As endoamilases quebram aleatoriamente as ligações glicosídicas 1-4 na parte interior das amiloses ou de polímeros de amilopectina, produzindo cadeias mais pequenas e solúveis na água de oligossacarídeos denominadas dextrinas. Como as α -amilases não conseguem quebrar as ligações glicosídicas α -1-6 e passar pelas ramificações da amilopectina, produtos residuais são formados, as dextrinas (de Souza, P.et al., 2010; Van Der Maarel et al., 2002). Das enzimas endoamilases, as α -amilases são as mais conhecidas, sendo o produto final da ação das α -amilases são oligossacarídeos e dextrinas, constituindo oligossacarídeos ramificados (Van der Maarel et al., 2002).

As exoamilases quebram ligações 1-4 ou ambas as ligações glicosídicas 1-4 e 1-6, atuando nos resíduos externos de glucose das amiloses ou amilopectinas no amido, produzindo apenas glucose (como se observa nas as enzimas

glucoamilases e α -glucosidades) ou maltose e dextrina (Castro et al., 2011; de Souza, P. et al., 2010; Van Der Maarel et al., 2002).

2.3.1. Utilização de α -amilases e liquefação do amido

As enzimas α -amilases podem ser obtidas a partir de todas as classes biológicas, sejam bactérias, fungos, plantas ou animais. As α -amilases podem ser encontradas, no caso de animais nas glândulas salivares (uma das primeiras enzimas a ser descobertas deste tipo foi encontrada na saliva humana) e nos pâncreas dos animais. Hoje em dia, as enzimas α -amilase são de origem microbial, obtidas através de microrganismos, tais como *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* var. *saccharitikus*, *B. coagulans* e *Aspergillus oryzae* (de Souza P. et al., 2010; Robyt, 2009; Van Der Maarel et al., 2002).

As α -amilases atacam as cadeias de amido a partir de resíduos de glucose no interior da cadeia (sendo uma endoenzima), fragmentando rapidamente o amido em pequenas cadeias (monómeros), diminuindo a viscosidade. Este tipo de enzimas denominam-se enzimas de liquefação ou amilases liquificantes (Van Der Maarel et al., 2002). Estas obtêm diferentes produtos dependendo da origem destes, sendo a glucose um produto final com uma quantidade muito reduzida, mas nunca é um produto inicial desta liquefação (de Souza P. et al., 2010; Van Der Maarel et al., 2002). Uma das dificuldades de trabalhar com as α -amilases deve-se ao facto destas enzimas não se encontrarem ativas a um pH abaixo de 5.9 a altas temperaturas. Assim, o pH do amido terá que ser ajustado de 4.5 (pH do líquido de amido) para um pH de 6, adicionalmente Ca^{2+} terá que ser adicionada devido à dependência das enzimas a Ca^{2+} (Castro et al., 2011; de Souza P. et al., 2010; Van Der Maarel et al., 2002).

Para a completa conversão de amido para glucose é necessário um processo de liquefação do amido, de modo a formar cadeias mais pequenas de oligossacarídeos e dextrinas (Robyt, 2009)(de Souza, P. et al., 2010; Van Der Maarel et al., 2002). Uma mistura líquida de amido e água, normalmente com um conteúdo de 30 % a 35 % de sólidos em peso seco a um pH de 6 é misturado

com um cocktail enzimático de α -amilases (sendo usada as α -amilases de *Bacillus amyloliquefacien* inicialmente, sendo substituídas por α -amilases com origem em *Bacillus stearothermophilus* ou *Bacillus licheniformis*), sendo aquecido a uma temperatura entre 90 °C a 105 °C durante 90 min, sendo uma temperatura acima de 100 °C desejada de modo a eliminar complexos de lípidos no amido (lípidos-amido), formando, depois da liquefação o valor desejado de *DE* da mistura entre 8 e 10 (de Souza, P. et. al, 2010; Van Der Maarel et al., 2002).

2.3.2. Enzimas de convertem o amido em glucose

De modo a obter um xarope de glucose com mais de 95 % de glucose, a partir da solução mencionada anteriormente é necessário a ação das exoenzimas mencionadas anteriormente, como as glucoamilases, que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1-4 a partir do fim da cadeia não redutor, sendo as glucoamilases comumente obtidas a partir da espécie *Aspergillus niger*. Esta enzima tem um pH ótimo de 4.2, sendo estável a 60 °C (por esta razão é necessário uma liquefação do amido prévia, de modo a não ocorrer o inchaço dos grânulos de amido e a gelatinização mencionada, que ocorrem a partir desta temperatura) (Van Der Maarel et al., 2002). Assim, como mencionado anteriormente, para as enzimas de liquefação (α -amilases cujo pH ótimo é de 5.9) será necessário um ajuste de pH de modo a realizar a liquefação eficiente da mistura de água e amido, por isso como o pH da solução foi ajustado anteriormente terá de haver um ajuste adicional, para 4.2 ou 4.5 de modo a ocorrer a sacarificação. Este processo ocorre a 60 °C durante 12 h a 96 h. Um problema na utilização de apenas glucoamilases deve-se ao facto desta enzima hidrolisar as ligações 1-6 presentes nas maltodextrinas formadas na liquefação muito lentamente, resultando na acumulação isomaltose (Van Der Maarel et al., 2002). A solução proposta para este problema foi a adição de pululanase, que hidrolisa com eficiência as ligações mencionadas e adicionalmente, o seu pH a temperatura de atuação ótima são as mesmas da glucoamilase (Van Der Maarel et al., 2002).

2.4. Fermentação de açúcares em etanol

Desde a antiguidade que se produz álcool, com a fermentação de vinho a partir de arroz, mel e frutos há 9000 anos, a produção de cerveja antes de 6000 a.C. pelos Sumérios e Babilônios. Antes da descoberta de Louis Pasteur, que os microrganismos apresentavam um papel fundamental na fermentação, a fermentação era utilizada por várias culturas para a produção de alimentos, tintas, para a preservação de alguns vegetais como os pepinos, para a produção de queijo e de certos condimentos como o vinagre e o molho de soja (Zhang et al., 2017).

Existem vários métodos de transformar matéria biológica, biomassa em bioetanol, sendo os processos categorizados de acordo com o tipo de biomassa utilizada. Por exemplo a bio conversão de 1.^a geração envolve converter culturas de alimentos vegetais ricas em sacarose, tal como frutas, cana de açúcar e amido como o milho, batata e cereais em etanol (Niphadkar et al., 2018), a 2.^a geração, a produção de etanol a partir de biomassa barata, que não entra em conflito com a produção de alimentos, materiais lignocelulósicos como por exemplo madeira, palha e relva. A produção de etanol de 3.^a geração envolve a produção de etanol a partir de microalgas (Mohd Azhar et al., 2017; Niphadkar et al., 2018). O processo de produção de etanol depende da matéria prima usada, mas este processo pode ser resumido em três passos, que são comuns para a maioria dos materiais de são a obtenção da solução com açúcares redutores, depois a conversão dos açúcares em etanol, seguido da separação e purificação deste, normalmente por destilação, retificação e desidratação (Vohra et al., 2014).

Para a conversão de bolachas descartadas em etanol, o método utilizado será baseado nos processos de conversão de milho em etanol. O processo simplificado consiste na trituração do material, no processamento do material de modo a obter açúcares simples para serem fermentados em etanol. Ao contrário dos processos de produção de bioetanol a partir de produtos com açúcar, procedendo a um processo simples de fermentação, a biomassa com amido (como as bolachas) necessita de proceder a uma hidrólise (Melendez et

al., 2022), que consiste na diminuição da viscosidade da solução de amido a altas temperaturas e à quebra das cadeias de amido em açúcares simples, como a glucose. Esta é depois fermentada anaerobicamente por leveduras ou outros microrganismos, produzindo etanol e CO_2 , sendo depois purificada e separada a solução por destilação (Jeevan Kumar et al., 2020).

2.4.1. Processo de fermentação de glucose em etanol

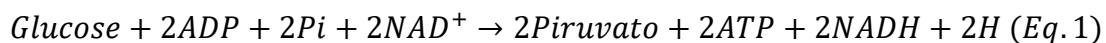
De modo a fermentar açúcares redutores como a glucose em etanol, como dito anteriormente serão necessários microrganismos capazes de converter a glucose em etanol. Os microrganismos mais utilizados para a fermentação de glucose em etanol são a bactéria anaeróbica gram-negativa *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a última mencionada a mais utilizada (Bai et al., 2008).

A *S. cerevisiae* é uma levedura, fungos unicelulares que colonizam em ambientes terrestres, aéreos e aquáticos (Rodrigues et al., 2006). As leveduras têm uma forma redonda ou oval e reproduzem-se através de gemulação, podendo também crescer em forma haploide (células que realizam mitose e em condições de stresse, morrem) ou diploide (que em condições de stresse produzem esporos). Estas podem crescer anaerobicamente ou aerobicamente, requerendo nitrogénio e fósforo (Salari, 2016). O nome *Saccharomyces cerevisiae* vem do Grego-Latim, onde “*Saccharomyces*” significa fungo de açúcar e “*cerevisiae*”, significa cerveja (Salari, 2016).

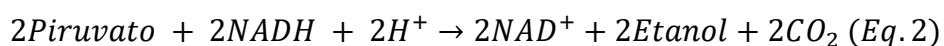
A *S. cerevisiae* mostrou-se essencial para a civilização humana (Parapouli et al., 2020) devido às variadas aplicações, sendo usada na indústria alimentar e na indústria de bebidas alcoólica, este é um organismo modelo em estudos biológicos, pois é facilmente cultivada, sendo um dos microrganismos com maior importância industrial, conseguindo fermentar glucose, frutose, maltose e galactose, entre outros açúcares (Walker & Stewart, 2016). No mercado de leveduras europeu, são produzidas cerca de 1 milhão de toneladas desta levedura anualmente, onde 30 % são exportadas (Parapouli et al., 2020). Na indústria de bebidas alcoólicas a *S. cerevisiae* é usada no fabrico de rum, vodka,

whisky, brandy, e sake, podendo também ajudar na produção de chocolate, vinho e pão (Parapouli et al., 2020).

Estudos reportam as melhor condições de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* obtêm-se a um pH de 4 e a uma concentração de oxigênio dissolvido de 5 % (Salari, 2016). Estas leveduras produzem etanol anaerobiamente, sendo a sua fermentação simples. O mecanismo principal de produzir etanol é a partir da glicólise (via de Embden–Meyerhof–Parnas ou EMP), em que de um modo simples, a partir de uma molécula de glucose são produzidas duas moléculas de piruvato. Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido em etanol, libertando CO_2 (Bai et al., 2008). A levedura usa os açúcares redutores, em condições anaeróbicas, como doadores de eletrões, aceitadores de eletrões e como fontes de carbono. A sequência de reações que transformam a glucose em ácido pirúvico são (Walker & Stewart, 2016):

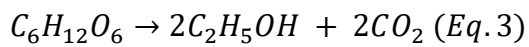


Na glicólise são produzidas 2 moléculas de piruvato e duas moléculas de ATP, sendo o ATP a única forma de energia obtida pela *S. cerevisiae* durante a fermentação (Walker & Stewart, 2016) (Bai et al., 2008). Estas reações fornecem energia e NADH (que ajuda na redução dos açúcares) à levedura, de modo que esta cresça, o NAD^+ é regenerado, pois o NAD^+ é necessário para manter o balanço redox e para que a glicólise continue. O piruvato (CH_3COCO_2H) é depois descarboxilado por piruvato-descarboxilase a acetaldeído e dióxido de carbono, cujo o primeiro composto age como o aceitador de eletrões para a redução de acetaldeído para etanol, através da enzima álcool-desidrogenase (Bai et al., 2008; Walker & Stewart, 2016). Deste modo, a equação simplificada da descarboxilação e a redução a etanol resume-se no seguinte (Equação 2) (Walker & Stewart, 2016):



A álcool desidrogenase regenera o NAD^+ , no entanto esta enzima necessita de zinco, sendo este mineral considerado essencial para a atividade desta, podendo limitar ou até comprometer a fermentação e o rendimento de álcool (Walker & Stewart, 2016).

Assim, ao todo, a reação de fermentação pode-se simplificar pela equação seguinte, denominada a equação de *Gay Lussac* (Jacques, 2003), onde a partir de uma molécula de glucose, produz-se duas moléculas de etanol e duas moléculas de dióxido de carbono (Walker & Stewart, 2016):



Com isto, de acordo com a estequiometria da reação e de acordo com a literatura, em base mássica, produz-se 0.511g de etanol e 0.489g de CO_2 por cada grama de glucose (Bai et al., 2008), por isso, por cada quilograma de glucose fermentada, teoricamente são produzidos aproximadamente 500g de etanol, no entanto nas indústrias, os melhores rendimentos das fermentações são de aproximadamente 90 % (Walker et al., 2016)(Bai et al., 2008).

O rendimento das fermentações de açúcares redutores (como hexoses) em etanol, a duração e até a quantidade de etanol produzido podem ser comprometidos, devido ao stress das leveduras. Devido a esta razão a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada para fermentação alcoólica, pela sua robustez e a tolerância a altas concentrações de etanol e por conseguir crescer em condições aeróbias e anaeróbias na presença de glucose. No entanto, durante a inoculação e a fermentação são sujeitos a fatores que aumentam o stress que afeta o rendimento da fermentação, tal como competição microbial (provocada por contaminação de bactérias no reator), envelhecimento das células, altas concentrações de etanol e metabólitos, que se tornam tóxicas para a levedura, pH, diferenças de temperatura e pressão osmótica, podendo estes fatores resultar em mutações aumento da produção de glicerol e a diminuição da produção de etanol, produtos secundários indesejados (Tse et al., 2021).

Para estes problemas, existem soluções que os atenuam ou até os solucionam. Estas incluem o fornecimento de suplementos de nutrientes que são essenciais para a fermentação, a otimização e regulação da temperatura e do pH da fermentação, a utilização de culturas de leveduras (Tse et al., 2021) desenvolvidas para obterem uma maior tolerância aos fatores mencionados, uma destas sendo o *Etanol Red*, que é comumente utilizada nas indústrias. Esta cultura foi utilizada no projeto de produção de etanol a partir de bolachas

descartadas, e melhorando o arejamento, cujo valor ótimo de oxigênio é de 5 %, como mencionado anteriormente (Tse et al., 2021) (Jacques, 2003)(Salari, 2016).

2.4.2. Tipos de fermentação

Existem vários métodos de fermentação que são praticados para a produção de bioetanol comercial, os métodos mais conhecidos sendo a fermentação em substrato líquido ou submersa e a fermentação em substrato sólido. Adicionalmente, uma tecnologia de fermentação que recentemente emergiu, “*Very High Gravity Fermentation (VHG)*”, aumenta a eficiência de fermentação sem a alteração nos equipamentos existentes, utilizando o fermentador de um modo mais eficiente.

Consoante as propriedades da matéria-prima a utilizar, certas fermentações apresentam vantagens em termos de eficiências comparadas a outras estratégias. Deste modo, deve-se utilizar o método que se adequa melhor para a biomassa a fermentar (Tse et al., 2021)(Jacques, 2003)(Niphadkar et al., 2018).

A fermentação submersa refere-se quando o substrato fermentescível é liquidificado e os microrganismos crescem nesse líquido, sendo muito utilizado na produção de bioetanol de 1.^a geração, ou seja, a fermentação de biomassa obtida de produtos alimentares, como por exemplo milho e fruta. Esta matéria-prima rica em açúcares e amido consegue ser misturada com água (passando os produtos com amido por uma liquefação prévia consistindo “cozinhar” o produto e passá-lo por uma hidrólise enzimática), resultando num meio líquido em que os açúcares e nutrientes essenciais consigam ser dissolvidos (Tse et al., 2021). No entanto, este processo exige muita energia e água, requerendo grandes volumes dos bio reatores tal como para as colunas de destilação e gera grandes volumes de resíduos os produtos de pouca importância económica (Tse et al., 2021).

Na fermentação em estado sólido, os microrganismos crescem em material não solúvel, ou em substratos sólidos com pouca água. Esta técnica é utilizada para

várias aplicações, tal como a produção de enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e biodiesel. Este processo é afetado por vários fatores, incluindo o tipo de microrganismo, o substrato, a atividade de água a temperatura, arejamento e o tipo de bio reator utilizado. O tipo de microrganismos mais utilizados neste métodos são fungos filamentosos, sendo também usado para organismos unicelulares como algumas leveduras e bactérias (Tse et al., 2021). Esta técnica produz menos resíduos, no entanto o tempo de fermentação é maior, requer menos energia, água e volume, no entanto a monitorização dos parâmetros estabelecidos é difícil (Tse et al., 2021).

A tecnologia *Very High Gravity Fermentation (VHG)* é um método relativamente novo, como o nome indica é realizada a gravidades altas, ou seja, um conteúdo de sólidos alto, medido antes da fermentação. Nestas condições, as reações da levedura a stresse mudam, onde algumas culturas mostraram mais tolerância, no entanto este facto é específico ao tipo de cultura utilizada), utilizando substratos com grandes concentrações de açúcares de modo aumentar a produção etanol enquanto ao mesmo tempo se reduz os custos de produção. Esta tecnologia (VGH) utiliza concentrações de açúcares no intervalo de ≥ 250 g/L. Mais de 30 % dos sólidos são consumidos para atingir altas concentrações de etanol (Tse et al., 2021), atingindo uma produção de 15 % (v/v) de etanol, podendo atingir uma produção de 23.8 % (v/v) de etanol numa fermentação *batch* (Jacques, 2003).

2.4.3. Modos de fermentação: *Batch*, *Fed-batch* e contínuo

Um fator que afeta a fermentação é tipo de reator ou o modo como o processo de fermentação correr, podendo ser feito em modo *batch*, *fed-batch* ou em modo contínuo, em que a escolha entre estes para que a fermentação ou processo de produção inteiro de etanol seja ótimo, depende do substrato e da cinética do microrganismo utilizado.

Em modo *batch*, os microrganismos são inoculados num volume fixo de meio (incluindo o substrato e nutrientes adicionados) no fermentador, ondes os nutrientes são consumidos, os microrganismos crescem e geram e acumulam subprodutos, completando a fermentação quando esses nutrientes são

esgotados. Este modo de fermentação tem custos baixos, apresenta, em comparação com os outros modos de fermentação, um baixo risco de contaminação, requer um controlo menos exigente e é mais fácil de esterilizar, no entanto apresenta uma baixa produção de etanol, que provavelmente relaciona com o facto de apresentar uma densidade celular menor (Tse et al., 2021; Yang & Sha, 2019), e requer mais tempo entre os lotes produzidos, devido ao tempo de limpeza, esterilização do reator e também requer tempo de preparação do reator para uma nova fermentação, o que implica o carregamento do substrato, o pré-tratamento e a inoculação com o microrganismo, por exemplo. Por isso, a fermentação em *batch* é utilizada maioritariamente em pequena escala a longo termo ou para fermentações em estado sólido (Tse et al., 2021; Wang et al., 2013).

A fermentação em *fed-batch* funciona como uma fermentação *batch*, no entanto a matéria-prima e os nutrientes necessários para a fermentação, o substrato é adicionado continuamente durante a fermentação. Assim, a densidade celular do meio é aumentada devido à disponibilidade de nutrientes, aumento o crescimento, pois os nutrientes no meio não estão limitados deste modo, aumentando o tempo de vida das células, permitindo uma produção e acumulação de etanol maior, limitando a acumulação de subprodutos e elementos tóxicos e havendo um melhor controlo dos fatores que afetam a fermentação, como por exemplo, o pH a temperatura e oxigénio dissolvido (Tse et al., 2021; Wang et al., 2013; Yang et al., 2019) mas são necessários maiores custos para o controlo do processo e, tal como o processo em *batch*, o tempo entre os lotes produzidos é considerável (Wang et al., 2013).

Por fim, o último modo mencionado, na fermentação em contínuo, os substratos e o meio de cultura é adicionada ao mesmo tempo que o etanol e os subprodutos da fermentação são purgados ou removidos do reator. Quando se alimenta o meio em contínuo a um ritmo adequado, ou seja, o caudal de substrato que entra no tanque de fermentação é igual ao caudal que sai do reator, o reator atinge o estado estacionário, obtendo assim um volume constante no fermentador. Em estado estacionário, as culturas conseguem sobreviver durante

longos períodos de tempo, reduzindo o tempo entre lotes, aumentando o rendimento, no entanto o estado estacionário torna as culturas mais suscetíveis a contaminações, devido a estes longos tempos de fermentação e a agregação de células prevenir o crescimento ótimo destas em estado estacionário (Yang & Sha, 2019).

2.5. Método de recuperação do etanol: Destilação

Como dito nos objetivos, para recuperar o etanol das soluções de fermentação, de modo a obter uma solução de etanol com 70 %, é necessário recorrer a uma destilação. A destilação é um método de separação de misturas, onde existem duas ou mais substâncias numa mistura líquida. Esta metodologia remonta aos químicos em Alexandria, no primeiro século (Halvorsen et al., 2000). É utilizada para obter produtos com alta pureza. A palavra destilação vem do latim '*de-stillare*' que significa 'gotejar'. Este processo consiste na separação de um líquido (mistura de componentes) através da sua evaporação e condensação.

A destilação é usada para separar líquidos de sólidos não voláteis, tal como a separação de álcool da matéria fermentada, separando também dois ou mais líquidos com diferentes temperaturas de ebulição. Exemplos da utilização da destilação é a utilização deste na separação de gasolina, petróleo e outros componentes a partir de crude e a dessalinização da água do mar. Desde a antiguidade a destilação terá sido utilizada, remontando ao ano 2000 a.C., na China, Egito e Mesopotâmia com propósitos especialmente medicinais e cosméticos, criando bálsamos, incensos e perfumes, por exemplo (Iberian Coppers Lda, 2022).

Atualmente, os sistemas de destilação modernos são compostos por sistemas contínuos, em contracorrente, onde o vapor e o líquido entram em contacto. A destilação funciona de acordo com o princípio que cada material tem uma diferente temperatura de ebulição (Katzen et al., 2009), separando as substâncias de acordo com estas diferenças. Assim, por exemplo numa mistura de etanol e água, a partir o aquecimento desta até à temperatura do componente mais volátil que será de 78,4 °C (temperatura de ebulição do etanol a pressão

atmosférica), neste caso. Após o etanol evaporar, o vapor depois condensa, obtendo etanol, ou a substância mais volátil, em forma líquida, separada da substância menos volátil, que é água, cuja temperatura de evaporação é de 100 °C.

A maioria dos sistemas de destilação são compostos por uma solução, que contém os componentes a separar, uma fonte de energia de modo a realizar o processo, o topo da coluna de destilação, que irá conter o produto purificado seguindo depois este material seguir para um condensador que condensa o vapor resultante da evaporação do produto obtido para o estado líquido (normalmente sendo arrefecido o vapor continuamente com água fria) e no fundo um produto contendo a mistura a destilar.

O vapor no topo da coluna, depois de condensado, pode ser dividido em duas correntes, uma sendo o produto e a outra corrente de refluxo, voltando para a coluna de modo a voltar a destilar o líquido restante (Katzen & Madson, 2009). A produção de bebidas destiladas (*fruit spirit drinks*) consiste em na preparação da matéria prima, consistindo no esmagamento e/ou trituração desta, na fermentação do preparado, a destilação do fermentado e a consequente armazenagem da bebida (Claus et al., 2005).

2.6. Extração de lípidos em soluções

Os fosfolípidos, triacilgliceróis e esteróis (principalmente colesterol em animais), são o tipo mais comum de gordura encontrado nas plantas e nos animais (Saini et al., 2021). Existem vários métodos de extração de lípidos numa solução (quer seja o uso de CO_2 supercrítico como uso de solventes orgânicos, por exemplo). No entanto alguns métodos requerem equipamentos cujo custo é elevado. Por isso é necessário selecionar o método de extração mais adequado, dependendo a seleção do tipo de lípidos a extrair, a origem da amostra (vegetal ou animal), o estado da solução (se está no estado líquido ou no estado sólido), NO conteúdo em lípidos e na humidade (Saini et al., 2021).

O método de *Folch* (publicado em 1957 (Saini et al., 2021) utiliza uma solução clorofórmio-metanol (com um rácio 2:1 por volume) para extrair lípidos de

células endógenas, utilizada na extração de lípidos em tecidos animais. As células são homogeneizadas e equilibradas com um quarto de volume da solução salina e misturados bem. A mistura resultante é separada em duas camadas, onde os lípidos ficam no topo. Este método é um dos métodos mais antigos na extração de lípidos (Kumar et al., 2015). Publicado em 1959, (Saini et al., 2021) o método de *Bligh e Dyer* é semelhante ao método de *Folch*, diferindo especialmente nos raios de solvente/solvente e tecido/solvente utilizados, extraíndo os lípidos de uma suspensão de células usando 1:2(v/v) de solução clorofórmio/metanol (Kumar et al., 2015). Estes métodos são considerados padrões de excelência na extração de lípidos. Embora originalmente foram desenvolvidos para extrair lípidos de tecidos animais a alta eficiência destes métodos foram considerados na extração de lípidos em plantas também. O método de *Folch* é preferencialmente utilizado em tecidos animais e o método de *Bligh e Dyer* em fluidos biológicos (Saini et al., 2021).

Embora os métodos mencionados anteriormente usem o clorofórmio como solvente de extração e têm altas eficiências de extração, a utilização destes solventes implica riscos ambientais tal como para a saúde, limitando ou até impedindo o uso destes. Deste modo o uso de solvente menos tóxicos, mesmo obtendo eficiências menores, serão melhores alternativas para estes solventes tóxicos. Solventes como etanol, Iso propanol, butanol, hexano, entre muitos outros e também várias combinações destes são exemplos de solventes que foram investigados como alternativas para extração de lípidos em microalgas (Kumar et al., 2015), melhorando os métodos de extração, combinando sistemas de extração com solventes com extração por métodos físicos. No entanto estes sistemas envolvendo solventes orgânicos, quando implementados a uma maior escala apresentam desvantagens. O grande investimento económico para o processo ocorrer, tal como os riscos ambientais que poderá causar devido ao uso dos solventes orgânicos, representam algumas das desvantagens que estes processos poderão ter (Kumar et al., 2015).

2.6.1. Decantação

O método utilizado para recuperar a gordura restante das soluções de bolacha foi a partir de um método de decantação simples, baseando-se na densidade dos componentes das soluções. A decantação é um processo utilizado para separar misturas com líquidos imiscíveis (líquido-líquido) ou misturas com sólidos (decantação sólido-líquido). Removendo a fase líquida mais próxima do topo do recipiente, ou seja, o líquido menos denso, livre de sólidos ou precipitados que se encontram numa solução ou o sólido a recuperar é a parte que será retirada da mistura ou solução, sendo o objetivo deste método obter um decantado livre de partículas ou para recuperar os sólidos/precipitados de uma solução. Assim, a decantação é um processo que separa dois líquidos imiscíveis ou um sólido numa suspensão transferindo a camada menos densa noutro contentor ou recipiente (Helmenstine, 2019).

Este processo depende da diferença de densidades de modo a separar o precipitado/sólido da solução ou para recuperar o líquido requerido. Deste modo haverá sempre alguma perda de material quer seja o precipitado que queremos ou o líquido a separar, devido à força de gravidade não ser suficiente para o sólido, ou o líquido cair, podendo também, assim este método ser demorado. Com isto, este método não dará um produto completamente puro (Helmenstine, 2019)

Existem vários designs de decantadores, e estes normalmente são de vidro (Helmenstine, 2019), o design mais simples será um decantador de vinho, com um corpo largo, mas um fundo estreito (Helmenstine, 2019).

O processo de decantação é muito utilizado para realização de separação de misturas em análises laboratoriais. No processo de tratamento de água das Estações de Tratamento de água (ETA), utiliza-se o processo de decantação para separar os resíduos sólidos provenientes da floculação da água seguido de sifonação. Algumas bebidas passam por processo de decantação para remover as partículas sólidas, como por exemplo, os vinhos, onde a borra residual é separada do líquido através deste processo. O processo de separação de misturas por decantação não envolve nenhum tipo de reação ou transformação

química, portanto a estrutura química dos componentes da mistura não se alteram após a separação (Helmenstine, 2019).

2.7. Quantificação de açúcares e etanol

2.7.1. Grau Brix ($^{\circ}Bx$)

O grau Brix ($^{\circ}Bx$) (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2013), quantifica a quantidade de sólidos solúveis, indicando a quantidade de açúcares que um líquido aquoso contem. Esta é nomeada em homenagem ao cientista alemão *Adolf Ferdinand Wenceslaus Brix*, que criou o grau *Brix* (Biographie, 1876).

A medição do grau *Brix* numa solução é usado para determinar a quantidade de açúcares presentes nessa solução, medida com um refratómetro, cuja escala é percentual de 0 % a 30 % (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2013).

Um grau *Brix* ($1^{\circ}Bx$) é igual a 1 grama de açúcar por 100 gramas de solução ou 1 % de açúcar. Assim, por exemplo, uma solução de $^{\circ}Brix = 25$, tem 25 gramas de açúcar por 100 gramas de líquido. Por outras palavras, os 100 g da solução decompõem-se em 25 gramas do açúcar da sacarose e a 75 g da água (BAC Online, 2020). Assim, a escala *Brix* é utilizada também na indústria alimentar, de modo a determinar a quantidade de açúcares em sumos, vinhos e cervejas (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2013)(Faraggi Massimo, 2022). A medição do grau *Brix* também é utilizado no cultivo de frutos e legumes indicando o sabor e qualidade destes (BAC Online, 2020).

2.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica, comumente utilizada, de análise e quantificação de compostos químicos (incluindo polímeros, bio polímeros e pequenas moléculas) através da separação dos componentes de uma amostra, sendo possível depois uma quantificação destes (Bower, 2022; Raman, 2016)(Bansal, 2010).

Nesta metodologia, que envolve várias separações, os compostos a ser separados serão distribuídos entre duas fases imiscíveis. As fases de HPLC são a fase móvel e a outra fase será a fase estacionária. (Baloch et al., 2021). Existem três modos de operações de cromatografia, eluição, frontal e cromatografia de deslocamento. Na eluição, que é o modo mais utilizado, a amostra é colocada ou injetada no início do sistema de cromatografia. A distribuição dos compostos e o tempo de retenção destes na coluna dependem da interação entre a fase móvel e a fase estacionária (Baloch et al., 2021) (Bansal, 2010). O método HPLC utiliza principalmente uma coluna que é preenchida com material/resina (fase estacionária), uma bomba que move a fase móvel ao longo da coluna e um detetor que mede o tempo de retenção dos analitos na coluna (sendo os detetores mais utilizados os detetores de Índice de refração (RI), detetores de luz ultravioleta (UV), detetores de fluorescência, de condutividade, etc.) e também um sistema que consegue gravar o sinal do detetor e armazenar os dados obtidos, sendo estes gravados como cromatogramas (Baloch et al., 2021) (Bansal et al., 2010).

A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido retido sobre um sólido ou um gel, que se encontra retida na coluna de cromatografia e a fase móvel pode ser líquida ou gasosa. As diferenças de polaridade dos componentes das amostras irão originar interações diferentes entre a fase móvel e a fase estacionária. Na coluna de cromatografia, a fase móvel passa pela fase estacionária, retendo os solutos das amostras sobre a coluna.

Como dito anteriormente, o tipo de fase estacionária e a composição da fase móvel determinam o tipo ou modo de cromatografia líquida a usar (Bansal, 2010; Raman, 2016). Dois dos tipos de cromatografia líquida que são utilizados são em fase normal ou em fase reversa. Na cromatografia de fase normal, na coluna a fase estacionária é polar e o eluente (ou seja, a fase móvel) a correr é apolar. Assim quando a amostra a analisar é injetada as moléculas polares serão retidas na sílica, aumentando as forças de adsorção quanto maior for a polaridade das partículas dos analitos, aumentando o tempo de retenção na coluna, sendo assim o tempo de retenção maior do que as de partículas

apolares. Quando se realiza a cromatografia em fase reversa, a fase estacionária será apolar (podendo ser partículas hidrofóbicas) e a fase móvel é polar (um exemplo de fase móvel seria uma mistura de água e metano), assim as partículas hidrofóbicas são retidas na coluna durante mais tempo. A cromatografia de fase reversa é operada baseada nos princípios das interações hidrofóbicas, que irão dar origem em forças de repulsão entre o eluente, as partículas apolares das amostras e da fase estacionária (Bansal, 2010; Bower, 2022; Raman, 2016). Outro tipo de cromatografia líquida será a cromatografia de troca iónica, que é comumente utilizada em purificação de água, cromatografia de proteínas, de carboidratos, oligossacarídeos e outros. O tempo de retenção desta cromatografia é baseada na atração iónica entre os iões do soluto a analisar e nas cargas da fase estacionária (Bansal, 2010). Em HPLC, a amostra a analisar, se for sólida, é primeiramente dissolvida de modo a formar uma solução (Raman, 2016) e depois a solução é diluída de forma a se encontrar no intervalo de concentração dos padrões ou das concentrações a analisar, de modo a que o tamanho da amostra seja pequeno, uma vez que a distribuição de concentração na coluna é mais simétrica e Gaussiana quando o tamanho da amostra é pequeno, sendo a eficiência deste método maior (Baloch et al., 2021; Bansal et al., 2010).

Para a análise de compostos é necessário verificar ou modificar ou estabilizar certas variáveis de acordo com o composto a analisar ou o protocolo utilizado. Estas variáveis são o caudal da bomba de fase móvel, a pressão, que é afetada pelo solvente e o caudal utilizado, o solvente da fase móvel, o tipo de coluna e os parâmetros de deteção (por exemplo comprimento de onda das emissões de UV) (Raman, 2016). O método de HPLC obtém informação de compostos, sendo estes a identificação de um composto e a quantificação deste, por exemplo. Como dito anteriormente, além de HPLC só servir para analisar e identificar compostos, existem certos tipos de HPLC que servem para a separação e purificação de certos compostos químicos. Assim outras aplicações de HPLC incluem, de acordo com Bansal et. al (2010) e Baloch et. al (2021), aplicações farmacêuticas, tais como o estudo de dosagem de produtos farmacêuticos, tais como a determinação da vida útil, identificação e quantificação de ingredientes,

ou seja, dos compostos químicos destes, contribuindo também para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

O HPLC também tem aplicações ambientais, tais como detecção de compostos fenólicos em águas para consumo, biomonitorização de poluentes, etc. No caso em aplicações na área alimentar, o método de análise de compostos de HPLC ajudará a assegurar a qualidade das bebidas, cervejas, serve para a análise de açúcares nos sumos de fruta, assegurando e melhorando a qualidade e também o sabor de produtos alimentares (Baloch et al., 2021; Bansal, 2010). Deste modo, de acordo com vários autores, tal como Baloch et al. (2021) e Bansal et al. (2010) concluem que a cromatografia líquida de alta Eficiência é um método de análise e identificação versátil, tem reprodutibilidade, sendo precisa, certa e específica na avaliação das amostras analisadas. Demonstrou-se que este método tem vários usos e aplicações em vários campos científicos, assegurando também a qualidade e quantidade dos produtos obtidos e/ou analisados.

Capítulo 3. Materiais e métodos

As bolachas, como dito no capítulo anterior, são compostas majoritariamente por amido (por volta de 70 %) e uma percentagem de gordura. Adicionalmente, de modo a se realizar a fermentação, o amido, necessita de ser decomposto em cadeias mais curtas, como a glucose, para que as leveduras fermentem os açúcares. Para isto, as enzimas que decompõem o amido em glucose, as 1-4- α -glucosidases e as pululanases, têm uma temperatura ótima de 60 °C.

No entanto, como referido no Capítulo 2, a partir dessa temperatura, a viscosidade da solução com amido começa a aumentar, começando a gelatinizar e, como estas enzimas só funcionam em substratos líquidos, fazendo sacarificação do amido num meio gelatinoso impossível. Para contornar este problema, recorre-se a uma liquefação, através da ação da enzima α -amilase, que quebra as cadeias longas de amido em oligossacarídeos, diminuindo a viscosidade da solução. No entanto, os oligossacarídeos não são fermentescíveis, necessitando de uma sacarificação de modo a fermentar o meio. Depois realiza-se a fermentação, em modo “batch” uma vez as análises realizadas têm volumes pequenos (até 1 L) com meio líquido, inoculando esta com a cultura de *S. cerevisiae* “Etanol Red”, majoritariamente utilizada nas indústrias alimentares. Também, como requerido pela Vieira de Castro, foi feito um processo simples de recuperação de gordura a partir da decantação.

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para a hidrólise das bolachas descartadas, para a fermentação destas em etanol e a destilação da solução com etanol de modo a obter uma solução com 70 % de etanol, tal como para a recuperação da gordura.

3.1. Materiais utilizados durante toda a experiência

Durante o todo projeto, a matéria-prima enviada pela Vieira de Castro foi utilizada para os processos de observação do comportamento das bolachas e para os ensaios enzimáticos (que consistem na liquefação e sacarificação em glucose das bolachas). Estas bolachas contêm vários ingredientes, tal como emulsionantes e aromas, que se encontram na tabela 1 tal como as informações

nutricionais (por cada 100g) de cada bolacha, retiradas a partir do site da Vieira de Castro (Vieira de Castro-a, 2022)(Vieira de Castro-b, 2022).

Tabela 1. Informação calórica sobre as amostras de bolachas providas pela Vieira de Castro.

Declaração nutricional por cada 100g	Bolacha “Tarteletes Morango”	Bolacha “Príncipe chocolate”
Energia (kcal)	417	499
Lípidos(g)	12,8	21,8
Hidratos de Carbono (g)	70,5	69,0
Açúcares livres(g)	36,4	26,1
Proteínas (g)	4	6
Sal (g)	0,7	0,6

3.2. Ensaios pré enzimáticos: Observação da matéria-prima ao aquecimento desta

Método de aquecimento da solução de bolachas descartadas a temperaturas de 40 °C, 60 °C e 90 °C.

De modo a confirmar a gelatinização da matéria-prima às temperaturas de 60 °C a 90 °C. Para isso, foi testado o comportamento da matéria-prima ao aumento de temperatura, fazendo experiências com soluções de água e bolacha descartada, submetendo estas a agitação e aquecimento, observando o aumento da sua viscosidade consoante o aumento de temperatura.

Em primeiro lugar, pesaram-se as massas das amostras de bolacha descartada (tartelete e príncipe) com uma balança analítica digital KB da KERN &SOHN, para as soluções com a concentração de glucose de 232g/L (que foi calculada pela equação A.1 nos anexos) sendo calculada a massa de bolacha a pesar a partir da equação A.2. nos anexos. Estas amostras foram pesadas num erlenmeyer de 10mL, tarando o peso do erlenmeyer e colocando as bolachas descartadas através de uma espátula ou colher e depois anotou-se o peso destas.

De seguida adicionou-se água destilada no erlenmeyer, colocando este na placa de aquecimento e agitação da marca IKAMAG modelo RCT, adicionando um magneto, tal como o sensor de temperatura incorporado (marca IKAMAG).

Depois aqueceu-se a solução, retirando amostras em microtubos de 1 mL. Medindo e anotando os valores de *Brix* quando a solução atinge a temperatura de 40 °C, 60 °C e 90 °C, e o comportamento desta consoante o aumento de temperatura. Quando a solução atinge os 90 °C, parou-se o aquecimento da solução com bolacha, retirando amostras para um microtubo, através de uma micropipeta. Adicionalmente, centrifugaram-se as amostras nos microtubos com uma centrifugadora laboratorial, de modo a verificar se haveria alguma fase líquida restante.

3.3. Leitura de *Brix*

Leitura do valor de *brix* das amostras

Para medir o grau *Brix* a partir do refratómetro, retira-se uma pequena quantidade da solução de bolacha, cerca de 200µL, através de uma micropipeta, colocando a solução no prisma do refratómetro digital, modelo HI96801 da *HANNA Instruments* retratado na Figura 3, medindo o *Brix* e depois retira-se a amostra do prisma, limpando, com água destilada e papel absorvente, a zona em que o líquido foi colocado.

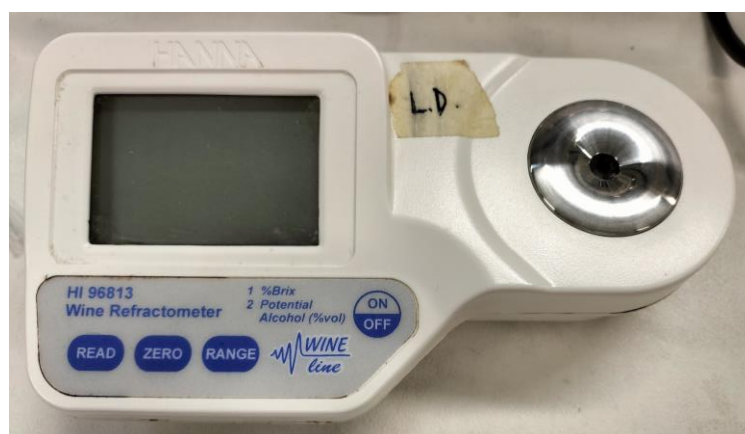


Figura 3. Refratómetro *Brix*, HANNA HI96801.

3.4. Ensaios enzimáticos Liquefação e sacarificação

Como, teoricamente as *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de fermentar soluções até 15 % (v/v) (Jacques, 2003; Puligundla et al., 2019), calculou-se a concentração teórica de glucose necessária para obter uma solução 15 % (v/v) de álcool, que seria uma solução com 232 g/L de glucose.

Pesagem da quantidade de bolacha necessária inicial

Foi calculada, a partir da equação A.2. que a concentração teórica necessária de bolacha seria de 329,16 g/L, para a bolacha tartelete e de 336,32 g/L para a bolacha príncipe, tendo em conta que a concentração de glucose seria o equivalente da concentração de hidratos de carbono descritas na Tabela 1 anterior.

Depois de calculada a concentração de bolacha necessária foi calculada a massa que será pesada para ensaios iniciais de 50 mL, cujos pesos serão de 16,45 g para amostra tartelete e de 18,82 g para amostra príncipe.

Cálculos da quantidade dos cocktails enzimáticos necessários

De seguida calculou-se as quantidades necessárias de enzimas para se realizar a liquefação, que se realiza com a adição do cocktail enzimática *ClearFlow AA* (consistindo na enzima α -amilase) e a sacarificação com a adição do cocktail enzimático *Optimax 4060 VHP* (pululanase e 1-4- α -glucosidase), calculando de acordo com a informação das fichas técnicas de ambos os cocktails enzimáticos, que foram fornecidos pela empresa COPAM.

De acordo com as fichas técnicas, seriam necessários 0,276L de cocktail enzimático *ClearFlow* e de 0,72(L/t) de *Optimax* para >96 % de sacarificação, durante 26 horas para cada tonelada de amido. Assumindo o amido como sendo as bolachas seria necessário apenas, para a quantidade previamente calculada de matéria-prima estão representados na tabela 2 as quantidades de enzima necessárias:

Tabela 2. Quantidade de matéria-prima e enzimas para os ensaios iniciais.

Amostras	Massa a pesar (g)	Volume de ClearFlow AA (μL)	Volume Optimax >96 %, 26h (μL)
Tartelete	16,45	5,7	4,6
Príncipe	16,82	11,8	12,1

Preparação das amostras e liquefação

Para a medição da massa de bolacha anteriormente calculada, pesou-se um erlenmeyer numa balança, tal como descrito na Figura 4.

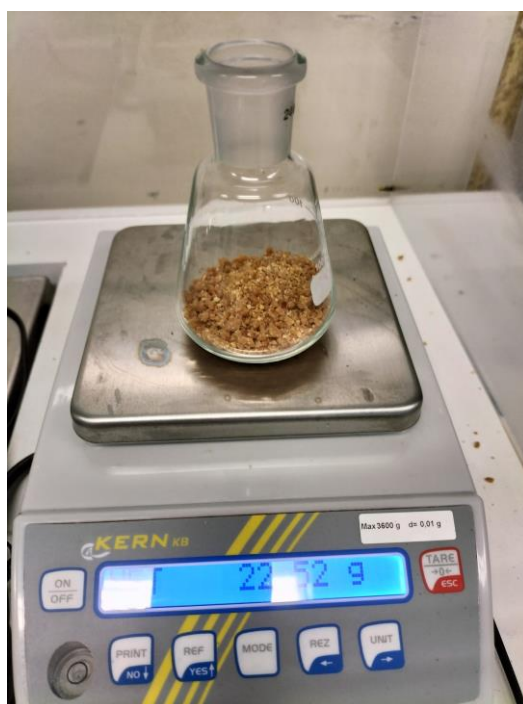


Figura 4. Medição do peso das bolachas descartadas.

Depois, mediu-se a quantidade calculada de bolacha numa balança analítica digital KB da KERN & SOHN, cujo erro é de $\pm 0,01\text{g}$. Depois, mediu-se 50mL de água destilada numa proveta, colocando este volume no erlenmeyer. De seguida, adicionou-se a quantidade do cocktail enzimático ClearFlowAA nos erlenmeyers, anteriormente calculado. De seguida colocou-se um magneto nos erlenmeyers, para agitar a solução, colocando-os numa placa de aquecimento e agitação da marca IKAMAG modelo RCT, medindo a temperatura com o sensor de temperatura incorporado, como ilustrado na Figura 5.



Figura 5. Modelo de liquefação de bolachas descartadas.

Depois aqueceu-se a solução de bolachas descartadas até esta atingir 95 °C (que é a temperatura de liquefação), mantendo a temperatura de 95 °C durante 2 h, de modo a realizar a liquefação. Após as 2 horas, deixou-se arrefecer a temperatura da solução para 60 °C e retirou-se uma amostra para medir o valor de *brix*. Depois, desligou-se a placa de aquecimento e retirou-se o íman.

Estando a matriz a 60 °C, inseriu-se uma quantidade previamente calculada do cocktail enzimático Optimax, responsável pela sacarificação da solução, e meteu-se o erlenmeyer numa incubadora (Incubadora Orbital *Infors HT minitron*) a 60 °C, com agitação, durante 24 horas. Passadas as 24 horas, retirou-se o erlenmeyer da incubadora laboratorial, retirando amostras em microtubos de 1 mL. De seguida mediu-se o *brix* destas, anotando os valores e depois prepararam-se as amostras para HPLC.

3.5. Fermentação alcoólica da glucose obtida a partir das bolachas

De modo a testar a capacidade de fermentação das soluções de bolacha, decidiu-se fazer as fermentações em volumes pequenos. Obtidas as condições ótimas desta, aumentou-se o volume das amostras para 1 L, por isto utilizou-se o método de fermentação líquida em condições anaeróbias.

Em primeiro lugar, preparam-se as culturas de *Etanol Red*, para se adicionarem nas soluções de bolachas, de modo a fermentá-las. Para isto preparou-se uma solução para que a cultura de *Etanol Red* cresça e depois a obter uma suspensão de leveduras.

Para isso, pesou-se, a partir de uma balança KERN ABJ120-9M, a quantidade calculada a partir das equações A.17., A.18. e A.19., de D-Glucose, Peptona e de extrato de levedura num erlenmeyer de modo a obter a solução YPD requerida. Depois, adicionou-se a quantidade de água descrita na secção A.2.8. no erlenmeyer, adicionando um magneto e agitando a solução numa placa de agitação magnética até a solução ficar uniforme. Depois retira-se o magneto e coloca-se uma tampa no erlenmeyer. Finalmente colocou-se o erlenmeyer com a solução YPD numa autoclave Sanyo MLS-2420U a 120 °C, durante 15 min, metendo também o material necessário para inocular o *Etanol Red* na solução de YPD (pontas de pipetas, água destilada, solução YPD), certificando que esta pode ser utilizada em segurança (verificando a pressão e o nível de água, tal como a temperatura em que estava).

Depois da autoclave terminar, certificou-se se era possível retirar o material em segurança. Depois do material arrefecer, pegou-se na cultura de *S.cerevisae Etanol Red* que se encontra numa placa vidro, num ambiente estéril ou seja, numa câmara de fluxo laminar, de modo a evitar a contaminação das soluções por outros microrganismos que poderão estar no ar.

Na camara de fluxo laminar *Kojair KR-105 Basic*, pegou-se numa ança e retirou-se uma parte do *Etanol Red*, colocando este no erlenmeyer, com a solução de YPD, até se verificar que o Etanol RED se encontra todo na solução. De seguida, fechou-se o erlenmeyer com uma rolha, etiquetou-se e meteu-se as soluções

com a suspensão de levedura numa incubadora tal como a descrita na Figura 9, de modo que o *Etanol Red* cresça. Esta suspensão esteve a uma temperatura de 30 °C, durante 24 horas, numa incubadora, como a representada pela Figura 6.



Figura 6. Exemplo de uma incubadora onde se irá realizar o crescimento das *S.cerevisiae*.

Fermentação das soluções:

De modo a fermentar as soluções de bolacha descartada, adicionou-se um volume de suspensão de leveduras, que para o caso de uma fermentação das soluções de volume de 1L, a um rácio de volume de suspensão de levedura por volume de amostra a fermentar de 1:5, 100 mL de solução de leveduras suspensas, de acordo com a secção de anexos A.2.9.

Para que as soluções fermentem em condições ótimas, as soluções com amostras devem estar a pH's entre 4,5 e 5,5. Logo, com um medidor de pH, mede-se o pH da solução num medidor de pH da marca *Hanna* modelo HI 2210, ajustando, adicionando soluções de NaOH e de HCl de 1 (mol/L), o valor de pH para o valor desejado. Depois, mediu-se a quantidade requerida de solução de suspensão de levedura em *falcons* centrifugando-os com uma centrifugadora *Scanspeed 416G*. Centrifugadas as soluções com levedura suspensa, o Etanol

Red irá estar no fundo do *falcon*. Entretanto, transferiram-se as soluções com bolacha para erlenmeyers novos com *airlocks*, dentro da câmara de fluxo laminar. De seguida retirou-se o líquido com YPD, para o erlenmeyer com a solução YPD original, restando apenas o pellet nos *falcons*.

Para as soluções realizarem as fermentações, suspenderam-se os pellets com Etanol Red com 1 mL de água, adicionando a suspensão para as soluções com as amostras de bolacha.

Para criar um ambiente com condições de fermentação anaeróbica, fecharam-se os erlenmeyers e adicionou-se glicerol nos falcons/ependorfs dos *airlocks* de modo a não entrar oxigénio nas matrizes, obtendo assim a Figura 7.



Figura 7. Modelo de um fermentador em condições anaeróbicas.

Depois da inoculação, desinfetou-se o espaço utilizado anteriormente (câmara de fluxo laminar ou bancada) com álcool etílico. Finalmente, colocaram-se os erlenmeyers tal como o da Figura 7 numa incubadora (Incubadora Orbital Infors HT minitron) a 37 °C, tapando-os, pesando-os, anotando o peso, data e hora de pesagem.

3.6. Destilação

De modo a se realizar a destilação das soluções fermentadas, é necessário montar os equipamentos. Para isso, montou-se o sistema de destilação desligado (Coluna de destilação de vidro (com altura de 40 cm), Manta de aquecimento P-selecta Fibroman-C, transformador Zenith Eletrics, condensador, bomba de água fria, sensor de temperatura), ficando como a figura 8, excluindo o balão de destilação.



Figura 8. Sistema de destilação da solução obtida pela fermentação.

Com o sistema montado, adicionaram-se esferas de vidro ao balão de destilação representado na figura anterior, adicionando a solução a seguir. Depois colocou-se o balão de destilação no sistema, de modo que este esteja seguro e não haja

perdas de vapor, ou de pressão. Ligaram-se as bombas de água, de modo que água fria circule na coluna de condensação de refluxo liso (Liebig), circulando em contracorrente ao destilado de modo a haver um arrefecimento mais eficiente da destilação. Depois ligou-se a manta de aquecimento da marca *P-selecta*, colocou-se um sensor de temperatura no topo da coluna de destilação fracionada de modo a medir e controlar a temperatura de evaporação da solução, que foi ajustada a partir do transformador da *Zenith Eletronics*, para que a coluna de destilação se mantenha a uma temperatura superior à temperatura de ebulição do etanol, neste caso 78,4 °C. Depois, colocou-se um funil e um falcon no fim da coluna de condensação como descrito na Figura 9, de modo a captar o etanol destilado, captando em frações com volume aproximadamente 10 mL, a obter frações de volumes iguais, etiquetando-as com os seus respetivos nomes.



Figura 9. Falcon com o etanol destilado.

Após obter 10 a 13 frações de 10 mL, desligou-se o sistema (manta de aquecimento, bomba de água, transformador, etc.) e deixou-se arrefecer o balão de destilação e os equipamentos de vidro, de modo a retirar a solução. Estando

o balão de destilação suficientemente frio, colocou-se a solução restante nos frascos respectivos, separando as esferas de vidro da solução.

3.7. Recuperação da gordura: Decantação

Decantação da gordura restante nas soluções

Com as destilações completas, procedeu-se à recuperação da gordura presente nas soluções. Para isto, os frascos com as soluções foram colocados numa incubadora *Termacks B8260*, aquecendo-as a 50 °C, de modo a haver uma separação de “fases” sendo a gordura que se pretende recuperar a fase menos densa. Pesaram-se os gobelets vazios numa balança digital KB da KERN & SOHN (Figura 10), marcados com o devido nome, e anotados os pesos destes.

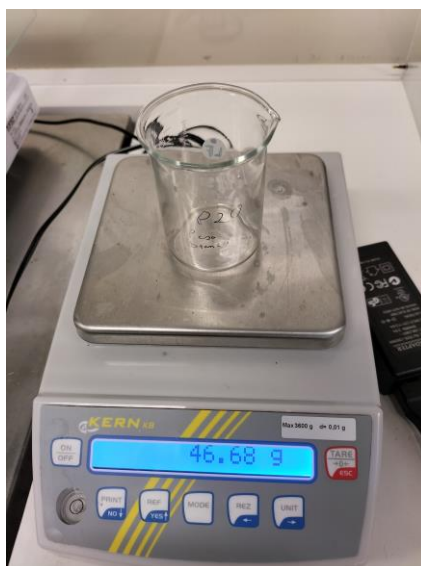


Figura 10. Pesagem dos gobelets sem gordura.

Depois colocaram-se as amostras em frascos (Figura 11), ajustando os pesos com a ajuda de pipetas de plástico, onde serão centrifugados numa centrífuga *Thermo Fisher Sorvall Legend XTR*, a velocidades de 8000 rotações por minutos, durante 10 min, a 30 °C, de modo a separar a gordura do resto da solução. Depois colocaram-se os frascos de volta na incubadora a 50 °C de modo que a gordura separada fique na fase líquida, fazendo a decantação líquido-líquido a quente.



Figura 11. Frascos para centrifugação.

Depois de se assegurar que a solução e a gordura se encontram em fase líquida, verteram-se as amostras numa ampola de decantação ilustrada pela Figura a seguir, onde se esperou que a solução “assenta-se” ou seja, até se notar uma diferença de densidades dos líquidos diferentes, como na Figura 12.



Figura 12. Esquema de decantação.

Após obter-se fases visivelmente diferentes, separaram-se as fases de solução restante da fase no topo, que contem a gordura, vertendo assim o líquido indesejado para um contentor que está ilustrado na Figura 12, deixando a camada com gordura dentro da ampola de decantação. De seguida verteu-se o conteúdo líquido para os gobelets vazios, onde foram pesados na balança digital

anteriormente mencionada. Finalmente, estes gobelets com a gordura foram submetidos a um aquecimento a 104 °C de modo a evaporar qualquer água que esteja na solução, durante 1 a 2 dias, retirando estes da incubadora e voltando a pesar e anotar o peso destes.

3.9. Método de quantificação de glucose e de açúcares fermentáveis utilizados

3.9.1 Quantificação de glucose e etanol

De modo a obter os valores de concentração de glucose e de etanol das amostras retiradas, estas foram submetidas a uma cromatografia líquida de alta eficiência.

3.9.1.1. Método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

No entanto, para analisar as amostras, estas têm de ser preparadas em vias de HPLC e diluídas para o intervalo de análise, que é ditado pela reta de calibração, realizada pela cromatografia de amostras padrão.

Preparação das amostras padrão para HPLC

Para preparar as amostras padrão, calculou-se uma quantidade de D-glucose (Nº CAS 50-99-7) ou etanol 99 % (v/v) que será medida para fazer uma solução de concentração de 25 g/L num balão volumétrico de 25 mL, onde a partir desta serão feitos os padrões com concentrações mais baixas (ex:20 g/L, 10 g/L, etc.). Depois pesou-se a quantidade calculada (um exemplo deste cálculo encontra-se na seção A.8. no cálculo de quantidade de D-glucose para uma solução de 20 g/L) de glucose para um gobelet, mede-se 10ml de água e mete-se no gobelet, agitando a solução, depois deita-se a solução num balão volumétrico de 25ml e mete-se água até ao risco do balão perfazendo os 25ml, tal como retratado na Figura 13. Este método foi repetido para as amostras de padrão para etanol.



Figura 13. Solução-padrão usada para HPLC.

Depois filtrou-se a solução de glucose tal como a de água destilada e mediu-se com micropipetas as quantidades necessárias para cada diluição. A seguir, submetem-se os microtubos a um vortex, da marca Heidolph REAX 2000 e filtrou-se com filtros para seringa ChromaFIL 0,45 μ m, a solução diluída para os vials de HPLC, estando assim as amostras padrão prontas para cromatografia.

Método de preparação das amostras de solução com bolacha para HPLC

Para a preparação das amostras das soluções a analisar, centrifugaram-se os microtubos contendo as amostras, centrifugando-as durante 5 min numa centrífuga *Scanspeed 416G*, por exemplo. Depois, diluíram-se as amostras (para a diluição 1:10 pois a quantidade de açúcares na amostra era demasiado elevada para HPLC, 150 μ L amostra, 1350 μ L e água destilada num em microtubos). De seguida agitaram-se os microtubos num vortex para homogeneizar e depois filtraram-se as amostras para vials de HPLC anteriormente identificados, armazenando-os para uma cromatografia posterior. Com as amostras preparadas para cromatografia, será necessário preparar o cromatógrafo, tal como a fase móvel utilizada.

Preparação de fase móvel para HPLC

Para a fase móvel, colocou-se 2 L de água destilada num frasco. A seguir, adicionou-se com uma micropipeta, 555 μL de solução H_2SO_4 >95 %, em segurança, no frasco de 2 L, de modo a solução ter a concentração de 0,05 mol/L. Depois filtrou-se a solução com 0,05 mol/L de H_2SO_4 , vertendo num funil de Buchner com um filtro Acetato de 0,22 μm para o sistema de filtração a vácuo (bomba peristáltica Gast DOA-P504-BN ligada a um kitassato, onde a solução filtrada irá cair). Finalmente, de modo a obter a fase móvel, verteu-se a solução filtrada no frasco de 2 L (Figura 14), etiquetando-o e tapando com uma rolha.

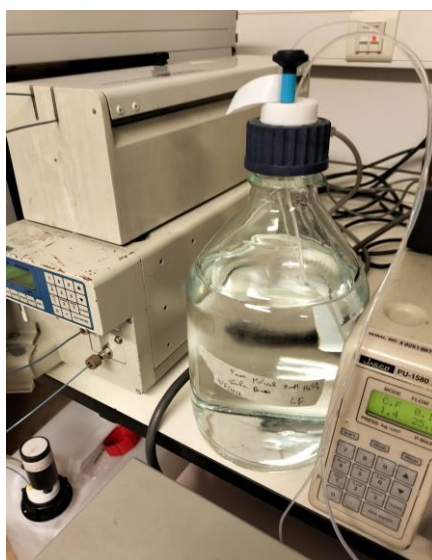


Figura 14. Fase Móvel contendo 0,05 mol/L de H_2SO_4 para HPLC.

Preparação do sistema de cromatografia líquida para análise.

Para analisar soluções de bolacha descartada e de modo a obter as concentrações de glucose e etanol presentes nas amostras, será necessária uma preparação do sistema de cromatografia líquida, onde estão incorporados uma coluna de troca iónica *SFD* onde esta será realizada a 60 °C, uma bomba isocrática *JASCO PU2087 PLUS*, onde a fase móvel irá ser circulada, um detetor de índice de refração (RI) *JASCO RI2031*, um detetor de UV *UV KNAUER K-2501*, um amostrador automático *JASCO AS2057 PLUS*, ilustrados na Figura 15.



Figura 15. Cromatógrafo de HPLC, com (da esquerda para a direita) uma bomba isocrática, autosampler, coluna de troca iônica e detetores UV e RI.

Primeiro, verificou-se se haveria fase móvel suficiente para as soluções todas, e, com esta preparada, verifica-se se esta não tem bolhas de ar e procede-se à preparação do sistema de cromatografia HPLC. Em primeiro lugar, liga-se a fase móvel à bomba isocrática e ajusta-se o caudal de fase móvel, aumentando-o até ao valor pretendido, que será de 0,6 mL/min, assegurando que a pressão esteja estável, monitorizando-a. Depois colocou-se a coluna de troca iônica no forno, onde esta aquece-a de modo a atingir os 60 °C, temperatura que será realizada a troca iônica e verifica-se os detetores de RI e de UV, assegurando-se que o ecrã de ambos se encontra a 0.

A seguir colocaram-se as amostras no amostrador automático e programou-se um ciclo de leitura de amostras de HPLC, no computador ao lado do cromatógrafo, dependendo do componente a analisar. Por exemplo, para analisar amostras com glucose e etanol, programou-se cerca de 27 min de leitura por amostra. Após todas as amostras serem analisadas, retirou-se os vials da câmara do amostrador automático, guardou-se os cromatogramas lidos pelo computador ligado aos detetores UV e RI, obtendo assim os cromatogramas, onde, através da sua análise serão obtidos os valores de concentração de glucose e de etanol, a partir da integração das curvas nos cromatogramas a partir do programa *STARChart*.

Por fim, após retiradas as amostras e obtidos os cromatogramas, procede-se a baixar o caudal da bomba isocrática, monitorizando e mantendo a pressão estável, até esta atingir 0,1 ml/min, desliga-se forno da coluna de troca iónica, deixando esta arrefecer e tarou-se os detetores UV e RI, desligando-os.

Capítulo 4. Resultados e discussão

4.1. Ensaio iniciais de observação de comportamento da matéria-prima

A partir dos procedimentos dos ensaios preliminares, foi observado e verificado o aumento da viscosidade da matéria-prima à temperatura, descrevendo o método no Capítulo 3 subseção 3.2. Quando as amostras foram aquecidas a 40 °C, não se notou grande diferença. Quando a temperatura desta aumentou para os 60 °C, notou-se que a solução de bolacha começou a tornar-se viscosa, no entanto esta ainda estava líquida, sendo ainda possível a agitação desta. No entanto, quando a temperatura da solução chegou aos 90 °C, denotou-se que esta a viscosidade desta era consideravelmente superior, ficando gelatinosa, sendo quase impossível retirar amostras e sendo impossível medir o nível de *brix*. Estes resultados estão de acordo com Mamat & Hill (2018), onde a temperatura de gelatinização do amido é de cerca de 90 °C. Deste modo, verifica-se a necessidade de haver uma liquefação prévia de modo a se realizar a sacarificação do amido em glucose.

4.2. Ensaio enzimáticos de liquefação e sacarificação

Depois da liquefação das primeiras amostras, seguida de uma sacarificação a 60 °C recolheram-se amostras das soluções de bolacha príncipe (P9m) e da bolacha tartelete (T9m) que depois foram analisadas por HPLC, sendo analisada a concentração de glucose obtida na sacarificação. De seguida calculou-se a eficiência da sacarificação (ES), a partir do valor de glucose que se pretende obter numa sacarificação completa (CGT) e a concentração de glucose obtida na sacarificação (CGS) (Tabela 3):

Tabela 3. Resultados das sacarificações iniciais de 9 a 13 de maio.

Amostra	CGT (g/L)	CGS (g/L)	ES (%)
P9m	232	182,307	78,580
T9m	232	190,127	81,951

A partir da observação da Tabela 3, não se conseguiu obter a concentração de glucose que teoricamente seria obtida pela sacarificação, obtendo uma

eficiência de sacarificação de cerca de 80 %. Como, a partir das fichas técnicas dos cocktails enzimáticos, as enzimas de sacarificação conseguem obter eficiências de >96 %. Assim, de modo a otimizar estas eficiências realizaram-se mais ensaios de modo a otimizar a hidrólise enzimática.

4.2.1. Otimização de condições de liquefação e sacarificação

4.2.1.1. Primeiros ensaios de otimização (P16 e T16)

Com estes resultados concluiu-se que será necessário melhorar a eficiência das sacarificações. Para isso, voltou-se a calcular uma nova concentração de bolachas de modo a ter uma concentração de 232 g/L de glucose calculando com linearidade dos valores de glucose teóricos. Estes matrizes denominados P16 e T16 foram depois submetidos a uma fermentação de modo a ter uma perspectiva do tempo de fermentação das soluções com bolachas.

Na tabela 4 a seguir, encontram-se as concentrações obtidas de bolacha nas soluções, tal como o rácio (g sólido/ g líquido), que mais tarde se provou ser uma medida mais precisa da quantidade de bolacha e água na solução e o grau de *Brix* ($^{\circ}\text{Bx}$) medido antes e após a sacarificação, obtendo assim uma expectativa de açúcar que serão fermentáveis na solução.

Tabela 4. Correlação do valor de $^{\circ}\text{Bx}$ com a massa de bolacha e o rácio bolacha/água usado.

Amostra	Massa BP (g)	Rácio bolacha g/ml	$^{\circ}\text{Bx}$ antes sac.	$^{\circ}\text{Bx}$ após sac.
T16	20,25	0,405	26,8	27,1
P16	21,41	0,4282	27,1	27,6

Com a observação da tabela 5, nota-se que o valor de *Brix* não mudou muito após a sacarificação deste, podendo este resultado indicar que a quantidade de açúcares fermentáveis será a mesma na solução. No entanto, a medida de *Brix* apenas foi feita de modo a ter uma expectativa dos açúcares que obteríamos se se sacarificar a solução com uma eficiência de 100 %.

Assim, mesmo se a sacarificação não tiver essa eficiência, o valor de *Brix* seria semelhante. Deste modo a leitura de *brix* não equivale a uma medida de

concentração da glucose exata, sendo apenas feita como uma previsão dos açúcares obtidos, antes da hidrolisação da solução.

Na tabela 5, obteve-se a concentração de glucose obtida da sacarificação e as respectivas eficiências destas:

Tabela 5. Resultados da sacarificação das amostras P16 e T16.

Amostra	CGS (g/L)	CGT(g/L)	ES %
P16	237,81	285,52	83,3
T16	207,7	295,5	70,3

4.2.2. Segundos ensaios de otimização das condições de hidrólise enzimática

Visto que as eficiências, dos ensaios anteriores continuam relativamente baixas, decidiu-se aumentar a quantidade de bolacha seguindo a linearidade de Brix, onde exemplos de cálculo se encontram nos anexos, seção A.2.5., obtendo os valores de razão bolacha processada por água usada (B/A) ótimo para a bolacha tartelete e para príncipe (ensaios T23, P23 e P24), e a partir os rácios obtidos calculou-se as quantidades dos cocktails enzimáticos a pesar a partir dos cálculos na seção A.2.4, nos anexos. Fizeram-se as liquefações e sacarificações, obtendo as concentrações de glucose da sacarificação (CGS) e as eficiências de sacarificação (ES), apresentando os resultados na seguinte tabela:

Tabela 6. Resultados das sacarificações das amostras T23, P23 e P24.

Amostra	Razão (B/A) (g/mL)	CGS (g/L)	ES (%)
T23	0,45	239,41	75,5
P23	0,45	218,33	70,3
P24	0,58	259,98	64,5

Observa-se, a partir da tabela anterior que a eficiência de sacarificação, para a bolacha príncipe em rácio grama de bolacha por grama de água 0,45 é de 70 %, enquanto no rácio 0,58 esta se encontra nos 64 %. Também se observa que para o rácio B/A 0,45 na bolacha príncipe a concentração de glucose obtida aproxima-se ao valor desejado, que seria de 232 g/L, podendo este valor ser

melhorado ao aumentar a quantidade de cocktail enzimático ou outros parâmetros. Finalmente, na bolacha tartelete o valor de glucose obtida no mesmo rácio mencionado anteriormente obtém um valor ótimo de glucose obtida, sendo ligeiramente superior ao desejado (239 g/L). Com estes resultados, escolheu-se assim um rácio de bolacha-água (g/mL) de 0,45 que permite obter 232 g/L de glucose a partir das bolachas e utilizando este rácio para experiências seguintes. Adicionalmente, na liquefação, não se observou problemas, por isso decide-se manter os valores calculados no capítulo 3, seção 3.3 e nos cálculos anexos na seção A.2.4.

4.2.3. Ensaios finais de otimização das condições de hidrólise (P31 e T31)

Como as eficiências ainda não estavam nas condições ótimas (>96 %) fez-se um cálculo linear da quantidade de enzima *Optimax* que se deve adicionar, tendo em conta a concentração de glucose obtida (CGS) e os açúcares, que teoricamente se encontram nas bolachas (GT), realizados na secção A.2.5, obtendo os valores calculados. Adicionalmente decidiu-se testar se o aumentando do tempo de contacto com enzima afetaria a eficiência de sacarificação. Assim, os resultados das sacarificações de 31 de maio encontram-se na seguinte tabela 7, sendo os ensaios retirados 26 h após a sacarificação nomeados ST26 para a tartelete e PS26 para a amostra príncipe, tal como para 48 h (ST48 e PS48):

Tabela 7. Resultados de sacarificação de ensaios T31 e P31 variando o tempo de contacto da enzima.

Amostra	CGS (g/L)	GT (g/L)	ES (%)
ST 26	251,41	317,25	75,9
ST 48	240,85	317,25	79,2
PS 23	265,21	310,50	85,4
PS 48	292,35	310,50	94,1

Assim, observa-se que aumentando a carga enzimática, em relação aos ensaios anteriores, a eficiência aumentou para valores entre 75 % e 94 %.

Adicionalmente observou-se também que o aumento do tempo de contacto, comparando com as amostras que sacarificaram 26 horas com as que completaram aproximadamente 48 horas, melhorou as eficiências de 80 % a 90 %, próximas com as teóricas, que seriam de 96 %, sendo a amostra príncipe com uma maior eficiência de 94 %, obtendo 292 g/L de glucose.

Estas amostras foram depois submetidas a uma fermentação por *Etanol Red*, sendo os resultados destas explicitados na secção de resultados das fermentações.

4.2.4. Influência do pH na liquefação e na sacarificação

Adicionalmente, testou-se a influência do pH na liquefação e na sacarificação, de modo a verificar se a monitorização do pH destas seja necessária. Assim, mediram-se e ajustaram-se os pH's para os intervalos ótimos das enzimas (para a liquefação é de no intervalo de 5.5-5.8 e para a sacarificação o valor de pH ótimo é de 4 a 4.2) o pH das soluções no início da liquefação e da sacarificação, tirando amostras, obtendo os resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados da hidrólise enzimática com monitorização do pH.

Amostras	pH liq. ajustado (23°C)	pH Sac. ajustado (23°C)	CGS (g/L)	GT (g/L)	ES (%)
TL 48h	5,54	4,15	212,10	317,2	66,8
PP48h	5,74	4,18	246,32	310,5	79,3

Observou-se que as eficiências de sacarificação diminuíram, provavelmente devido ao pH do meio variar consoante o aumento da temperatura. Como as enzimas não conseguem realizar a sacarificação a pH's fora dos intervalos descritos pela ficha técnica, a variação de pH poderá ter levado a estas realizarem a sacarificação condições sub-ótimas, levando assim a uma diminuição na eficiência de sacarificação. Na liquefação, no entanto, não se notou problemas, com ou sem ajuste de pH, pois obtiveram os mesmos resultados. Com isto, conclui-se que o ajuste de pH na liquefação e sacarificação não será necessário para ensaios futuros, uma vez que não havia um sistema que controlasse e monitorizasse o pH da solução continuamente.

4.3. Resultados de fermentação

4.3.1. Fermentação dos matrizes de T16 e P16

Para as fermentações das sacarificações dos ensaios de sacarificação T16 e P16, passando depois a serem renomeados de FP16 e FT6, escolheu-se utilizar um inóculo com rácio de (1:10) da solução de bolacha. A temperatura de fermentação foi de 28 °C, e não se monitorizou o pH dos ensaios. A seguir, na Figura 16 está ilustrado uma evolução da fermentação de tartelete e de príncipe, apresentando um gráfico, em peso de CO_2 libertado ao longo do tempo.

O método utilizado para descrever a evolução das fermentações foi a partir da pesagem das amostras em questão, calculando o CO_2 a partir das diferenças de pesos das amostras. Como como os valores de etanol produzido, em base mássica, se aproximam dos valores de CO_2 libertado, fez-se uma estimativa por aproximação sobre a evolução de produção de etanol, permitindo observar quando a fermentação estabiliza, parando a fermentação, ou seja, a produção de etanol. Assim, ilustra-se a evolução a fermentação dos ensaios de bolacha, podendo obter uma expectativa da duração destas.

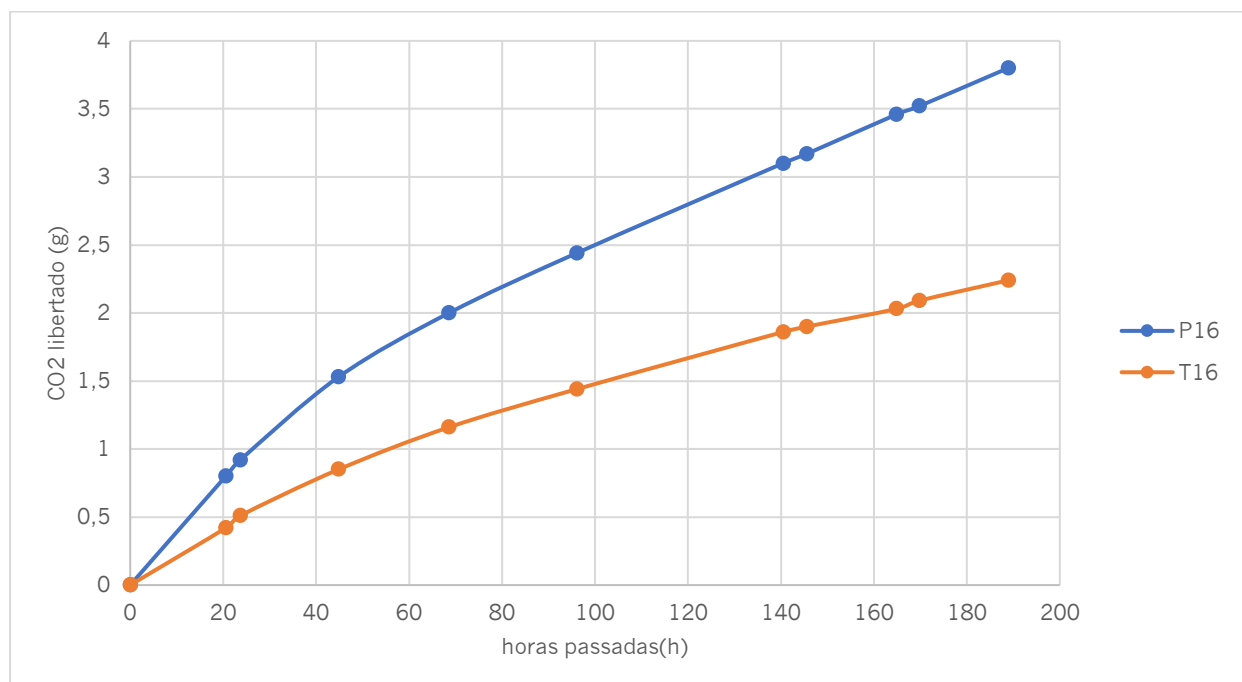


Figura 16. CO_2 libertado ao longo do tempo das amostras de T16 e P16.

A partir da Figura 16, observa-se que as fermentações demoraram 188 horas, aproximadamente uma semana, sendo o aumento da quantidade de CO_2 libertado lento também.

Isto pode dever-se ao facto de a gordura interferir na fermentação ou de haver inibição por substrato. Adicionalmente, o facto de não ter havido uma monitorização do pH poderá influenciado a fermentação, estando a solução ser fermentada em condições sub-ótimas, em termos de pH. Estas observações estão de acordo com os dados, (concentração de etanol (CEt), concentração de glucose restante (CGR), concentração de glucose de sacarificação (CGS), conversão de glucose (CG) calculada a partir da CGR e CGS e o teor de álcool) na Tabela 9 a seguir:

Tabela 9. Resultados de fermentações das amostras T16 e P16.

Amostra	CEt (g/L)	CGR (g/L)	CGS (g/L)	CG (%)	% Álcool (v/v)
T16	44,13	99,97	207,71	51,9	5,6
P16	71,50	36,22	237,81	84,8	9,1

O teor de álcool para as amostras de tartelete corresponde a valores menores aos valores de 15 % (v/v) esperados, como descrito no capítulo de Materiais e Método anteriores. Isto pode ser devido ao facto de a fermentação não ter ocorrido em condições ótimas, quer seja de temperatura, onde as fermentações ocorreram a 34 °C, nem em termos de pH, devido a não haver um ajuste de pH nas amostras. Também poderá ter ocorrido uma inibição pelo substrato ou pela influência de ingredientes não estudados nas bolachas, por exemplo.

4.3.2. Fermentações das amostras T23 e P23

Como as fermentações se provaram como muito lentas demorando cerca de 190 horas, decidiu-se aumentar a carga de inóculo de ER (*Etanol Red*), utilizando um rácio de 1:5 da solução, ou seja, 10ml. Para estas fermentações, foi medido e ajustado o pH, para o pH ótimo de fermentação, que será entre 4,5 e 5,15, as fermentações foram realizadas a 37 °C. A Figura 17 a seguir ilustra a evolução

da fermentação de T23 e P23, passando estes ensaios a ser denominados FP23 e FT23.

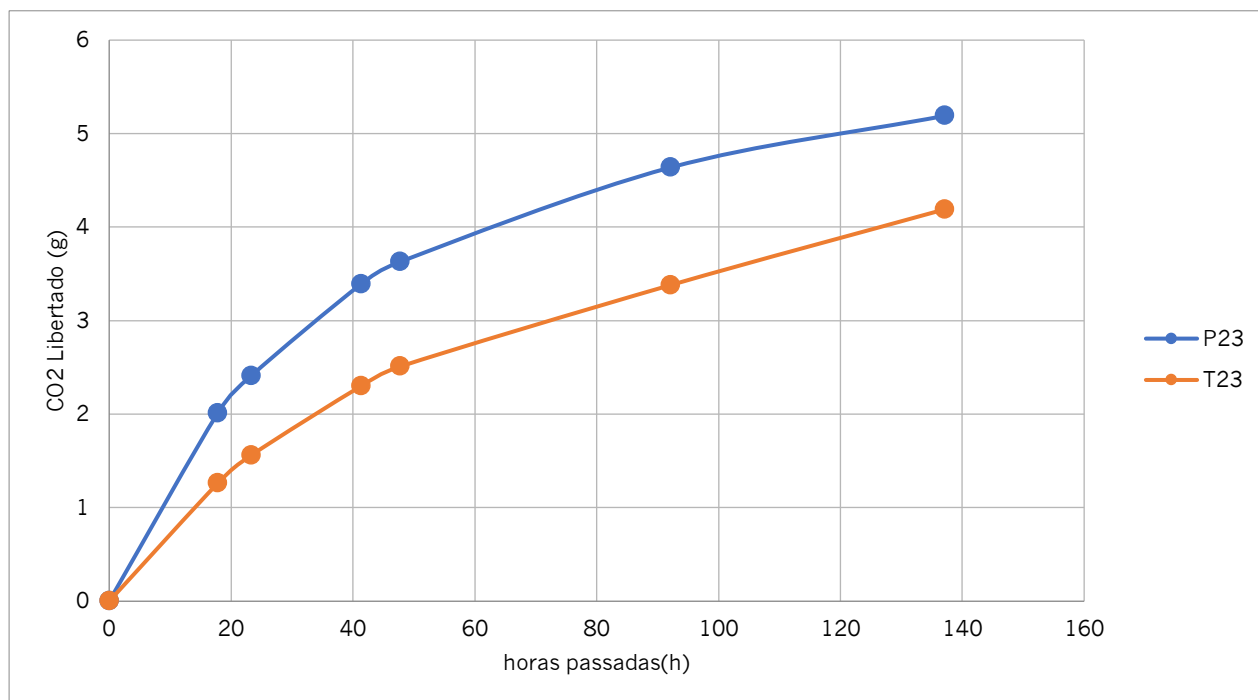


Figura 17. CO_2 libertado ao longo do tempo pelas amostras T23 e P23.

Através da observação do gráfico da Figura 17, consegue-se verificar que após 137 horas ainda não se libertou todo o CO_2 que era previsto, mas, no entanto, a libertação deste estabilizou por volta das 92 horas. Nestes ensaios, o teor de CO_2 , teve um aumento mais rápido de libertação deste, tal como em quantidade, no entanto, isto não encurtou o tempo de fermentação, uma vez que este é aproximadamente o mesmo. No entanto decidiu-se manter a quantidade de inóculo a utilizar.

Na tabela 10 a seguir estão os resultados das fermentações de T23 e P23.

Tabela 10. Resultados das fermentações T23 e P23.

Amostra	CEt (g/L)	CGR (g/L)	CGS (g/L)	Conversão de glucose (%)	% Álcool (v/v)
FT 23/5)	67,24	44,58	239,41	81,4	8,52
FP 23/5	82,42	9,14	218,33	95,8	10,44

Verifica-se que nas fermentações não se obtêm concentrações de 15 % (v/v), no entanto, comparando com as fermentações anteriores as concentrações são mais altas, aproximando-se dos 10 % (v/v), sendo uma concentração aceitável. Decidiu-se fermentar os ensaios de T31 e P31, de modo a observar se as concentrações de etanol das soluções aumentam.

4.3.3. Fermentações de 31 de maio

Nestas fermentações, tal como nas fermentações anteriores decidiu-se manter a carga de levedura a um rácio de 1:5, houve uma monitorização de pH e as fermentações realizaram-se a 37 °C.

Como os ensaios T31 e P31 foram fermentados, (renomeando estes FP31 e FT31 em condições praticamente idênticas aos ensaios FT23 e FP23, decidiu-se comparar estas fermentações, obtendo assim o gráfico da Figura 18 Seguinte, uma vez que estes possuem a mesma carga de matéria-prima, mas carga de enzima diferente.

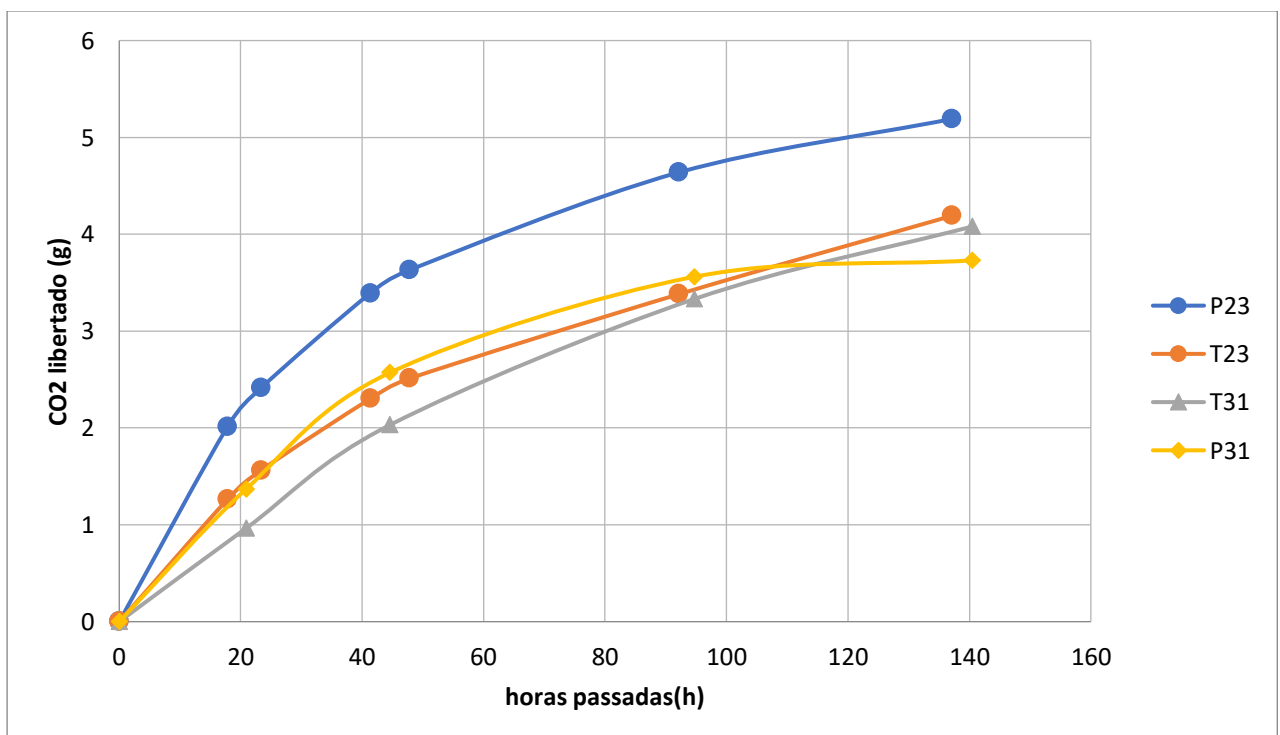


Figura 18. Comparação das fermentações das amostras T23 e P23 e das amostras T31 e P31.

Pela observação da Figura 18 denota-se que as fermentações das amostras de P23 e T23 libertaram uma quantidade maior de CO_2 em relação às fermentações

T31 e P31, no entanto a partir da observação da tabela 6, estas fermentações não produziram uma maior concentração de etanol, para ambas as amostras de bolacha príncipe e de tartelete. Isto pode-se dever ao modo como os gráficos da evolução de CO_2 libertado ao longo do tempo são construídos. A medição de CO_2 é feita a partir das diferenças de massa das amostras, logo a libertação de CO_2 não equa a uma maior concentração de etanol produzida, pois, se houver qualquer fuga de material nos fermentadores, sendo a glicose o mais provável, esta irá influenciar os gráficos, podendo assim também explicar a estabilização mais rápida da amostra P31, em comparação com o resto destas.

Tabela 11. Resultados das hidrólises enzimáticas e fermentações das experiências realizadas.

Amostra	C EtOH (g/L)	RL	CGR (g/L)	CGS (g/L)	% CG	% Álcool
FT 15	44,13	1:10	99,97	207,71	51,9	5,6
FP 15	71,50	1:10	36,23	237,81	84,8	9,1
FT 23	67,24	1:5	44,58	239,41	81,4	8,5
FP 23	82,42	1:5	9,14	218,33	95,8	10,4
FT 31	76,905	1:5	34,25	251,41	86,375	9,7
FP 31	85,990	1:5	21,61	292,31	92,6	10,9

Obtidos os valores de concentração de glucose restantes de etanol produzido e comparando com a concentração de glucose obtida na sacarificação conseguiu-se calcular a percentagem de conversão de glucose em etanol (CG) na tabela 6.

Com a observação da tabela podemos ver que os ensaios P16 e T16 são os que obtiveram menor concentração de etanol, e uma menor percentagem de conversão de glucose, estando FT15 nos 51 %. Esta percentagem baixa poderá dever ao facto de não ter havido uma monitorização do pH nas soluções já anteriormente explicada, adicionalmente o volume de suspensão de levedura é menor. OS valores baixos de concentração de etanol devem-se ao facto de a a concentração de glucose obtida na sacarificação ser também menor,

comparando com os ensaios anteriores, logo fermentou-se uma menor quantidade de açúcares, produzindo menos etanol.

Também se observa que os ensaios de bolacha príncipe foram os que obtiveram um maior teor de etanol, correspondendo ao facto que estes ensaios, comparados com os da tartelete obtiveram maiores valores eficiências de sacarificação, obtendo uma maior concentração de glucose, na maior parte dos casos. Isto Pode dever-se ao facto de a gordura ou outro ingrediente, como a baunilha por exemplo, podem interferir na fermentação, ou também de ter havido inibição por substrato. No entanto, denota-se que as bolachas príncipes de chocolate contêm um teor mais elevado de gordura, podendo este não ser um dos principais fatores que reprime a fermentação das bolachas.

No entanto, em FP23, observou-se que embora esta amostra teve uma menor concentração de glucose, esta conseguiu obter um valor de concentração de etanol obtido maior, tal como um valor de conversão de glucose maior do que a tartelete. Isto poderá ter sido devido a problemas na própria inoculação da bolacha tartelete e devido ao facto de esta ter sido feita por volume de suspensão podendo ter adicionado um volume menor de *Etanol Red* suspenso, por erro.

4.3.4. Condições ótimas obtidas de hidrólise e fermentação

Com as fermentações e sacarificações, obtiveram-se as condições ótimas para um ensaio de 1 L obtendo as g de etanol produzidas por g de bolacha (TPE), tal como as razões B/A, a quantidades de cocktails enzimáticos a adicionar, e tempo de sacarificação (TS), a razão suspensão de levedura (em mL) por solução de bolacha descartada (mL) (RL), e os teores de álcool obtidos (em % v/v), na tabela 12 a seguir.

Tabela 12. Condições ótimas obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática.

Bolacha	B/A (gBP/g.H ₂ O)	ClearFlow (μ L/g)	Optimax (μ L/Kg)	TS (h)	RL	TPE (gEtOH/gBP)	% Álcool (v/v)
Tartelete	0.45	0,275	1,03	48	1:5	0,17	9,7
Príncipe	0.45	0,275	0,96	48	1:5	0,19	10,9

4.4. Resultados de ensaios scale up de 1 L

4.4.1. Requerimentos experimentais para “shots” de 1 L

Para fazer o *scale-up* dos ensaios para um volume de 1 L, calculou-se o volume de água utilizado a partir da razão B/A anteriormente mencionada, onde os exemplos de cálculo se encontram na seção A.2.9, tal como as quantidades de ClearFlow e Optimax foram calculados a partir das equações na seção A.2.4, substituindo os valores de 0,72 ($\mu\text{L/g}$) pelos novos valores descritos na tabela 7 (1,03 e 0,96).

Na liquefação não se demonstrou problemas por isso a quantidade a utilizar será a calculada. Por isso, a quantidade de cocktail enzimático ClearFlow calculado para as experiências foi de 82,8 μL .

Com isto, as quantidades de cocktail enzimático Optimax utilizadas foram, para bolacha tartelete, 287,3 μL e para príncipe, 308,9 μL .

4.4.2. Sacarificação das amostras de 1L

Aplicados estes requerimentos, realizou-se as liquefações e sacarificações das amostras de bolacha tartelete e príncipe, fazendo em duplicado, nomeando as amostras T20 de bolacha tartelete e o seu duplicado T21 e P20 para a bolacha príncipe e o seu duplicado P21, cujos resultados das sacarificações se encontram na Tabela 13, calculando as eficiências de sacarificação (ES) a partir das concentrações de glucose das sacarificações (CGS) e as concentrações de glucose teoricamente presentes nas bolachas (CGT).

Tabela 13. Resultados da sacarificação do “upscaling”.

Amostra	CGT (g/L)	CGS (g/L)	ES %
T20	315,88	213,30	67,5
T21	315,88	154,72	48,9
P20	309,96	141,15	45,5
P21	309,96	97,53	31,5

Observa-se que as eficiências da sacarificação são menores do que as amostras de 50 mL, onde o máximo de eficiência de sacarificação era 79 % para os ensaios de tartelete e de 94 % para os ensaios de bolacha príncipe, isto pode

ter devido ao facto de o controlo de temperatura não ter sido eficiente, uma vez que se aumentou o volume dos ensaios, por isso, requererá um maior consumo de energia para estes atingirem a temperaturas de 60 °C para a sacarificação ou até para atingirem uma temperatura de 95 °C para a liquefação, assim estando a sacarificação em condições sub-ótimas, em termos de temperatura. Adicionalmente, observa-se que para ensaios em duplicado as eficiências de T21 e P21 são mais baixas, em comparação com as eficiências T20 e P20. Este facto pode dever-se a não se ter conseguido replicar devidamente as condições de aquecimento dos “shots”, provavelmente devido a restrições de tempo e de equipamentos. Adicionalmente, com o aumento de volume de amostra, provou-se ser mais difícil manter aquecer as amostras, tal como manter a temperatura destas, e, deste modo as condições de sacarificação e também de liquefação poderão ter variado, devido a este aquecimento.

4.4.3. Fermentação

A seguir, apresenta-se um gráfico (Figura 19) que demonstra a evolução do CO_2 libertado na fermentação dos matrizes T20, T21, P20 e P21, tal como na Tabela 8 que apresenta os resultados da fermentação em concentração de etanol obtido, % de conversão de glucose e percentagem de álcool da solução, estas fermentações ocorreram a 37 °C, com levedura a um rácio de 1:5 inóculo/solução, ou seja, introduziu-se 100mL de solução com suspensão de *Etanol Red*.

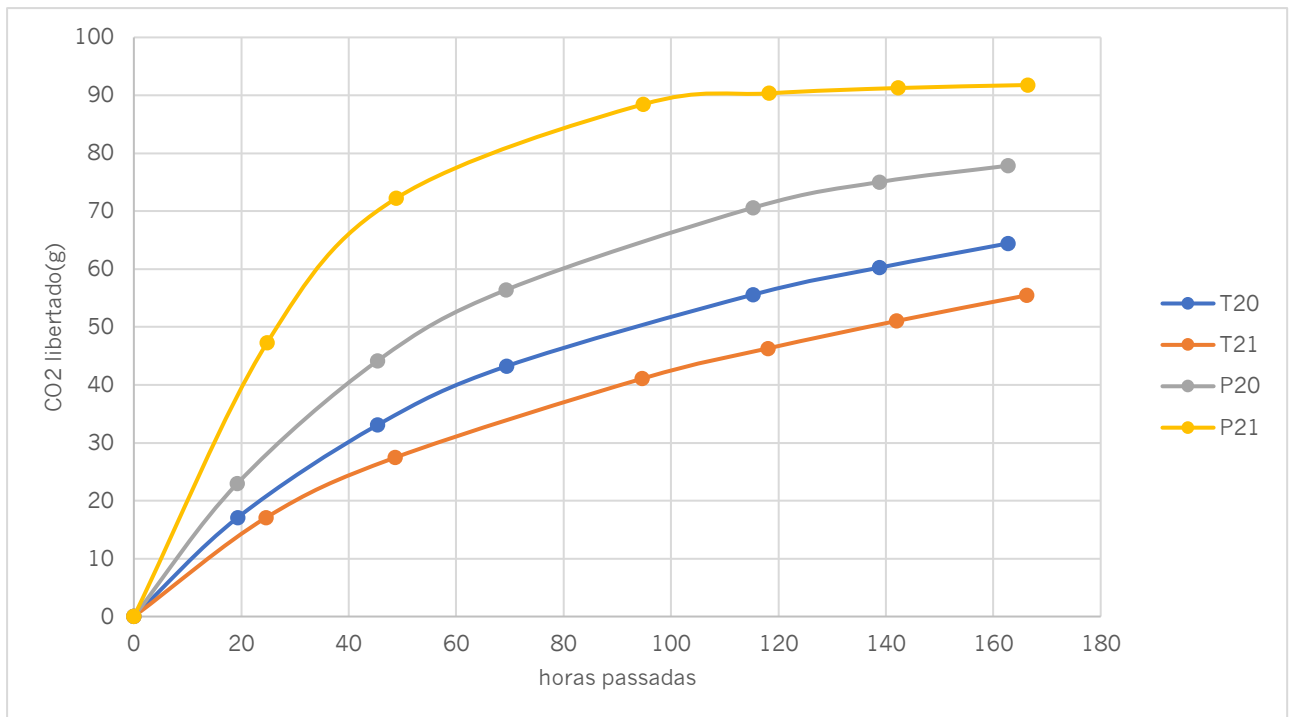


Figura 19. CO₂ libertado na fermentação das amostras T20, T21, P20 e P21.

A partir da figura observa-se que as fermentações de P21 começaram a estabilizar mais cedo, por volta das 100 horas passadas, enquanto o resto das fermentações começa a estabilizar por volta das 140 horas. Isto poderá ser resultante do facto de que a amostra P21 era a amostra que apresentou um conteúdo de glucose inferior ao resto das amostras, como é ilustrado na tabela 14.

Tabela 14. Resultados da fermentação de upscale de 1L.

Amostra	CEt (g/L)	CGR (g/L)	CGS (g/L)	% GT	% Álcool (v/v)
T20	70,70	42,49	213,30	80,08	8,9
T21	55,05	69,69	154,72	54,96	6,9
P20	86,10	29,38	141,14	79,18	10,9
P21	85,30	4,67	97,53	95,21	10,8

Pela observação da tabela, denota-se que as % de álcool nas soluções fermentadas são mais baixos de que o esperado, sendo a amostra T21 a que teve um teor de álcool menor (6,9 %), tal como uma conversão de glucose em etanol menor.

Como os resultados em cima demonstram que as fermentações não obtiveram conteúdos em álcool próximos aos obtidos nas condições ótimas (seção 4.3.4), que seria por volta dos 10 % (v/v), decidiu-se voltar a inocular os shots de 1L de modo a fermentar a concentração de glucose restante das soluções.

Assim, voltou-se a inocular os ensaios com *Etanol Red*, a 37,5 °C onde estes ficaram a fermentar durante mais uma semana. Na figura a seguir, apresentam-se o CO_2 libertado pela 2.ª fermentação (Figura 20).

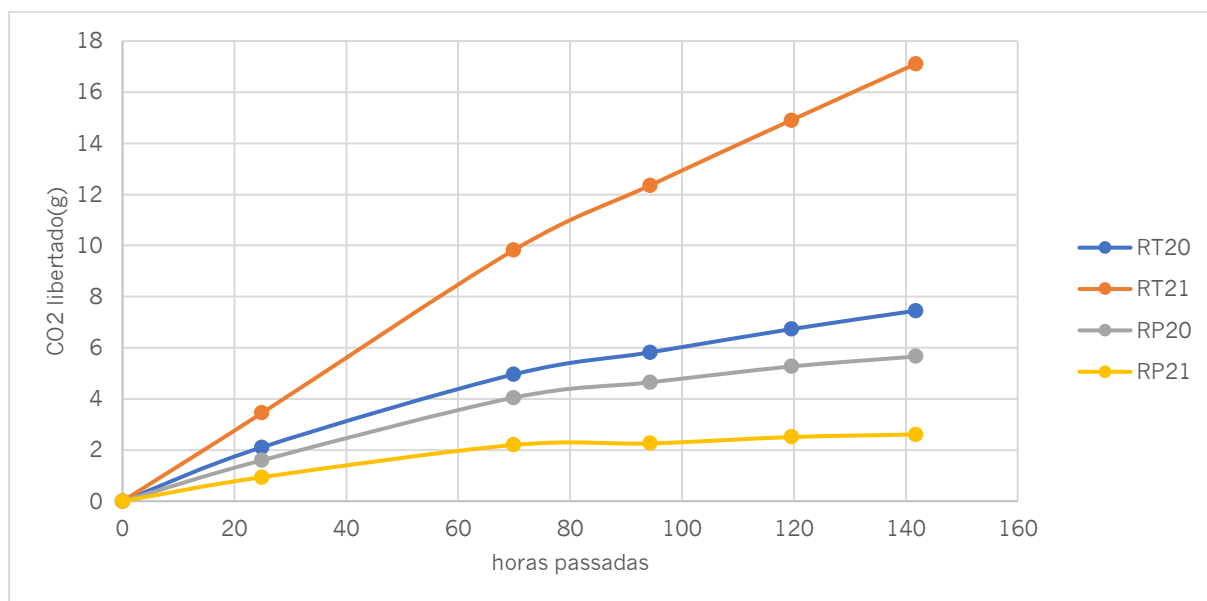


Figura 20. Evolução do CO_2 libertado na refermentação do "shot" de 1 L.

Observa-se que as fermentações continuaram a decorrer durante 7 dias, continuando as fermentações lentas. Adicionalmente, verifica-se que o ensaio duplicado de tartelete, agora denominado RT21 obteve uma maior produção de CO_2 , tal como um aumento mais acentuado deste, podendo dever ao facto de como esta solução foi a que obteve um teor menor de etanol na primeira fermentação, tendo também uma maior concentração de glucose na solução, deste modo fermentando o resto da glucose, obtendo assim um conteúdo maior de CO_2 libertado. Depois, sendo analisado os novos conteúdos em álcool, obteve-se os resultados na tabela 15 a seguir.

Tabela 15. Concentrações de etanol e teor de etanol em v/v das 2^{as} fermentações.

Amostra	C. EtOH (g/L)	% Álcool fermentado
RT20	75,98	9,63
RT21	73,46	9,31
RP20	91,62	11,61
RP21	99,10	12,56

Com uma segunda fermentação, verifica-se que foi possível obter um conteúdo de etanol desejado, apresentado as soluções de bolacha príncipe uma maior concentração de etanol, assim como anteriormente na secção inicial de resultados, onde se obteve as quantidades de gorduras das bolachas, os ensaios da bolacha príncipe tinham um maior conteúdo destas, podendo assim dizer que a gordura não foi o fator principal que afetou as fermentações destas bolachas, uma vez que a bolacha tartelete teria, em teoria um conteúdo de açúcares maiores de que o de príncipe, podendo as fermentações sendo afetadas por outros ingredientes que poderão estar na bolacha tal como baunilha, por exemplo. Como as soluções de bolacha tartelete apresentam um conteúdo em álcool próximo de 10 % (v/v), que é o valor de teor de álcool que se obteve nas condições ótimas de hidrólise e de fermentação estabelecidas. Com isto, decidiu-se destilar as amostras, de modo a obter uma solução com 70 % de etanol.

4.5. Resultados destilação

Depois dos resultados anteriores, decidiu-se fazer a destilação destas amostras de 1L, destilando em várias frações (Figura 21) como as que se observam na figura a seguir. Os resultados das destilações das amostras tartelete e príncipe (T20 e P20), tal como os ensaios duplicados (T21 e P21), medindo o teor de álcool da solução, consoante o volume destilado.



Figura 21. Falcons com as 14 frações de aproximadamente 10 mL de destilação de etanol.

Os resultados das destilações das amostras tartelete e príncipe (T20 e P20), tal como os ensaios duplicados (T21 e P21), medindo o teor de álcool da solução(v/v), consoante o volume destilado em mL estão descritos nas figuras 22, 23, 24 e 25.

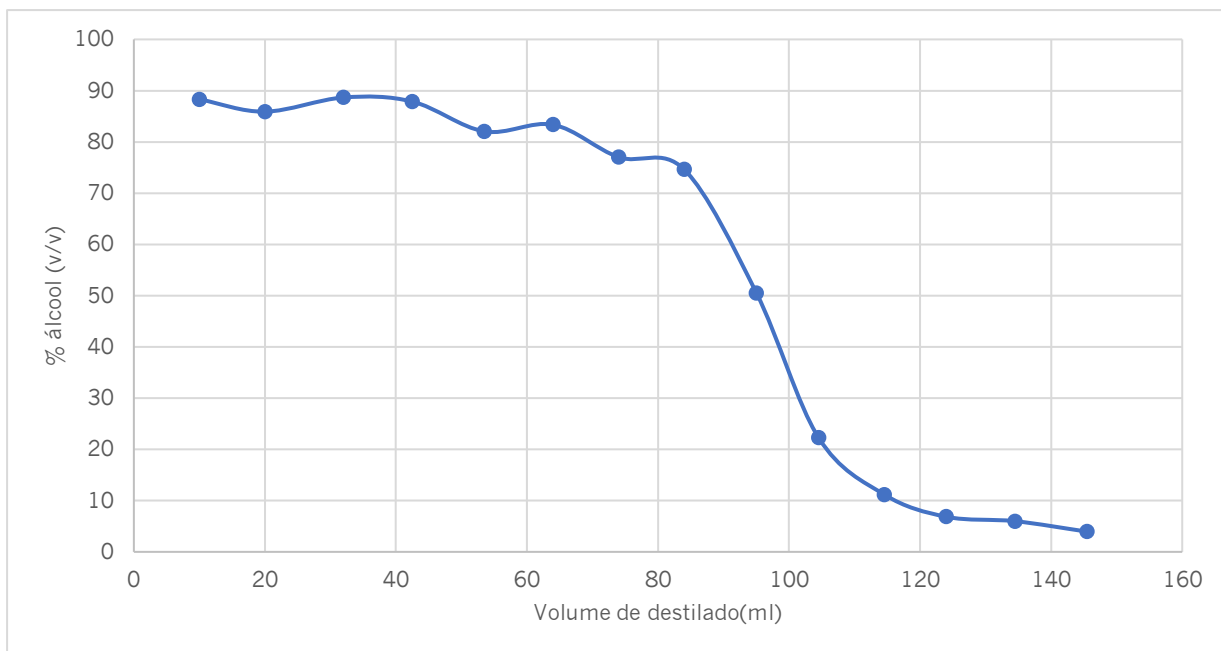


Figura 22. Teor de álcool por volume destilado da amostra T20

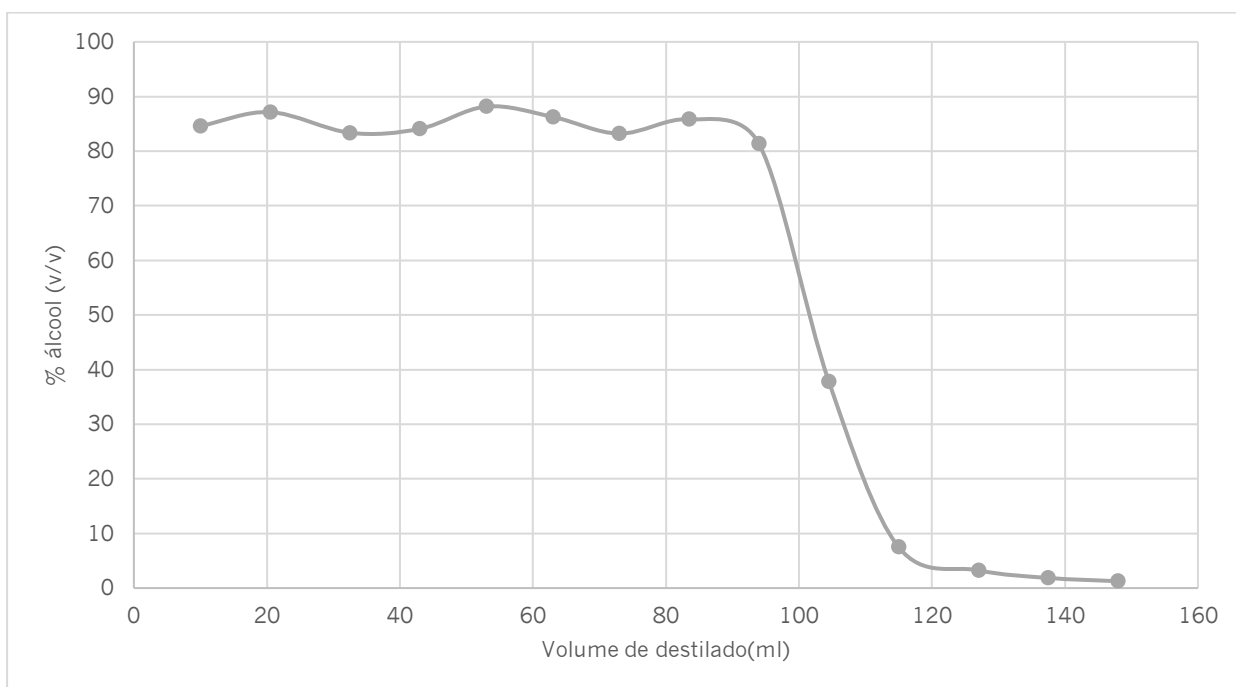


Figura 23. Teor de álcool por volume destilado da amostra P20

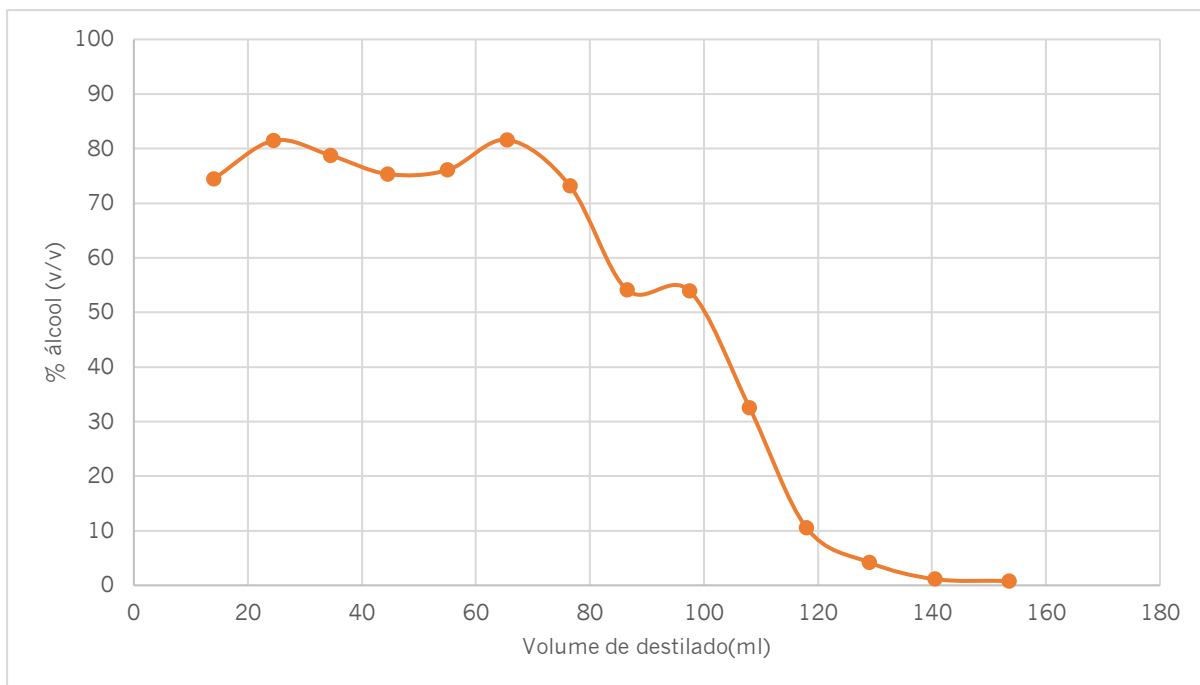


Figura 24. Gráfico de teor de álcool por volume destilado da amostra T21.

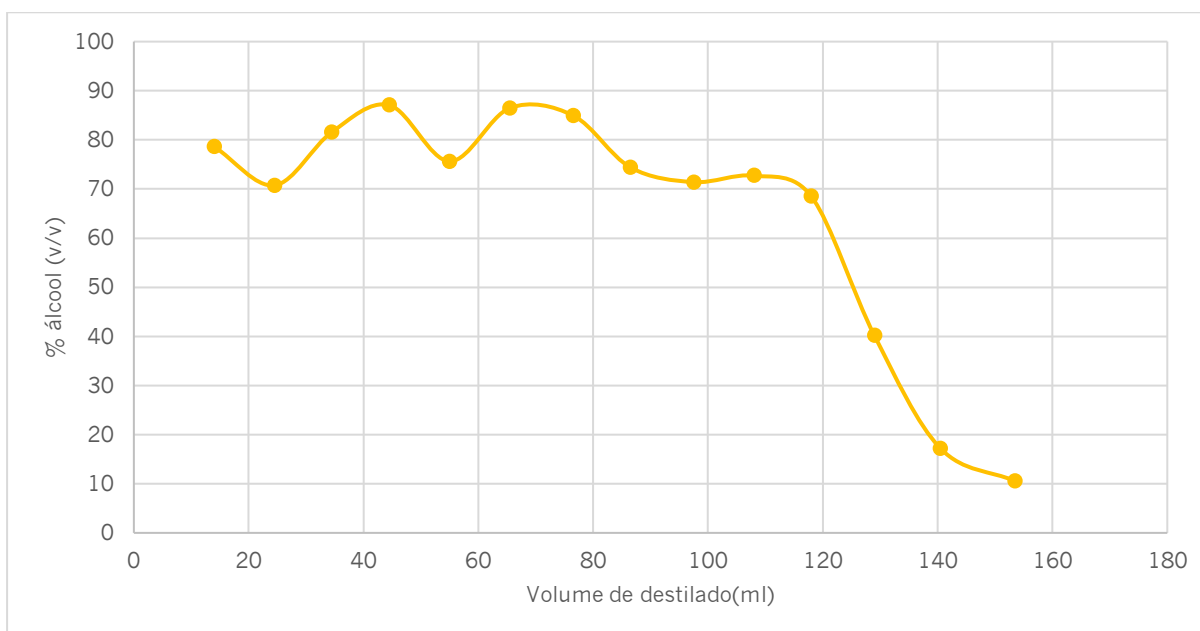


Figura 25. Gráfico de teor de álcool por volume destilado da amostra P21.

A partir destas figuras observa-se que em quase todos os ensaios, o teor de álcool insere-se nos entre os 70 % e 90 % nos primeiros 75 a 100 mL de destilado. Isto é confirmado nas tabelas em anexo que ilustram a percentagem de etanol na solução por volume destilado das soluções dos ensaios.

Com isto como o objetivo deste projeto era obter uma solução de 70 % de etanol, decidiu-se juntar as frações que se confirmam com valores 70 % etanol ou mais e diluir com uma ou duas frações com um menor teor de álcool, onde como destacados em amarelo nas tabelas 43, 44, 45 e 46 em anexo, na amostra T20 juntaram-se 10 frações, na amostra T21 juntaram-se 9 , na amostra P20 juntaram-se 11 frações e em P21 juntaram-se 12 frações de modo a perfazer uma solução com 70 % de etanol, calculando o teor de álcool que a solução final terá e verificando o volume final desta, obtendo assim os resultados da tabela 16.

Tabela 16. Teor de álcool e volume finais dos ensaios experimentais.

Amostra	% Álcool (v/v)	Volume da solução (mL)
T20	74,06	105
T21	72,10	95
P20	73,57	115
P21	74,35	129
Média das amostras	73,52	111

Estes valores de teor de álcool e de volume de solução final obtidos, comparados com a tabela anterior onde denota os valores de teor de álcool das segundas fermentações alcoólicas mostram-se de acordo com estes dados, uma vez que a solução com um menor de teor de álcool tal como um menor volume de solução final provém do ensaio de fermentação T21 cuja 1ª fermentação obteve o menor teor de álcool de 6 % (v/v), e, na segunda fermentação foi o que obteve um menor teor de álcool mas com uma diferença muito menor comparado ao outro ensaio de bolacha tartelete.

Também se observou que a fermentação da amostra T21 foi a que melhor fermentou, sendo isto, o aumento do teor alcoólico da solução for o maior (de 6 % a 9,3 %), onde no resto dos ensaios o teor de álcool apenas subiu no máximo 2 % teor alcoólico. Com isto, obteve-se a tabela 17 com as eficiências de sacarificação e com as percentagens de álcool da solução em (v/v).

Tabela 17. Resultados gerais de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica.

Amostra	ES (%)	% EtP 1 ^a fermentação (v/v)	% EtP 2 ^a fermentação (v/v)
T20	67,53	8,96	9,63
T21	48,98	6,98	9,31
P20	44,68	10,91	11,61
P21	31,46	10,81	12,56
Média	48,16	9,41	10,78

Embora as sacarificações da bolacha tartelete obtiveram melhores eficiências, na fermentação destas, as percentagens de etanol na solução foram menores. O facto das eficiências de sacarificação serem tão baixas poderá dever-se ao facto de não ter havido um controlo exigente da temperatura, uma vez que ao aumentar o volume das experiências, terá que haver um aumento na energia de modo a aquecer os ensaios, estes sendo adicionalmente mais difíceis de uniformizar a sua temperatura, e embora anteriormente da secção de resultados da influência do pH concluir este fator não ser muito importante, denota-se que poderá ser um dos fatores para estas eficiências serem baixas.

4.6. Recuperação de gorduras

Fez-se uma extração simples, uma decantação líquido-líquido onde este era mantido numa incubadora a 50 °C de modo à gordura não solidificar, numa ampola de decantação e este era separado por densidade onde a gordura ficaria na camada de cima. Tal como descrito na secção de procedimentos a gordura foi extraída em gobelet, cujos estão ilustrados na Figura 26, e pesados.



Figura 26. Gobelés com gordura recuperada e respectivas amostras.

Os resultados dessas pesagens, tal como os cálculos das eficiências de extração estão descritos na tabela 18 abaixo.

Tabela 18. Resultados das decantações e recuperação de gorduras.

Amostra	Peso gordura obtida (g)	Massa bolacha (g)	Gordura teórica (g)	Eficiência (%)
T20	17,84	302,43	38,71	46,1
T21	18,00	300,20	38,43	46,8
P20	51,51	300,72	65,56	78,6
P21	49,56	300,98	65,61	75,5
Média	34,23	301,09	52,07	61,8

Ao contrário do que se estava à espera, as percentagens de recuperação de gordura são melhores do que se estava à espera, estando próximas dos 50 %, e no caso da bolacha príncipe atingindo quase dos 80 % de eficiência de recuperação.

No entanto estas relativamente baixas percentagens também se podem dever à perda de gordura nas paredes dos recipientes para centrifugação e também nas

paredes do decantador e outros instrumentos, como por exemplo funis, tal como perdas no processo de verter a gordura para o decantador.

No entanto, como a decantação é um processo de recuperação de gordura bastante simples, esperava-se valores mais baixos de recuperação de gordura (em %), recuperando aproximadamente 0,47 gordura obtida/ gordura teórica, no pior caso e 0,78 gordura obtida/ gordura teórica no melhor dos casos, que é a bolacha príncipe, obtendo resultados melhores do que previsto. O facto de a bolacha príncipe ter recuperado mais gordura confirma-se pelo facto de esta ter uma maior quantidade desta (em 100g de bolacha).

4.7. Cálculo de volumes anuais de solução e de gordura recuperados

Com os valores de etanol e gordura recuperados, calculou-se, a partir das informações dadas pela Vieira de Castro, em que 600 toneladas de bolacha são descartadas anualmente, a quantidade de etanol produzido anualmente (EPA) em toneladas, tendo em conta a taxa de produção de etanol (TPE), ou seja, as toneladas de etanol produzidas por cada tonelada de bolacha descartada.

Adicionalmente, com os valores e eficiências de recuperação da gordura nas soluções de bolachas, obteve-se uma taxa de obtenção de gordura (TRG) (t de gordura (GR) por t de bolacha processada (BP)) e calculou-se a quantidade de gordura recuperada anualmente (GRA) para 600 toneladas anuais de bolacha descartada (BD), e para o caso desta quantidade duplicar, ou seja, para as 1200 toneladas de bolachas descartadas, sendo os valores apresentados nas seguintes tabelas 19 e 20.

Tabela 19. Média de Recuperação de etanol para 600 toneladas de bolachas descartadas

BD (t)	TPE (t EtOH/t BD)	EPA (t)	TRG (t LR/t BD)	GRA (t)
600	0,214	128,3	0,114	68,2

Tabela 20. Média de Recuperação de etanol para 1200 toneladas de bolachas descartadas.

BD (t)	TPE (t EtOH/t BD)	EPA (t)	TRG (t LR/t BD)	GRA (t)
1200	0,214	256,6	0,114	136,5

Assim, com estes cálculos, espera-se que seja possível recuperar a partir de 600 toneladas de bolacha anuais, 128 toneladas de etanol e 68 toneladas de gordura anuais em média. A taxa recuperação de etanol (TPE) é de 0,214 (t EtOH/ TBD), um valor maior do que o esperado, que seria de 0,17 para tartelete e 0,19 para bolacha príncipe. Este aumento da TRE pode ter-se devido ao facto de se ter realizado uma 2ª fermentação, enquanto nos ensaios de otimização apenas se realizou uma fermentação.

Capítulo 5. Conclusões e sugestões futuras

Concluiu-se que as condições em que haveria uma melhor eficiência de sacarificação seria com um rácio de solução de matéria e água de 0,45 g bolacha/g água, adicionando na liquefação, 0,275 $\mu\text{L/g}$ de cocktail enzimático *ClearFlow*, aquecendo a solução até atingir 95 °C, mantendo a sua temperatura e deixar liquefazer durante 2 h. Para a sacarificação, esta realiza-se a 60 °C, obtendo uma melhor eficiência de sacarificação adicionando 1,03 ($\mu\text{L/g}$) de optimax, obtendo eficiências de sacarificação de 94,1 % para as bolachas príncipe e de 79,2 % para as bolachas tartelete, para os ensaios de 50mL.

Ao fazer scale-up das amostras, nos ensaios de 1 L as eficiências diminuíram, provavelmente devido à maior dificuldade de aumentar a temperatura da solução, sendo difícil a homogeneização da temperatura dentro do volume de solução. Deste modo conclui-se, que no futuro será necessária uma monitorização contínua da temperatura. Também se concluiu que não seria preciso haver uma monitorização do pH, na sacrificação, uma vez que as eficiências destas diminuiriam quando estas foram ajustadas.

No entanto, para essas experiências, não houve um controlo contínuo deste, sugerindo assim um controlo contínuo da agitação e do pH, de modo a atingir valores de eficiência de sacarificação próximos teóricos, que seriam por volta dos 96 %.

Em relação às fermentações, concluiu-se que será melhor ajustar, monitorizar e controlar o pH da solução para valores entre 4,5 e 5,5 de modo a obter melhores valores de concentração de etanol obtido, tal como para a temperatura de fermentação, que ocorreu a aproximadamente 37,5 °C.

Nas fermentações das experiências de 1 L, as fermentações ocorreram durante uma semana, independentemente do volume de levedura suspendida adicionada. Para obter teores de etanol de 10 % (v/v), é necessário submeter soluções de 1 L a uma 2.^a fermentação, de modo a destilá-las, para obter soluções de 70 % (v/v), obtendo soluções de aproximadamente 100 a 150 mL, recuperando, assim, em média 0,214 t de etanol por t de bolacha e 128 t de

etanol anualmente, no caso de se descartar 600 toneladas bolacha por ano. Se o objetivo for produzir uma solução etanol 70 % para desinfetante, onde se mistura uma solução com um teor de álcool maior (~99 %), será necessário apenas juntar as frações com maior teor de etanol obtido (de 80 % a 90 % (v/v)) para obter um maior uma solução com cerca de 99 % (v/v)) e misturar cerca de 30 mL de glicerol de modo a obter a solução de desinfetante gel com 100 mL de 70 % (v/v) etanol gel.

Embora não ter sido possível estudar o comportamento da gordura na fermentação, pelo facto de que a solução com bolacha príncipe ter os melhores resultados em termo de eficiência de sacarificação e em termos de concentração de etanol, as soluções “príncipe” são as que têm um maior valor de gordura por 100 g de bolacha. Por isso, não é possível tirar conclusões sobre a influência desta na sacarificação ou na fermentação.

E finalmente, recuperou-se, em média 0,114 t de gordura por t de bolacha, obtendo 68,235 t de gordura anuais. Existem outros métodos para recuperar as gorduras, tal como a utilização de solventes orgânicos, no entanto este processo tem altos custos, quer sejam económicos ou ambientais.

Bibliografia

Agropress, 2020. *Tendências e expectativas no mercado das bolachas* em <http://www.tecnoalimentar.pt/noticias/tendencias-e-expectativas-no-mercado-das-bolachas/> acessado em 1 janeiro 2023.

BAC Online, 2020. *O que deve saber sobre o valor Brix*. Obtido do site da organização BAC Online em <https://www.bac-online.pt/centro-de-conhecimento/blog/4306-o-que-deve-saber-sobre-o-valor-brix>. Acesso em: 1 de janeiro de 2023.

Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89–105. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2007.09.002>

Baloch, S., Yang, Y. (2021). Review on Methods and Applications of High-Performance Liquid Chromatography. *J Food Process Technology*, 12(1), 1–3.

Bansal, V. (2010). HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: A SHORT REVIEW. *Journal of Global Pharma Technology*, 22–26. <https://doi.org/10.1234/JGPT.V2I5.208>

BeMiller, J. N., & R.L, W. (1996). Carbohydrate chemistry for food scientists. Em M. Deker (Ed.), *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists* (3rd ed., pp. 157–223). New York. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-01960-5>

Berardi, A., Perinelli, D. R., Merchant, H. A., Bisharat, L., Basheti, I. A., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). Hand sanitisers amid CoViD-19: A critical review of alcohol-based products on the market and formulation approaches to respond to increasing demand. *International Journal of Pharmaceutics*, 584(May), 119431. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119431>

Biliaderis, C.G. (2009) Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. Em: James, B.M. and Roy, W., Eds., *Starch: Chemistry and Technology*, 3rd Edition, Academic Press, London, 293-359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00008-2>

Biographie, D. (1876). Brix: Adolf Ferdinand Wenceslaus - Deutsche Biographie. *Allgemeine Deutsche Biographie*, 3, 335.

Blakeney, M. (2019). Food loss and food waste: Causes and solutions. Em *Food Loss and Food Waste: Causes and Solutions*. <https://doi.org/10.4337/9781788975391>

Bothast, R. J., & Schlicher, M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1819-8>

Bower, P. (2022). *Operation of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Site da JoVE Science Education, em <https://www.jove.com/v/10156/high-performance-liquid-chromatography-hplc>, acesso em 11 outubro 2022.

BPstat, 2022. *Análise setorial das indústrias alimentares*. Obtido em <https://bpstat.bportugal.pt/conteudos/publicacoes/1163>. Acedido a 11 de outubro de 2022.

Business Insights, Fortune, 2021. *Cookies Market Size, Share & Industry Analysis|Regional Forecast, 2022-2029*. Obtido do site da Fortune Business Insights em <https://www.fortunebusinessinsights.com/cookies-market-102558>. Acesso em: 11 de outubro de 2022.

Carvalho, G. R., P.C. Silva, L.A.S. Pereira, R.V.B.F. Botel, D.A. Botrel (2016, setembro). PROCESSO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DE AMIDO DE MILHO AO LONGO DO TEMPO, apresentada no XXV CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, Lavras.

Castro, A. M., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2011). An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1(4), 245–255. <https://doi.org/10.1007/s13399-011-0023-1>

Chakraborty, I., N, P., Mal, S. S., Paul, U. C., Rahman, M. H., & Mazumder, N. (2022). An Insight into the Gelatinization Properties Influencing the Modified Starches Used in Food Industry: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 15(6), 1195–1223. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02761-z>

Claus, M. J., & Berglund, K. A. (2005). Fruit brandy production by batch column distillation with reflux. *Journal of Food Process Engineering*, 28(1), 53–67. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00377.x>

Correio da Manhã, 2016. *Vieira de Castro: vendas em 50 países - É para Exportar*, Obtido do site do Correio da Manhã em https://www.cmjornal.pt/mais-cm/especiais/e-para-exportar/detalhe/vieira_de_castro_vendas_em_50_paises, acedido em: 11 de outubro de 2022.

de Souza, Paula Monteiro Magalhães, (2010). Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

Fan, L., Ye, Q., Lu, W., Chen, D., Zhang, C., Xiao, L., Meng, X., Lee, Y. C., Wang, H. M. D., & Xiao, C. (2021). The properties and preparation of functional starch: a review. Em *Food Reviews International*. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2015375>

Faraggi Massimo, 2022. *Birra italiana e dal mondo - Italian & World Beer*. Obtido do site Maxbeer em <https://www.maxbeer.org/> Acesso em: 11 de outubro de 2022.

Fortune Business Insights, 2021, *Absolute Ethanol Market Size, Share, Industry Forecast 2029*. Obtido a partir do site <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/ethanol-market-101567>, acedido a 11 de outubro de 2022.

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications.

Trends in Food Science and Technology, 26(2), 68–87.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>

Grand View Research, 2022. *Cookies Market Size, Share, Analysis & Forecast Report, 2025*. Obtido em <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/cookies-market>. Acedido a 11 de outubro de 2022.

Halvorsen, I. J., & Skogestad, S. (2000). Chapter 2 Distillation Theory. *Encyclopedia of Separation Science*, August, 19–58.

Helmenstine, Anne Marie, P. (2019). *What is Decantation and How Does It Work?* Obtido a partir do site da ThoughtCo em <https://www.thoughtco.com/definition-of-decantation-604990>. Acesso em 1 janeiro 2023.

Höfer, R. (2015). Sugar-and Starch-Based Biorefineries. Em *Industrial Biorefineries and White Biotechnology* (pp. 157–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00005-7>

Iberian Coppers Lda, 2022. *História da Destilação de Álcool*. Obtido no site na Iberian Coppers em <https://www.copper-alembic.com/pt/pagina/a-historia-da-destilacao-de-alcoois>, Acesso em: 11 de outubro de 2022.

Jacques K. A. (2003). *The alcohol textbook: a reference for the beverage fuel and industrial alcohol industries* (4th ed.). Nottingham University Press

Jane, J. lin. (2009). Structural Features of Starch Granules II. Em *Starch: Chemistry and technology* (pp. 193–236). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00006-9>

Jeevan Kumar, S. P., Sampath Kumar, N. S., & Chintagunta, A. D. (2020). Bioethanol production from cereal crops and lignocelluloses rich agro-residues: prospects and challenges. *SN Applied Sciences*, 2(10), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03471-x>

Jornal de Notícias, 2018. *Fabricação de bolachas, biscoitos, tostas e pastelaria de conservação*, no site do Jornal de Notícias, em https://infoempresas.jn.pt/C1072_FABRICACAO-BOLACHAS-BISCOITOS-TOSTAS-PASTELARIA-CONSERVACAO.html, acedido a 11 de outubro de 2022.

Katzen, R., & Madson, P. W. (2009). Chapter 18 in Ethanol distillation: the fundamentals. *The Alcohol Textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries*, 269–288.

Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2289. <https://doi.org/10.1007/S13197-012-0677-0>

Khan, M. H., & Yadav, H. (2020). Sanitization During and After COVID-19 Pandemic: A Short Review. *Transactions of the Indian National Academy of Engineering*, 5(4), 617–627. <https://doi.org/10.1007/s41403-020-00177-9>

Kim, H.-R., Im, Y.-K., Ko, H.-M., Chin, J.-E., Kim, I.-C., Hwanghee, •, Lee, B., & Bai, S. (2011). *Raw starch fermentation to ethanol by an industrial distiller's yeast*

strain of *Saccharomyces cerevisiae* expressing glucoamylase and α -amylase genes. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0613-9>

Kumar, R. R., Rao, P. H., & Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. *Frontiers in Energy Research*, 3(JAN), 61. <https://doi.org/10.3389/FENRG.2014.00061/BIBTEX>

Larguesa, António, 2018. *Vieira de Castro: Exportações adoçam negócio do Minho - Prémios exportação & Internacionalização*, retirado do site do Jornal de Negócios em <https://www.jornaldenegocios.pt/negocios-iniciativas/premios-exportacao--internaci/detalhe/vieira-de-castro-exportacoes-adocam-negocio-do-minho>. Acedido a 11 de outubro de 2022.

León Molina, J., & Abad-Corpa, E. (2021). Desinfectantes y antisépticos frente al coronavirus: Síntesis de evidencias y recomendaciones. *Enfermería Clínica*, 31, S84–S88. <https://doi.org/10.1016/J.ENFCLI.2020.05.013>

Leprohon, R. J., & Doxey, D. M. (2013). *The great name: ancient Egyptian royal titulary* (D. M. Doxey (Ed.); Illustrate, Vol. 1). Society of Biblical Literature.

Mamat, H., & Hill, S. E. (2018). Structural and functional properties of major ingredients of biscuit. *International Food Research Journal*, 25(2), 462–471.

Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A., & El Salous, A. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160 (November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112260>

Meyers, C., Kass, R., Goldenberg, D., Milici, J., Alam, S., & Robison, R. (2021). Ethanol and isopropanol inactivation of human coronavirus on hard surfaces. *Journal of Hospital Infection*, 107, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.09.026>

Million Insights, 2020. *Cookies Market Size, Share, Growth 2025 | Industry Analysis Report*, em <https://www.millioninsights.com/industry-reports/global-cookies-market>, acedido a 11 de outubro de 2022.

Shad, Z., Venkitasamy, C., & Wen, Z. (2021). Corn distillers dried grains with solubles: Production, properties, and potential uses. *Cereal Chemistry*, 98(5), 999–1019. <https://doi.org/10.1002/cche.10445>

Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(March), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Moreira, Catarina. (2013). Fotossíntese. *Revista de Ciência Elementar*, 1, 1–5.

Niphadkar, S., Bagade, P., & Ahmed, S. (2018). Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*, 9(2), 229–238. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1334338>

OMS. (2021). Considerations in adjusting public health and social measures in the context of COVID-19. *World Health Organisation Interim Guidance*, November,

1–13, em <https://www.who.int/publications/i/item/considerations-in-adjusting-public-health-and-social-measures-in-the-context-of-covid-19-interim-guidance>, Acesso em: 11 outubro 2022.

Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Park, S. H., Na, Y., Kim, J., Kang, S. D., & Park, K. H. (2018). Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 299–312. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0261-5>

Pérez, S., Baldwin, P. M., & Gallant, D. J. (2009). Structural Features of Starch Granules I. Em *Starch: Chemistry and technology* (pp. 149–192). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00005-7>

Portal do INE. (2022). *Base de Dados (Produtos produzidos na indústria, por Tipo de produtos (por CAE Rev.3))*, obtido de https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0002723&contexto=bd&selTab=tab2&lang=pt). Acesso em: 11 de outubro de 2022

Precedence Research. (2021). *Ethanol Market Size to Hit Around USD 155.6 Billion by 2030*, obtido de <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/01/18/2160198/0/en/Ethanol-Market-Size-Worth-Around-USD-155-6-Billion-by-2030.html>. Acesso em: 11 de outubro de 2022.

Puligundla, P., Smogrovicova, D., Mok, C., & Obulam, V. S. R. (2019). A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. *Renewable Energy*, 133, 1366–1379. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.062>

Raman, K. (2016). *HPLC: Biochemical Analysis. A Step-By-Step Method Guide*. Obtido no site da SciGine, em <https://scigine.com/blog/hplc-analysis-method-guide/>. Acesso em: 1 janeiro 2023.

Report, T., Assessments, C., Commodity, O. F., Issues, T., By, M., Staff, U., Necessarily, N. O. T., Of, S., & Government, O. U. S. (2021). *Report Name: The Portuguese Seafood Sector*. 1–8.

Research & Markets. (2020). *Global Bioethanol Market (2020 to 2025) - Rising Demand From the Pharmaceutical Industry Presents Opportunities*, em <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/06/11/2046814/0/en/Global-Bioethanol-Market-2020-to-2025-Rising-Demand-From-the-Pharmaceutical-Industry-Presents-Opportunities.html>. Acesso em 1 janeiro 2023.

Ritslaid, K., Küüt, a, & Olt, J. (2010). State of the Art in Bioethanol Production. *Agronomy Research*, 8(1), 236–254.

Robyt, J. F. (2009). Enzymes and Their Action on Starch. Em *Starch: Chemistry and Technology, 3rd Edition, Academic Press* (pp. 237–292). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00007-0>

- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. Em *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 101–121). https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6
- Saha, T., Khadka, P., & Das, S. C. (2021). Alcohol-based hand sanitizer – Composition, proper use and precautions. *Germs*, 11(3), 408–417. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1278>
- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Advances in Lipid Extraction Methods-A Review. *International journal of molecular sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS222413643>
- Salari, R. (2016). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 8(10), 3057–3061.
- Schwartz, D., & Whistler, R. L. (2009). History and future of starch. Em *Starch: Chemistry and Technology, 3rd Edition*, Academic Press (pp. 1–10). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00001-X>
- Serra, E. (2018). *Análise. Bolachas representam 3% Do Valor Gerado Pelos Bens Alimentares.* No site HiperSuper, em <https://www.hipersuper.pt/2018/01/03/analise-bolachas-representam-3-do-valor-gerado-pelos-bens-alimentares/>. Acesso em: 11 outubro 2022.
- Sociedade Portuguesa de Inovação, 2013. *Manual de "Tecnologia de Colheitas": Testes de maturação, site da Sociedade Portuguesa de Inovação*, em <https://www.spi.pt/documents/books/hortofruticolas/Wc4d39b0483900.asp>. Acesso em: 11 outubro 2022.
- Statista, 2022. *Food - Worldwide | Market Forecast*, em <https://www.statista.com/outlook/cmo/food/worldwide#revenue>. Acedido a 1 janeiro 2023.
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)
- Vieira de Castro S. A., 2023. *A nossa história*. Obtido do site da Vieira de Castro em <https://vieiradecastro.pt/pages/a-nossa-historia>, acesso em 2 de janeiro de 2023.
- Vieira de Castro-a, 2023 *Bolachas Príncipe Chocolate 145G*, obtido do site da Vieira de Castro em ["https://vieiradecastro.pt/collections/bolachas/products/bolachas-principe-chocolate-145g"](https://vieiradecastro.pt/collections/bolachas/products/bolachas-principe-chocolate-145g), acedido a 1 janeiro de 2023.

Vieira de Castro-b, 2023. *Tarteletes Morango Doses 192g*. Obtido do site da Vieira de Castro em "https://vieiradecastro.pt/collections/bolachas/products/tarteletes-morango-doses-192g". Acesso em: 2 de janeiro de 2023.

Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

Wang, F. S., Li, C. C., Lin, Y. S., & Lee, W. C. (2013). Enhanced ethanol production by continuous fermentation in a two-tank system with cell recycling. *Process Biochemistry*, 48(9), 1425–1428. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.023>

Wang, Q., Li, H., Feng, K., & Liu, J. (2020). Oriented fermentation of food waste towards high-value products: A review. *Energies*, 13(21), 1–29. <https://doi.org/10.3390/en13215638>

Yang, Y., & Sha, M. (2019). A Beginner's Guide to Bioprocess Modes - Batch, Fed-Batch, and Continuous Fermentation. *Eppendorf: Hamburg, Eppendorf Applications*, 16, em https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/763594/Fermentors-Bioreactors_Application-Note_408_BioBLU-f-Single-Vessel_A-Beginner's-Guide-Bioprocess-Modes-Batch_Fed-Batch-Continuous-Fermentation.pdf

Zhang, Y. H. P., Sun, J., & Ma, Y. (2017). Biomanufacturing: history and perspective. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4–5), 773–784. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1863-2>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. https://doi.org/10.1056/NEJMOA2001017/SUPPL_FILE/NEJMOA2001017_DISCLOSURES.PDF

Zobel, H. F., & Stephen, A. M. (2016). Starch: Structure, analysis, and application. Em *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition* (pp. 25–85). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015164-7>

Anexos:

A1. Tabelas e Resultados experimentais adicionais

A.1.1. Tabelas de fermentação de *scale-up* de 1L

Tabela A.1. Dados da fermentação de T20 ao longo do tempo.

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo passado (h)	Massa CO ₂ (g)
tartelete	1513,04	0	0
tartelete	1495,95	19,33	17,09
tartelete	1479,95	45,38	33,09
tartelete	1469,81	69,38	43,23
tartelete	1457,45	115,32	55,59
tartelete	1452,79	138,83	60,25
tartelete	1448,6	162,8	64,44
tartelete	1445,64	186,97	67,4

Tabela 21. Dados da fermentação de P20 ao longo do tempo.

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo passado (h)	Massa CO ₂ (g)
P20	1530,87	0	0
P20	1507,88	19,3	22,99
P20	1486,73	45,3	44,14
P20	1474,45	69,3	56,42
P20	1460,28	115,3	70,59
P20	1455,85	138,8	75,02
P20	1453,02	162,8	77,85
P20	1450,83	186,9	80,04

Tabela A.3. Dados da fermentação de T21 ao longo do tempo.

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo passado (h)	Massa CO ₂ (g)
T21	1553,33	0	0
T21	1536,26	24,6	17,07
T21	1525,89	48,6	27,44
T21	1512,26	94,6	41,07
T21	1507,03	118,0	46,30
T21	1502,29	142,0	51,04
T21	1497,88	166,2	55,45

Tabela A.4. Dados da fermentação de P21 ao longo do tempo.

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo passado (h)	Massa CO ₂ (g)
P21	1582,34	0	0
P21	1535,07	24,8	47,27
P21	1510,14	48,8	72,20
P21	1493,9	94,8	88,44
P21	1492	118,25	90,34
P21	1491,08	142,25	91,26

A.1.2. Resultados da 2ª fermentação

Tabela A.5. Dados da 2ª fermentação de T20 (massa das amostras, peso de CO₂ e horas passadas).

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo (h)	Massa CO ₂ (g)
T20	1445,73	0	0
T20	1443,62	24,9	2,11
T20	1440,77	69,9	4,96
T20	1439,91	94,2	5,82
T20	1439	119,5	6,73
T20	1438,28	141,8	7,45

Tabela A.6. Dados da 2ª fermentação de T21 (massa das amostras, peso de CO₂ e horas passadas).

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo (h)	Massa CO ₂ (g)
T21	1495,15	0	0
T21	1491,7	24,9	3,45
T21	1485,33	69,9	9,82
T21	1482,8	94,2	12,35
T21	1480,25	119,5	14,90
T21	1478,04	141,8	17,11

Tabela A.7. Dados da 2ª fermentação de P20 (massa das amostras, peso de CO₂ e horas passadas).

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo (h)	Peso CO ₂ (g)
P20	1461,86	0	0
P20	1460,26	24,9	1,6
P20	1457,81	69,9	4,05
P20	1457,21	94,2	4,65
P20	1456,59	119,5	5,27
P20	1456,2	141,8	5,66

Tabela A.8. Dados da 2ª fermentação de P21 (massa das amostras, peso de CO₂ e horas passadas).

Amostra	Massa de BD (g)	Tempo (h)	Peso CO ₂ (g)
P21	1484,99	0	0
P21	1484,05	24,9	0,94
P21	1482,79	69,9	2,2
P21	1482,73	94,2	2,26
P21	1482,48	119,5	2,51
P21	1482,38	141,8	2,61

Tabela A.9. Resultados gerais da 2ª fermentação das amostras de 1 L.

Amostra	BD (g)	volume total (mL)	% álcool (v/v)	EtR (g)	TRE (t etOH/t BD)
T20	302,43	104,5	74,06	61,06	0,202
T21	300,20	95	72,10	54,04	0,180
P20	300,72	115	73,57	66,75	0,222
P21	300,98	129	74,35	75,68	0,251

A.1.3. Tabelas de resultados de destilação de modo a criar os gráficos de destilações:

Tabela A.10. Volume destilado e as percentagens de álcool T20, de modo a obter o gráfico da Figura 22.

Volume T20 (mL)	% álcool (v/v)
10	88,31
20	85,90
32	88,67
42,5	87,87
53,5	82,04
64	83,35
74	77,01
84	74,61
95	50,56
104,5	22,28
114,5	11,20
124	6,85
134,5	5,99
145,5	3,94

Tabela A.11. Volume destilado e as percentagens de álcool T21, de modo a obter o gráfico da Figura 23.

Volume (mL)	T21	%álcool (v/v)
14		74,46
24,5		81,46
34,5		78,76
44,5		75,34
55		76,06
65,5		81,60
76,5		73,15
86,5		54,13
97,5		53,91
108		32,56
118		10,55
129		4,19
140,5		1,13
153,5		0,81

Tabela A.12. Volume destilado e as percentagens de álcool P20, de modo a obter o gráfico da Figura 24.

Volume (mL)	P20	%álcool (v/v) P20
10		84,59
20,5		87,14
32,5		83,35
43		84,08
53		88,16
63		86,27
73		83,20
83,5		85,83
94		81,31
104,5		37,80
115		7,48
127		3,25
137,5		1,85
148		1,25

Tabela A.13. Volume destilado e as percentagens de álcool P21, de modo a obter o gráfico da Figura 25.

VOLUME (mL)	%álcool (v/v) P21
14	78,61
24,5	70,74
34,5	81,60
44,5	87,07
55	75,63
65,5	86,49
76,5	84,96
86,5	74,39
97,5	71,40
108	72,71
118	68,48
129	40,14
140,5	17,18
153,5	10,55

A.1.4. Frações de destilação e cálculo do volume total e a correspondente percentagem de álcool da solução final e o volume desta

Nas tabelas seguintes serão apresentados as frações de solução destilada e o seu volume tal como o seu conteúdo alcoólico, que serão utilizadas de modo a calcular os gráficos da secção 3 de destilação, que descreve a evolução da destilação. Estas tabelas também são utilizadas de modo a calcular o volume da solução final obtida, calculada a partir da soma das frações a amarelo, tal como o conteúdo de álcool desta.

Tabela A.14. Frações da amostra T20 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.

FRAÇÕES T20	VOLUME (ml)	%álcool (v/v)
F1	10	88,31
F2	10	85,90
F3	12	88,67
F4	10,5	87,87
F5	11	82,04
F6	10,5	83,35
F7	10	77,01
F8	10	74,61
F9	11	50,56
F10	9,5	22,28
F11	10	11,20
F12	9,5	6,85
F13	10,5	5,99
F14	11	3,95
Solução final	104,5	74,06

Tabela A.15. Frações de T21 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.

FRAÇÕES T21	VOLUME (ml)	%álcool (v/v)
F1	10	74,46
F2	10,5	81,46
F3	10	78,76
F4	11	75,34
F5	10,5	76,06
F6	11,5	81,60
F7	10	73,14
F8	9,5	54,13
F9	12	53,91
F10	10,5	32,56
F11	10	10,55
F12	12	4,19
F13	10,5	1,13
F14	10,5	0,81
Solução final	95	72,10

Tabela A.16. Frações de P20 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.

FRAÇÕES P20	VOLUME (ml)	%álcool (v/v)
F1	10	84,59
F2	10,5	87,14
F3	12	83,35
F4	10,5	84,08
F5	10	88,16
F6	10	86,27
F7	10	83,21
F8	10,5	85,83
F9	10,5	81,31
F10	10,5	37,80
F11	10,5	7,49
F12	12	3,26
F13	10,5	1,85
F14	10,5	1,25
Solução final	115	73,57

Tabela A.17. Frações de P21 com o seu teor de álcool respetivo, tal como a solução final obtida a partir da junção das frações a amarelo.

FRAÇÕES P21	VOLUME (ml)	% álcool (v/v)
F1	14	78,65
F2	10,5	70,74
F3	10	81,60
F4	10	87,07
F5	10,5	75,63
F6	10,5	86,49
F7	11	84,95
F8	10	74,39
F9	11	71,40
F10	10,5	72,71
F11	10	68,48
F12	11	40,13
F13	11,5	17,18
F14	13	10,54
Solução final	129	74,35

A.1.4. Cálculo de eficiências de extração de gordura e gordura recuperada anual

Tabela A.18. Gordura recuperada e eficiências de recuperação.

Amostra	Massa gobelés vazios (g)	Massa gobelé com gordura (g)	GR (g)	BP (g)	GT (g)	ERG (%)
T20	70,83	88,67	17,84	302,43	38,71	46,08
T21	49,75	67,75	18,00	300,20	38,43	46,84
P20	46,68	98,19	51,51	300,72	65,56	78,57
P21	53,97	103,53	49,56	300,98	65,61	75,53

Tabela A.19. Gordura recuperada anualmente para caso de 600 toneladas de bolachas descartadas.

Amostra	TRG (t GR/t BP)	BD (t)	GA (t)
T20	0,059	600	35,4
T21	0,060	600	35,9
P20	0,171	600	102,6
P21	0,165	600	99,0

A.1.5. Tabelas para realizar os cálculos de produção de etanol anual

Tabela A.20. Volume de água utilizado nos "scale-ups" tal como as massas de bolachas e a quantidade de etanol obtido para calcular as taxas de produção de álcool e recuperação de gordura.

Amostra	Volume água (mL)	Massa bolacha (g)	Volume de SF (L)	Etanol obtido (g)
T20	675	302,43	0,105	61,06
T21	670	300,20	0,095	54,04
P20	670	300,72	0,115	66,75
P21	670	300,98	0,129	75,68
Média	671	301,08	0,118	52,07

Tabela A.21. Volumes finais de solução de 70 % do scale-up” para 1L e as respectivas concentrações(v/v) de etanol, tal como as gramas de etanol produzidas por grama de matéria-prima e ml de etanol por g de bolacha.

Amostra	Volume solução final (mL)	% de álcool SF	TRE (g etOH/g BP)
T20	104	74,06	0,202
T21	95	72,10	0,180
P20	115	73,57	0,222
P21	129	74,35	0,251
Média	110,9	73,51	0,214

A.1.6. Tabelas e gráficos para curvas de calibração para HPLC. Padrão de glucose e etanol:

Tabela A.22. Concentrações de glucose das soluções-padrão com a área calculada de glucose cromatograma.

Amostra	Concentrações glucose (g/L)	Área glucose
pad gluc xil gli 1	1,01	198
pad gluc xil gli 5	5,05	902
pad gluc xil gli 10	10,10	1852
pad gluc xil gli 15	15,16	2699
pad gluc xil gli 20	20,21	3535
pad gluc xil gli 25	25,27	4416

Tabela A.23. Concentrações de etanol das soluções-padrão com a área calculada de glucose cromatograma.

Amostra	Concentrações etanol (g/L)	Área EtOH
padrão etoh 1	25,04	2186
padrão etoh 2	20,03	1759
padrão etoh 3	15,02	1296
padrão etoh 4	10,02	875
padrão etoh 5	5,00	439
padrão etoh 6	1,0	92,4

Reta de calibração de concentração de glucose por área no cromatograma.

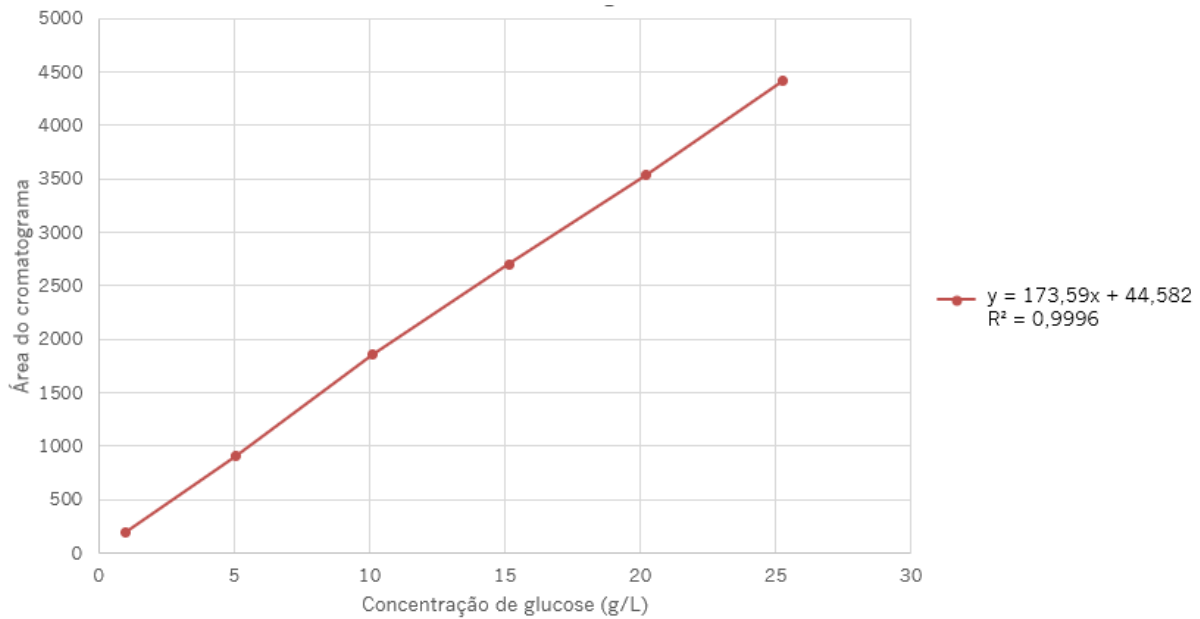


Figura A.1. Reta de calibração de concentração de glucose por área no cromatograma.

Reta de calibração de concentração de etanol por área no cromatograma.

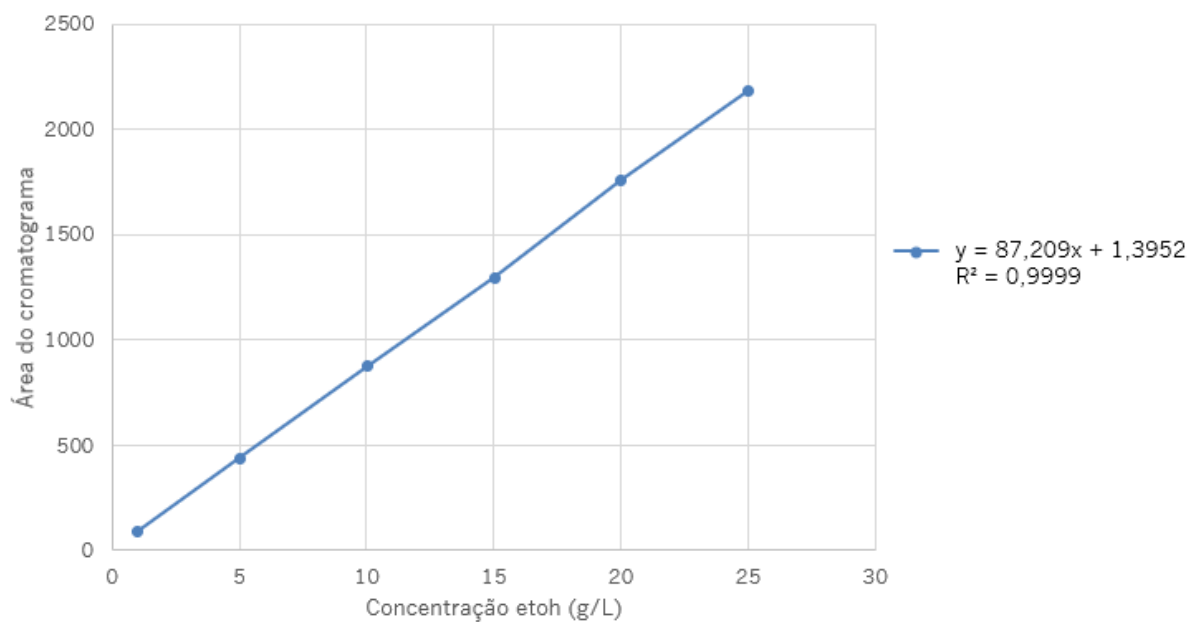


Figura A.2. Reta de calibração de concentração de etanol por área no cromatograma.

A.1.7. Tabelas de evolução de fermentação

P16

Tabela A.24. Evolução dos pesos do fermentador da fermentação das amostras P16.

Amostra	Massa BP (g)	Tempo (h)	Massa CO ₂ libertada (g)
príncipe	207,42	0	0
príncipe	206,62	20,5	0,8
príncipe	206,5	23,7	0,92
príncipe	205,89	44,8	1,53
príncipe	205,42	68,6	2
príncipe	204,98	96,1	2,44
príncipe	204,32	140,4	3,1
príncipe	204,25	145,5	3,17
príncipe	203,96	164,9	3,46
príncipe	203,90	169,7	3,52
príncipe	203,62	188,9	3,8

T23 e P23

Tabela A.25. Evolução da quantidade de CO₂ libertada (g) ao longo do tempo para as fermentações das amostras P23 e T23.

Tempo (h)	CO ₂ (P23) (g)	CO ₂ (T23) (g)
0,00	0,00	0,00
17,80	2,01	1,26
23,30	2,41	1,56
41,32	3,39	2,30
47,76	3,63	2,51
92,10	4,64	3,38
137,10	5,19	4,19

T31 e P21

Tabela A.26. Evolução da quantidade de CO₂ libertada (g) ao longo do tempo para as fermentações das amostras P31 e T31.

Tempo (h)	Massa de CO ₂ P31 (g)	Massa de CO ₂ T31 (g)
0	0	0
20.88333	1.3683	0.96
44.55	2.57	2.03
94.63333	3.56	3.33
140.4667	3.73	4.08
155.05	3.77	4.15
179.05	3.79	4.33

A.2. Exemplos de cálculo

A.2.1. Cálculo concentração de etanol numa solução 15%(v/v)

Em 100 ml de solução, 15 ml são etanol: $\frac{150 \text{ ml etanol}}{1000 \text{ ml solução}} = 150 \text{ ml/L}$. A densidade etanol é de 0,789 g/cm³. Com isto, a concentração de etanol será:

Equação A.1. Cálculo de concentração de etanol em g/L numa solução de 15%(v/v).

$$\text{Concentração de etanol } \left(\frac{g}{L}\right) \text{ numa solução de } 15\% \left(\frac{v}{v}\right): 150 \frac{ml}{L} \times 0,789 \frac{g}{ml} = 118,35 \frac{g}{L}$$

A.2.2. Concentração de glucose necessária para a fermentação

Como na fermentação alcoólica, estequiometricamente um g/L de glucose transforma-se em 0,51 g/L de etanol.

Logo, a concentração de glucose necessária para obter a concentração de etanol requerida será calculada a partir da divisão da concentração de etanol calculada anteriormente com os 0,51g de etanol estequiométricos obtidos a partir da fermentação.

Equação A.2. Concentração de glucose necessária para fermentação.

$$\text{Concentração de glucose necessária: } \frac{118 \left(\frac{g}{L}\right)}{0,51} = 232,05 \left(\frac{g}{L}\right)$$

A.2.3. Cálculo de bolacha necessária para obter a dita concentração de glucose

Cálculo de açúcar presente nas bolachas

A partir dos dados de bolacha príncipe da vieira de castro: em 100g de bolacha existem 69g de hidratos de carbono, logo em 100g/L existem 69 g/L:

Equação A.3. Cálculo de concentração de bolacha inicial.

$$\text{Concentração de bolacha inicial: } \frac{(232,05 \frac{g}{L} \times 100 \frac{g}{L})}{69 \frac{g}{L}} = 336,32 \frac{g}{L}$$

Calculando, assim, a massa de bolacha necessária para concentração de bolacha anterior, para um volume de 50mL:

Equação A.4. Cálculo de massa inicial a pesar.

$$\text{Massa de bolacha a pesar: } 0,05L \times 336,32 \left(\frac{g}{L}\right) = 16,82g \text{ bolacha príncipe}$$

Cálculo de massa necessária para um rácio 0,45 bolacha(água) (g/g):

Para 50ml (1g de água =1ml água)

Equação A.5. Rácio de bolacha e água por massa numa solução.

$$0,45 \frac{g \text{ bolacha}}{g \text{ água}} = \frac{x \text{ g bolacha}}{50g \text{ água}}, \text{ ou seja}$$

Equação A.6. Cálculo de bolacha necessária para obter o rácio (B/A) pretendido numa solução com 50 mL de água.

$$\text{Massa de bolacha a pesar} : 0,45 \frac{g \text{ bolacha}}{g \text{ água}} \times 50 \text{ g água} = 22,5 \text{ g bolacha}$$

A.2.4. Cálculo da quantidade de cocktail enzimático

Para *Clearflow*:

Equação A.7. Cálculo da quantidade recomendada de ClearFlow AA a partir das fichas técnicas dos cocktails enzimáticos.

$$\text{ClearFlow a adicionar: } 0,275 \frac{L}{t} \text{ matéria prima} \times 16,82E - 6 t = 4,64E - 06 L ,$$

O que equivale a 4,64 µL de cocktail de enzimas.

Para *Optimax*:

Equação A.8. Cálculo da quantidade de Optimax VHP4060 a adicionar.

$$\text{ClearFlow a adicionar: } 0,72 \frac{L}{t} * 16,82E - 6 t = 1,21E - 05 L = 12,2\mu L$$

A.2.5. Cálculo de peso de massa de bolacha acordo com o grau de *brix*

Tabela A.27. Concentração de bolacha g/L com o respetivo brix e a glucose obtida.

CB g/L	R	Brix	CGS (g/L)
336,400	0,336	24,	164,63
586,850	0,587	33,7	232,00

A partir da tabela 41, calcula-se o brix necessário para amostra príncipe para 232g/L de glucose deste modo:

Equação A.9. Brix equivalente a 232 g/L de acordo com a tabela.

$$(24 \times 232 \text{ g/L}) / 165,3 \text{ g/L} = 33,68421053$$

Equação linearidade brix para rácio B/A:

Equação A.10. Linearidade de brix e rácio B/A obtida.

$$\text{Brix} = 39,216 * \text{rácio} + 10,808$$

O Rácio será:

Equação A.11. Cálculo de rácio B/A para o brix obtido.

$$\frac{(33,68421053 - 10,808)}{39,216} = 0,5833387017 \left(\frac{\text{g bolacha}}{\text{g água}} \right)$$

O mesmo rácio foi calculado para tartelete (que foi utilizado para o resto das experiências).

Cálculo de optimax ótimos linearmente à eficiência dada nos resultados de sacarificação de T23 e P23.

Tabela A.28. Quantidade de Optimax em μL utilizados nas sacarificações e açúcares reais e teóricos respetivos

Amostra	CGT (g/L)	Optimax a usar (μL)	CGS (g/L)
Tartelete	317,3	16,2	239,4
Príncipe	310,5	16,2	218,3

Exemplo: Para príncipe:

Equação A.12. Cálculo linear de optimax ótimo.

$$\text{Cálculo linear de optimax ótimo: } \frac{16,2\mu\text{l} \times 310,5 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{218,33 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} = 23 \text{ uL}$$

Para tartelete:

$$\text{Cálculo linear de optimax ótimo: } \frac{16,2\mu\text{l} \times 317,3 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{239,4 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} = 21,4 \text{ uL}$$

A.2.6. Cálculo de açúcares fermentáveis por grau Brix

Como 1 brix = 1g açúcar por 100 g de solução sendo assim aproximadamente 1g de açúcares fermentáveis por 100mL, assim o cálculo dá se por

Equação A.13. Cálculo de açúcares fermentáveis a partir do valor de brix.

$$\begin{aligned} \text{Concentração açúcares fermentáveis: grau brix} & \left(\frac{g}{100mL} \right) \times \left(\frac{1000mL}{1L} \right) \\ & = \text{grau brix} * 10 \end{aligned}$$

Concentração A. F. príncipe exemplo:

Equação A.14. Exemplo de cálculo de açúcares fermentáveis.

Concentração A. F. : $24 \times 10 = 240 \text{ g/L}$

A.2.7. Cálculo de eficiência de sacarificação

Cálculo de eficiência de sacarificação em percentagem:

Equação A.15. Cálculo de eficiência de sacarificação em percentagem.

$$\text{Cálculo de eficiência de sacarificação}(\%) : \left(\frac{\text{glucose obtida}}{\text{glucose teórica}} \right) \times 100$$

Exemplo de cálculo:

Para concentração de bolacha 336 g/L, calculou-se que a concentração teórica de açúcares será 232 g/L. A partir da sacarificação dessa amostra obteve-se 165,3 g/L de glucose, logo a eficiência da sacarificação (ES) será:

Eficiência de sacarificação:

Equação A.16. Exemplo de cálculo de eficiência de sacarificação.

$$ES(\%) : \left(\frac{165,3 \left(\frac{g}{L} \right)}{232 \left(\frac{g}{L} \right)} \right) * 100 = 71,25\%$$

A.2.8. Cálculo de volume de inóculo para rácio de (1:10) em volume

Como o “volume” da experiência é para 50ml, o volume será de 5 ml.

No caso das experiências em frascos de 1L o conteúdo de inóculo será de 100mL

Cálculo de massa a pesar para fazer solução YPD onde é feita num rácio de solução/volume (1:5) num volume de 2L, sendo o volume de solução YPD 400mL, onde por sua vez terá um rácio de 1:2:2 para os seus ingredientes que serão, extrato de levedura, D-glucose e peptona, cujos cálculos se encontram nas equações seguintes:

Concentração de D-glucose pretendida: 20g/L

Equação A.17. Cálculo de D-glucose a pesar.

Massa a pesar de D – glucose: $20(g/L) \times 0,400L = 8g$ de D – glucose

Equação 18. Cálculo de Peptona a pesar.

Peptona (20 g/L): $20(g/L) \times 0,400L = 8g$ de Peptona

Equação A.19. Cálculo de extrato de levedura a pesar.

*Extrato de levedura $\frac{(Yeast\ Extract)10g}{L}$: $10 \left(\frac{g}{L}\right) * 0,400L = 4g$ de D – glucose*

A.2.9. Cálculo de volume de água a ocupar de modo a deixar $\frac{1}{3}$ de volume de um frasco de 1L

1000 ML $\cdot 0,30$ (1000) = 666,7 mL água = 666,7 g água

Cálculo de massa de bolacha para volume calculado:

rácio definido: 0,45

Massa de bolacha: $0,45$ (g.bolacha /g.água) * 666,7(g água) = 300,015g de bolacha

A.2.10. Cálculo de perda de CO_2

Equação A.20. Cálculo de CO_2 perdido.

g de CO_2 perdido = (Peso no primeiro dia de fermentação – peso no dia atual)

Exemplo amostra príncipe denominada 15 de maio

Peso da amostra no início da fermentação: 207,42g

Peso da amostra 96h depois: 204,98 g

Logo O peso do CO_2 em g da amostra depois de 96h de fermentação será:

Equação 21. Cálculo de CO_2 perdido na amostra princípio scale up.

$$\text{Peso de } CO_2 \text{ princípio: } 207,42 - 204,98 = 2,44g \text{ de } CO_2$$

A.2.11. Cálculo de % glucose convertida para amostra de 31 de maio

Equação A.22. Cálculo de % de glucose convertida na fermentação.

$$\% \text{ glucose convertida: } \frac{C_6H_{12}O_6 \text{ sac. } \left(\frac{g}{L}\right) - C_6H_{12}O_6 \text{ pos. fermentação } \left(\frac{g}{L}\right)}{C_6H_{12}O_6 \text{ sac. } \left(\frac{g}{L}\right)} \times 100$$

%Glucose convertida (FP31):

Equação A.23. Exemplo de cálculo de percentagem de glucose convertida em etanol ou outros subprodutos.

$$GFP31: ((292,353 - 21,609)/292,353) * 100 = 92,60859304\%$$

A.2.12. Cálculo de concentração de etanol e glucose obtida a partir de HPLC

exemplo cálculo de concentração de glucose e etanol em ensaios de fermentação 31 de maio

Equação 34. Equação calibração de padrão de glucose.

$$\text{Equação calibração de padrão de glucose: } y = 0.0058x - 0.2519$$

Equação 45. Cálculo de concentração a partir da área de etanol no cromatograma.

Equação calibração de padrão de etanol com área de amostra :

$$y = 0.0115x - 0.0145$$

Onde:

y=concentração glucose/etanol

x=área interpolada obtida através HPLC

Exemplos de cálculo para FP31:

Cálculo de concentração de glucose:

Equação A.26. Exemplo de cálculo de concentração de glucose da amostra FP31.

$$\text{Concentração de glucose FP31: } 0.0058 * 416 - 0,2519 = 21,609\text{g/L}$$

Cálculo de concentração de etanol:

Equação 57. Exemplo de cálculo de concentração de etanol da amostra FP31.

$$\text{Concentração etanol FP31: } 0.0115 * 749 - 0.0145 = 85,99\text{ g/L}$$

A.2.13. Cálculo de % de etanol numa solução de etanol com uma certa concentração

Equação de % (v/v) a partir de concentração de etanol em g/L:

Equação A.28. Equação de % (v/v) Etanol a partir da concentração de etanol em g/L.

$$\% \text{ etanol } \left(\frac{v}{v} \right) : \frac{\text{concentração de etanol } \left(\frac{g}{L} \right)}{0,789 \times 10}$$

Exemplo de cálculo FP31:

Equação A.29. Exemplo de cálculo de % etanol (v/v) para FP31.

$$\% \text{ etanol } \left(\frac{v}{v} \right) : \frac{85,99}{0,789 * 10} = 10,89860583\% ,$$

o que equivale a 10,89 ml de etanol em 100ml de solução

Para estes cálculos seguintes só se pode utilizar o exemplo de scale-up (P20), pois foi o único que se conseguiu pesar a gordura:

A.2.14. Cálculo de gordura teórica presente nas bolachas (GT)

Equação A.30. Cálculo de gordura teórica nas bolachas pesadas.

$$\text{GT} = (\text{Gordura na bolacha por } 100\text{g}/100) \times \text{Massa de bolachas}$$

Exemplo de cálculo P20:

Equação A.31. Exemplo de cálculo de gordura teórica nas bolachas pesadas na amostra P20.

$$GT P20 : 0,218 * 300,72 g = 65,55696 g$$

A.2.15. Cálculo de gordura presente nas soluções (GS)

Equação 62. Cálculo da massa de gordura nas soluções de bolacha.

$$GS(g) = \text{Peso do gobelé com gordura} - \text{peso do gobelé vazio}$$

Exemplo de cálculo:

Equação A.33. Exemplo de cálculo de massa da gordura(g) nas bolachas pesadas na amostra P20.

$$GS P20(g): 46,68g - 98,19g = 51,51g$$

A.2.16. Cálculo eficiência de recuperação de gordura em %

Equação A.34. Cálculo de recuperação da gordura das soluções em percentagem.

$$\text{Eficiência de recuperação de gordura(\%)} = \frac{\text{Massa de gordura recuperada}}{\text{Massa de gordura teórica}} * 100$$

Exemplo de cálculo:

Equação A.35. Exemplo de cálculo de recuperação da gordura da amostra P20.

$$\text{Cálculo eficiência de recuperação em \% de P20: } \left(\frac{51,51}{65,55696} \right) * 100 = 78,57289295\%$$

A.2.17. Cálculo das toneladas de etanol produzidas anualmente

Cálculo de taxa de produção de etanol em g etanol por g de bolacha utilizada:

A partir da equação 31 calcula-se o g de etanol produzido nas soluções finais:

Equação A.36. Cálculo de g de etanol.

$$g \text{ de etanol} = \% \text{ etanol} \left(\frac{v}{v} \right) \times 10 \times 0,789 \times \text{volume solução final (L)}$$

Usando o exemplo da amostra P20:

Equação A.37. Exemplo de cálculo de g de etanol para amostra P20.

$$g \text{ etanol} = 74,352\% \times 10 \times 0,789 \times 0,115 = 66,751g \text{ de etanol}$$

Com o g de etanol das soluções e os g de bolachas utilizadas, consegue-se calcular os g de etanol por g de bolacha a partir desta equação do cálculo:

Equação 738. Cálculo de g de etanol obtido por g de bolacha usada.

$$\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ bolacha}} = \frac{g \text{ etanol das soluções finais}}{g \text{ bolacha utilizada na amostra}}$$

Com o exemplo de P20:

Equação A.39. Exemplo de cálculo de g de etanol/ g bolacha.

$$\frac{g \text{ etanol}}{g \text{ bolacha}} \text{ de P20: } \frac{66,751g \text{ etanol}}{300,720g \text{ bolacha}} = 0,222$$

A partir destes valores as (g de etanol por g de bolacha) podem equivaler-se a toneladas de etanol por toneladas de bolachas. Com isto, consegue-se calcular as toneladas de etanol anuais,

Equação A.40. Cálculo de toneladas de etanol produzidas anualmente.

$$\text{Toneladas de etanol anuais} = \text{toneladas de bolachas descartadas} \times \frac{\text{ton etanol}}{\text{ton bolacha}}$$

Com o exemplo de P20, obtém-se as toneladas anuais de etanol para 600 toneladas descartadas de bolacha:

Equação A.41. Toneladas de etanol produzidas no caso para a amostra P20, para 600 toneladas de bolacha descartadas.

$$\text{Toneladas anuais de etanol: } 600 \times 0,222 \left(\frac{t \text{ etanol}}{t \text{ bolacha}} \right)$$

A.3. Fichas de segurança

A.3.1. Ficha de segurança *Clearflow AA*

Secção 1: Identificação da substância/ mistura e da companhia

1.1 Identificador do produto

Nome do Produto: Clearflow AA

Código do produto: A30171

Substância ou Mistura: Mistura

1.2. Usos relevantes da mistura e usos a desaconselhar

Uso recomendado para processamento de carboidratos.

1.3. Informações do fornecedor da ficha de segurança

Genencor International, B.V., Archimedesweg 30, 2333 CN Leiden, The Netherlands

Tel.: +31 71 5686 168

Fax: +31 71 5686 169

Endereço e-mail: SDS.Genencor@DuPont.com

1.4. Número de telefone de emergência: +32 (0) 50 44 91 73

Secção 2: Identificação de Perigos

2.1. Classificação da substância ou mistura

Regulação (EC) N° 1272/2008

Sensibilização respiratória: Categoria 1 - (H334)

2.2. Elementos do rótulo

Contem: Alfa Amilase



Palavra sinal: PERIGO!

Frases de perigo:

H334 – Pode causar alergia ou sintomas de asma ou dificuldades respiratórias se inalado.

Frases de precaução:

P261 – Evitar inalação de pó/fumo/gás/vapores/sprays.

P284 – Usar proteção respiratória no caso de ventilação inadequada.

P304 + P341 – SE INALADA: Se a respiração for difícil, remover a vítima para um local com ar fresco e mantê-la numa posição confortável para a respiração.

P342 + P311 -Se experienciar sintomas respiratórios: Ligar a um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um doutor/médico.

2.3. Outros perigos: Nenhum conhecido

Secção 3. Composição/Informação dos Ingredientes

Tabela A.29. Informação dos ingredientes do cocktail ClearFlowAA.

Nome químico	Nº CAS	Peso-%	EINECS	Código IUB	Nº Reg. REACH	Classificação CLP
Alpha Amylase	9000-90-2	1.5	232-565-6	3.2.1.1	01-2119938627-26	Resp. Sens. 1 (H334)

Secção 4: Medidas de primeiros socorros

4.1. Descrição das medidas de primeiro socorro

Inalação: EM CASO DE INALAÇÃO: Remover a pessoa para um local com ar fresco e manter uma respiração confortável. Se experienciar sintomas

respiratórios: Ligar a um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um doutor/médico.

Contacto com a pele: Se na pele: Lavar com muita água e sabão. Em caso de irritação da pele: Procurar conselho/assistência médica.

Contacto ocular. SE entrar nos olhos: lavar os olhos com cuidado durante vários minutos, retirar lentes de contacto, se estiverem presente e forem fáceis de remover. Se a irritação nos olhos continuar: Procurar conselho/ajuda médica.

Ingestão: Lavar a boca minuciosamente com água. Se engolir: Chamar um centro de informação antiveneno ou um profissional de saúde, em caso de se sentir mal.

4.2. Sintomas e efeitos mais importantes, imediatos e atrasados

Pode causar alergia ou sintomas de asma ou dificuldades respiratórias se inalado.

4.3. Indicação de atenção médica imediata e tratamentos especiais necessários

Tratar de acordo com os sintomas.

Secção 5: Medidas em caso de incêndio

5.1. Meios de extinção

Extinguir com espuma resistente a álcool, pó de extinção de fogos ou spray de água.

5.2. Perigos especiais da substância ou mistura

Nenhum conhecido

Secção 6: Medidas para fugas acidentais

6.1. Precauções pessoais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência

Evitar a produção de pó e aerossóis. Evitar respirar o pó ou névoa de spray.

6.2. Precauções ambientais

Conter a fuga

6.3. Métodos e materiais de contenção da fuga e para limpeza

Métodos para contenção: Cobrir com absorvente ou conter a fuga. Coletar e descartar o material.

Métodos de limpeza: Usar equipamento de proteção pessoal adequado. Conter ou absorver o material com material inerte. Evitar que o material entre para escoamento de água, esgotos ou para o ambiente aquático.

Secção 7: Armazenagem e manuseio

7.1. Precauções para o manuseio seguro

Evitar criar pó ou aerossóis. Evitar o contacto com olhos, pele e roupa. Evitar respirar o pó ou spray. Assegurar uma ventilação adequada.

Medidas de Higiene: Manusear de acordo com as boas práticas de higiene e segurança industriais. É recomendado limpar regularmente o equipamento, local de trabalho e roupa. Evitar o contacto com olhos, pele e roupa. Usar luvas e proteção ocular/da face adequadas.

7.2. Condições para armazenamento Seguro, incluindo incompatibilidades

Manter o contentor bem fechado num local seco e bem ventilado. Proteger da luz. Manter/armazenar apenas no contentor original.

Secção 8: Controlos de exposição/ Proteção Individual

8.2. Controlos de exposição

Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Proteção dos olhos/cara: Usar óculos de segurança com escudos oculares.

Proteção das mãos: Usar luvas de segurança com os requerimentos mínimos de EN420 quando manusear o produto sólido, para produtos líquidos luvas com os requerimentos EN374-2. As luvas de nitrilo, borracha de butilo, latex e PVC oferecem proteção suficiente.

Proteção para a pele e Corpo: Usar luvas e roupa/uniforme de segurança.

Proteção Respiratória: Assegurar ventilação adequada. No caso de irritação proteção respiratória aprovada deverá ser utilizada, como respiradores com filtros de partículas (EN143) ou filtros P3.

Secção 9: Propriedades Químicas e Físicas

Aparência

Estado físico: Líquido

Cor: Castanho-escuro

Odor: Odor típico de produto fermentado

pH: 5.5-6.5

Gravidade específica: 1.16

Solubilidade com água: Solúvel

Secção 13: Considerações para eliminação/descartar o material

13.1. Métodos de tratamento de resíduos

Métodos de descarte: Descartar os resíduos numa instalação de eliminação de resíduos aprovada. Eliminar os resíduos de acordo com as regulações locais.

Embalagem contaminada: Eliminar os contentores vazios e os resíduos de um modo seguro. Eliminar os contentores e resíduo de acordo com a regulação estabelecida.

A.3.2. Optimax 4060 VHP

Secção 1: Identificação da substância/ mistura e da companhia

1.1. Identificador do produto

Nome do Produto: Optimax 4060 VHP

Código do produto: A30171

Substância ou Mistura: Mistura

1.2. Usos relevantes da mistura e usos a desaconselhar

Uso recomendado para processamento de carboidratos.

1.3. Informações do fornecedor da ficha de segurança

Genencor International, B.V., Archimedesweg 30, 2333 CN Leiden, The Netherlands

Tel.: +31 71 5686 168

Fax: +31 71 5686 169

Endereço e-mail: SDS.Genencor@DuPont.com

1.4. Número de telefone de emergência: +32 (0) 50 44 91 73

Secção 2: Identificação de Perigos

2.1. Classificação da substância ou mistura

Regulação (EC) Nº 1272/2008

Sensibilização respiratória: Categoria 1 - (H334)

2.2. Elementos do rótulo

Contem: Pululanase, Glucoamilase



Palavra sinal: PERIGO!

Frases de perigo:

H334 – Pode causar alergia ou sintomas de asma ou dificuldades respiratórias se inalado.

Frases de precaução:

P261 – Evitar inalação de pó/fumo/gás/vapores/sprays.

P284 – Usar proteção respiratória no caso de ventilação inadequada.

P304 + P341 – SE INALADA: Se a respiração for difícil, remover a vítima para um local com ar fresco e mantê-la numa posição confortável para a respiração.

P342 + P311 -Se experienciar sintomas respiratórios: Ligar a um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um doutor/médico.

2.3. Outros perigos: Nenhum conhecido

Secção 3: Composição/Informação dos Ingredientes

Tabela A.30. Descrição do Optimax 4060 VHP e dos compostos da mistura.

Nome Químico	Nº CAS.	Peso- %	EINECS	Código IUB-EC	Classificação o CLP
Glucoamilase	9032-08-0	5-10	232-877-2	3.2.1.3	Resp. Sens. 1 (H334)
Pululanase	9075-68-7	<1	232-983-9	3.2.1.41	Resp. Sens. 1 (H334)

Secção 4: Medidas de primeiros socorros

4.1. Descrição das medidas de primeiro socorro

Inalação: EM CASO DE INALAÇÃO: Remover a pessoa para um local com ar fresco e manter uma respiração confortável. Se experienciar sintomas respiratórios: Ligar a um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um doutor/médico.

Contacto com a pele: Se na pele: Lavar com muita água e sabão. Em caso de irritação da pele: Procurar conselho/assistência médica.

Contacto ocular. SE entrar nos olhos: lavar os olhos com cuidado durante vários minutos, retirar lentes de contacto, se estiverem presente e forem fáceis de remover. Se a irritação nos olhos continuar: Procurar conselho/ajuda médica.

Ingestão: Lavar a boca minuciosamente com água. Se engolir: Chamar um centro de informação antiveneno ou um profissional de saúde, em caso de se sentir mal.

4.2. Sintomas e efeitos mais importantes, imediatos e atrasados

Pode causar alergia ou sintomas de asma ou dificuldades respiratórias se inalado.

4.3. Indicação de atenção médica imediata e tratamentos especiais necessários

Tratar de acordo com os sintomas.

Secção 5: Medidas em caso de incêndio

5.1. Meios de extinção

Extinguir com espuma resistente a álcool, pó de extinção de fogos ou spray de água.

5.2. Perigos especiais da substância ou mistura

Nenhum conhecido

Secção 6: Medidas para fugas acidentais

6.1. Precauções pessoais, equipamento de proteção e procedimentos de emergência

Evitar a produção de pó e aerossóis. Evitar respirar o pó ou névoa de spray.

6.2. Precauções ambientais

Conter a fuga

6.3. Métodos e materiais de contenção da fuga e para limpeza

Métodos para contenção: Cobrir com absorvente ou conter a fuga. Coletar e descartar o material.

Métodos de limpeza: Usar equipamento de proteção pessoal adequado. Conter ou absorver o material com material inerte. Evitar que o material entre para escoamento de água, esgotos ou para o ambiente aquático.

Secção 7: Armazenagem e manuseio

7.1. Precauções para o manuseio seguro

Evitar criar pó ou aerossóis. Evitar o contacto com olhos, pele e roupa. Evitar respirar o pó ou spray. Assegurar uma ventilação adequada.

Medidas de Higiene: Manusear de acordo com as boas práticas de higiene e segurança industriais. É recomendado limpar regularmente o equipamento, local de trabalho e roupa. Evitar o contacto com olhos, pele e roupa. Usar luvas e proteção ocular/da face adequadas.

7.2. Condições para armazenamento Seguro, incluindo incompatibilidades

Manter o contentor bem fechado num local seco e bem ventilado. Proteger da luz. Manter/armazenar apenas no contentor original.

Secção 8: Controlos de exposição/ Proteção Individual

8.2. Controlos de exposição

Equipamento de Proteção Individual (EPI)

Proteção dos olhos/cara: Usar óculos de segurança com escudos oculares.

Proteção das mãos: Usar luvas de segurança com os requerimentos mínimos de EN420 quando manusear o produto sólido, para produtos líquidos luvas com os requerimentos EN374-2. As luvas de nitrilo, borracha de butilo, latex e PVC oferecem proteção suficiente.

Proteção para a pele e Corpo: Usar luvas e roupa/uniforme de segurança.

Proteção Respiratória: Assegurar ventilação adequada. No caso de irritação proteção respiratória aprovada deverá ser utilizada, como respiradores com filtros de partículas (EN143) ou filtros P3.

Secção 9. Propriedades Químicas e Físicas

Aparência

Estado físico: Líquido

Cor: Castanho-claro a castanho-escuro

Odor: Odor típico de produto fermentado

pH: 4.0-4.5

Solubilidade com água: Solúvel

Secção 13: Considerações para eliminação/descartar o material

13.1. Métodos de tratamento de resíduos

Métodos de descarte: Descartar os resíduos numa instalação de eliminação de resíduos aprovada. Eliminar os resíduos de acordo com as regulações locais.

Embalagem contaminada: Eliminar os contentores vazios e os resíduos de um modo seguro. Eliminar os contentores e resíduo de acordo com a regulação estabelecida.

A.3.3. Outros materiais utilizados

Agentes Químicos utilizados

Ácido Sulfúrico: N° CAS: 7664-93-9: H₂SO₄

Saúde	Inflamabilidade	Reatividade	Perigo específico
3	0	2	-



Frases de risco (H):

Corrosivo para os metais (H290). Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. (H314). Lesões oculares graves (H318).

Compostos sem efeito perigoso identificado:

N° CAS: 50-99-7- Glucose

N° CAS: 7732-18-5- H₂O

AGENTES BIOLÓGICOS UTILIZADOS:

Nível de Segurança 1:

Saccharomyces cerevisiae-Nível de Biossegurança 1 - Agentes não conhecidos por causar doenças consistentemente em adultos saudáveis e apresentar risco potencial mínimo para o pessoal do laboratório e o meio ambiente.

MEDIDAS DE PREVENÇÃO

Ácido Sulfúrico N° CAS: 7664-93-9: H₂SO₄

Frases de Prevenção:

P101 Se for necessário consultar um médico, mostre-lhe a embalagem ou o rótulo.

P223 Não deixar entrar em contacto com a água.

P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

Em caso de derrame de produtos químicos:

Evacuar a área contaminada. Evitar mais derrames e ventilar a área. Utilizar o agente adsorvente adequado

Limite a produção de pó ou de aerossóis. Não entrar em contato com a substância. Consultar a Ficha de Dados de Segurança do Material.

Em caso de derrame acidental de agentes biológicos ou GMOs

Cubra cuidadosamente o derramamento com papel absorvente e solução desinfetante sobre a área derramada.

Permita tempo de contato suficiente (pelo menos 30 min). Limpar o derramamento e descartar o material contaminado num saco de autoclave.

Desinfetar todos os materiais e equipamentos contaminados.

Lavar as mãos abundantemente com água e sabão.

Seguir os procedimentos operacionais do plano de emergência interno do laboratório.