



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Rita Fernandes Barbosa Pereira

**Produção de Bebidas Espirituosas Tendo Como
Base a Destilação Artesanal**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor José Maria Marques Oliveira

Mestre Destilador Pedro Rodrigues

DECLARAÇÃO

Nome: Ana Rita Fernandes Barbosa Pereira

Título dissertação: Produção de Bebidas Espirituosas Tendo Como Base a Destilação Artesanal

Orientador(es): Professor José Maria Marques Oliveira (Universidade do Minho)
Mestre Destilador Pedro Rodrigues (Tomorrow's Recipe, Lda.)

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Nos exemplares das teses de doutoramento ou de mestrado ou de outros trabalhos entregues para prestação de provas públicas nas universidades ou outros estabelecimentos de ensino, e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e, pelo menos outro para a biblioteca da universidade respectiva, deve constar uma das seguintes declarações:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 23/11/2018

Assinatura: _____

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado realidade, e aos quais estarei eternamente grata.

Em primeiro lugar, gostaria de deixar o meu sincero agradecimento ao orientador desta dissertação, Professor José Maria Marques Oliveira, pela partilha de conhecimentos e por todo o apoio e disponibilidade durante todo o percurso deste trabalho.

Ao meu orientador na empresa, Pedro Rodrigues, pela oportunidade de desenvolver este projeto na empresa, por todos os conhecimentos partilhados, por todo o seu apoio, tempo, confiança, paciência, simpatia e interesse na realização deste trabalho.

O meu agradecimento a todas as empresas, aqui não mencionadas, pelos apoios, orçamentos e serviços prestados.

A todos os meus amigos, que, de uma forma ou de outra, estiveram sempre disponíveis para ajudar, por todo o carinho e por me acompanharem em todas as fases da minha vida.

À minha mãe, um especial agradecimento, pelo apoio prestado no estudo da viabilidade económica, por todo o seu apoio, pelo incentivo, pelo seu amor incondicional, pelo seu esforço, sacrifício e dedicação para poder facultar as melhores condições para atingir o sucesso, por me acompanhar durante todo o meu percurso de vida e por ter sempre depositado toda a sua confiança em mim.

Ao Bruno, por todo o carinho, incentivo, motivação e paciência demonstrada no acompanhamento da elaboração desta dissertação e sobretudo por toda a importância que tem para mim.

À minha avó, ao meu irmão e ao Sr. Manuel, o meu enorme agradecimento pela compreensão, carinho, paciência e motivação.

Resumo

A empresa Tomorrow's Recipe, Lda. é uma microdestilaria, artesanal, produtora de bebidas espirituosas, que pretende expandir o seu negócio a nível nacional e internacional. A presente dissertação teve como objetivo a produção das diferentes bebidas espirituosas e projetar um laboratório nas instalações, uma vez que se trata de uma empresa recente sem estruturas laboratoriais. O laboratório permitirá a conceção de novos produtos e a realização análises físico-químicas e microbiológicas aos produtos.

Foram produzidos diferentes produtos, gins e vodka, dois dos quais são da autoria do mestre destilador e os restantes para clientes de acordo com as suas escolhas.

Foram determinadas as tarefas a executar no laboratório e elaborado um plano para a sua construção e montagem. Neste, está incluída a planta do espaço, o mobiliário e os equipamentos e materiais necessários para as funções laboratoriais.

Para averiguar da viabilidade económica do projeto, foram estudados os Fluxos Financeiros e os Balanços Totais com base nos custos de investimento iniciais, nos gastos de manutenção anuais e nos benefícios gerados, calculados anteriormente. Foram, também, calculados os indicadores da viabilidade económica, sendo estes o Valor Líquido Atual, a Taxa Interna de Rentabilidade, a Anuidade Equivalente e o Tempo de Recuperação. Com a avaliação destes fatores foi determinado que o projeto é viável, para a taxa mínima de atratividade de 10 %, de retorno financeiro a longo prazo, sendo estes de, aproximadamente, 8 anos.

Palavras-chave

Destilação, Bebidas Espirituosas, Gin, Vodka, Laboratório, Viabilidade Económica.

Abstract

Tomorrow's Recipe, Lda. Is a micro-distillery that produces artisanal spirits, which aims to expand its business both nationally and internationally. The purpose of the present dissertation was the production of different spirits and to design a laboratory in the facilities, since it is a recent company without lab structures. The laboratory allows the investigation of new products and the accomplishment of physical-chemical and microbiological analysis of the products.

Different products were produced, two of which were created and belong to the master distiller and the rest for costumers, according to their choices.

It was determined the different tasks to be performed in the laboratory and it was designed a lab construction and assembly plan. This include the space plan, the furniture and the equipment and materials needed to the lab function.

To determine the economic viability of the project, the Financial Flows and the Total Balance were studied based on the initial investment costs, annual maintenance costs and benefits generated, previously calculated. The economic viability indicators were also calculated, being this the Net Present Value, the Internal Rate of Return, the Annual Equivalent and the Recovery Time. From these it was determined the viability of the project, to the minimum rate of 10 % of attractiveness, of long-term financial return, which are, approximately, 8 years.

Keywords

Distillation, Spirits, Gin, Vodka, Laboratory, Economic Viability

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Índice de Tabelas	XII
Índice de Figuras.....	XII
Lista De Símbolos e Abreviaturas	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Tomorrow’s Recipe, Lda.....	1
1.2. Objetivos e Motivações	1
1.3. Estrutura da Dissertação	2
2. Enquadramento Teórico	5
2.1. Bebidas Espirituosas	5
2.2. Gin	6
2.2.1. Processo de Produção	7
2.2.1.1. Blended Gin	8
2.2.1.2. London Dry/Gin	8
2.3. Vodka.....	8
2.4. Vermute	9
2.4.1. Preparação do Vermute	10
2.4.2. Botânicos e Especiarias	11
2.5. Produção do Álcool.....	11
2.5.1. Moagem.....	11
2.5.2. Brasagem	11
2.5.3. Fermentação Alcoólica.....	13
2.5.4. Destilação do Álcool.....	14

2.6.	Levedura	15
2.6.1.	Taxonomia	16
2.6.2.	Morfologia, Estrutura e Composição	17
2.6.3.	Ciclo Celular	18
2.7.	Operações de Acabamento.....	18
2.7.1.	Enchimento	18
2.7.2.	Rotulagem	19
2.7.3.	Estampilha.....	20
2.8.	Contaminações Microbianas nas Destilarias.....	20
2.9.	Análise de Investimento.....	21
2.9.1.	Fluxos Financeiros	21
2.9.2.	Valor Atual Líquido	22
2.9.3.	Taxa Interna de Rentabilidade.....	22
2.9.4.	Anuidade Equivalente.....	23
2.9.5.	Tempo de Recuperação	23
3.	Produção de Gin e de Vodka	25
3.1.	<i>Blended gin</i>	25
3.2.	<i>London dry/gin</i>	26
3.2.1.	<i>Hoppy Gin</i>	26
3.2.2.	<i>585.5 miles</i>	26
3.2.3.	Experiência Realizada com Corantes	27
3.3.	Vodka	27
3.4.	Engarrafamento e Rotulagem	27
4.	O Laboratório	29
4.1.	Título Alcoométrico Volúmico.....	30
4.2.	Extrato Seco	30

4.3.	Acidez Volátil	31
4.4.	pH.....	31
4.5.	Análises Microbiológicas.....	31
4.5.1.	Lee's Multiple Differential Medium (LMDA)	32
4.5.2.	Coloração de Gram.....	32
4.5.3.	Lins Wild Yeast Media (LWYM)	32
5.	Projeto do Laboratório.....	33
5.1.	Planeamento e Construção	33
5.1.1.	Planta do Laboratório.....	34
5.2.	Equipamentos e Utensílios Laboratoriais	34
5.2.1.	Mobiliário	34
5.2.2.	Equipamento Laboratorial.....	35
5.2.3.	Material Laboratorial.....	36
6.	Análise da Viabilidade Económica	37
6.1.	Custos.....	37
6.1.1.	Equipamentos e Utensílios Laboratoriais	37
6.2.	Benefícios.....	37
6.3.	Fluxos Financeiros e Balanço Total.....	38
6.4.	Indicadores de Viabilidade Económica.....	41
7.	Considerações Finais	43
	Referências bibliográficas.....	45
	Anexo I – Protocolos Laboratoriais para Testes Microbiológicos.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Compostos presentes no gin	7
Tabela 2 – Lista de alguns botânicos e a parte da planta utilizada na produção do vermute	12
Tabela 3 – Classificação Taxonómica da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
Tabela 4 – Análises microbiológicas	32
Tabela 5 – Lista de equipamentos laboratoriais	35
Tabela 6 – Lista de material laboratorial	36
Tabela 7 – Custos de investimentos iniciais (C_i) dos equipamentos laboratoriais	38
Tabela 8 – Custo de investimentos inicial (C_i), taxa anual (T_a) e custo de renovação anual (C_a) dos materiais laboratoriais.....	38
Tabela 9 – Taxas utilizadas no estudo da viabilidade económica	39
Tabela 10 – Fluxos Financeiros (FF) e Balanços Totais (BT) ao longo de 10 anos de investimento.....	39
Tabela 11 – VAL para as taxas de atualização de 10 % e 15 %	41
Tabela 12 – Taxa Interna de Rentabilidade (TIR) e Tempo de Recuperação (TR)	41

Índice de Figuras

Figura 1 – Perfis de concentração (C) de biomassa, etanol, pH e extrato ao longo do tempo (t) de fermentação.....	13
Figura 2 – Características desejáveis das leveduras para produção de álcool neutro.....	15
Figura 3 – Estrutura de uma célula de levedura.....	18
Figura 4 – Fases do ciclo celular da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 5 – Planta do laboratório.....	34
Figura 6 – Planta 3D do mobiliário do laboratório.....	35
Figura 7 – Valor dos Fluxos Financeiros (V_{FF}) ao longo de 10 anos de investimento.....	40
Figura 8 – Valor do Balanço Total (V_{BT}) ao longo de 10 anos de investimento.....	41

Lista De Símbolos e Abreviaturas

Variáveis e constantes

AE – Anuidade Equivalente

AF – Acidez Fixa

AT – Acidez Total

AV – Acidez Volátil

BT – Balanço Total

BT_a – Balanço Total Atualizado

C_a – Custo de Manutenção Anual

C_i – Custo de Investimento Inicial

FF – Fluxo Financeiro

FF_a – Fluxo Financeiro Atualizado

TAV – Título Alcoólico Volumétrico

T – Temperatura

Ta – Taxa Anual

TIR – Taxa Interna de Rentabilidade

TR – Tempo de Recuperação

V – Valor dos Fluxos Financeiros; Valor dos Balanços Totais

VAL – Valor Atual Líquido

\emptyset – Diâmetro

Siglas

HLP – *Hsu's Lactobaccillus Pediococcus*

LMDA – *Lee's Multiple Differential Medium*

LWYM – *Lins Wild Yeast Media*

Expressões do Latim

et al. – *et alii* (e outros)

i.e. – *id est* (isto é)

e.g. – *exempli grata* (por exemplo)

1. Introdução

Com este capítulo pretende-se fazer um enquadramento ao trabalho realizado e está dividido em três pequenas partes. Numa primeira é feita a apresentação da empresa. Na segunda, são apresentados os objetivos e motivações para a realização do trabalho e da dissertação. E, a terceira e última parte, trata-se da estrutura da dissertação, onde são referenciadas as diferentes secções pelas quais o trabalho está dividido.

1.1. Tomorrow's Recipe, Lda.

Tomorrow's Recipe, Lda. é uma empresa de produção de bebidas espirituosas. Esta iniciou a atividade a 29 de outubro de 2016 e encontra-se sediada nas antigas instalações da escola primária da freguesia de Atiães, Vila Verde. A empresa foi fundada por Pedro Rodrigues, um jovem militar, que tinha como *hobby* fazer destilados num pequeno alambique de cobre, onde criou o seu primeiro produto, um Gin, o qual recebeu o nome de *Valley Gin*. O seu nome provém do local onde o Gerês se situa, entre vales e montanhas. Este Gin é intitulado como o primeiro gin do Gerês, uma vez que para a sua produção são utilizados botânicos provenientes desta serra, sendo mais conhecido como “O Gin do Gerês”.

Atualmente, na destilaria são produzidas três variedades de gins, o *Valley Gin* (considerado um gin *premium*), o *585.5 miles* (com base de algas) e o *Hoppy Gin* (feito a partir de cerveja). Para além destes gins, são também produzidos vodka e vermute. Futuramente, a empresa poderá vir a produzir diferentes bebidas espirituosas para além das indicadas.

O maior objetivo desta pequena empresa é a produção destas bebidas de forma artesanal, sem a adição de aromas artificiais e a produção do seu próprio álcool. Pretende manter, assim, o aroma natural e apelativo dos seus produtos, oriundo da vasta variedade de botânicos, para além de promover a produção tradicional.

1.2. Objetivos e Motivações

Em Portugal, o consumo de bebidas espirituosas é cada vez maior, tendo já um peso de 11 % no mercado. Este aumento deve-se ao elevado consumo por parte dos portugueses e à grande atividade turística. A exportação tem, também, vindo a ampliar, devido à grande procura deste tipo de produtos, o que se tem mostrado mais rentável para as destilarias. Visto que a empresa Tomorrow's Recipe, Lda. ainda está numa fase de crescimento e desenvolvimento, não possui laboratório próprio, vendo-se obrigada a recorrer a um laboratório externo para fazer as análises de rotina nos seus produtos e de

controlo de qualidade, de forma a garantir a sua qualidade e segurança para os consumidores. Este procedimento mostra-se bastante dispendioso.

De forma a diminuir estes custos e ultrapassar as limitações, um dos objetivos do projeto curricular, no âmbito deste trabalho de dissertação, seria a realização da análise da viabilidade económica referente à construção e montagem de um laboratório na própria empresa, sendo este equipado com toda a instrumentação laboratorial necessária. Para tal, estudar-se-iam os benefícios, os custos de investimento, os custos de manutenção, os fluxos financeiros e o balanço total. Este trabalho visava, também, a produção de produtos diferenciados, gins e vodkas, o projeto de um pequeno laboratório para a realização de análises físico-químicas ao produto e microbiológicas ao mosto e a análise da sua viabilidade económica. Assim, os objetivos deste trabalho são:

- Produção de gins destilados diferenciados;
- Apoio no enchimento, rotulagem, embalagem e controlo de limpeza;
- Planeamento instrumental laboratorial necessária para se efetuar os vários testes físico-químicos e microbiológicos ao produto e projeto de um laboratório;
- Análise do plano de investimento.

1.3. Estrutura da Dissertação

A presente dissertação é composta por sete partes. A primeira consiste no enquadramento geral, onde é apresentada e descrita a empresa, e os objetivos e as motivações para a realização do trabalho.

A segunda parte trata-se de uma introdução teórica aos conceitos pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho. Nesta parte são definidos os conceitos das bebidas espirituosas, do gin, da vodka e do vermute e são descritas as suas histórias. Também comporta os processos de produção das diferentes bebidas e do álcool utilizado nestas. É feita uma pequena revisão à levedura envolvida no processo de produção de etanol. No final desta parte, são ainda descritos os fundamentos teóricos que sustentam o estudo da viabilidade económica de um dado projeto.

Na terceira parte é feita a descrição dos processos utilizados para a produção das bebidas destiladas. Numa quarta parte são apresentadas as principais funções do laboratório a projetar. São apresentadas algumas análises físico-químicas para se fazerem ao produto e algumas análises microbiológicas que poderão ser realizadas ao mosto. A sua estrutura está descrita na quinta parte. Esta, engloba o planeamento e construção do laboratório e é apresentada a planta do laboratório. São ainda listados os equipamentos, materiais e utensílios laboratoriais necessários.

Na quinta parte encontra-se o estudo da viabilidade económica do projeto, onde são indicados os custos referentes à implementação do laboratório. São apresentados os resultados obtidos no cálculo de indicadores de viabilidade económica e é feita a sua discussão.

As considerações finais de todo o trabalho realizado encontram-se na sétima parte.

2. Enquadramento Teórico

Neste capítulo é feito um enquadramento teórico, onde são apresentadas as bebidas espirituosas e descritos os seus métodos de produção. É, também, descrito o processo de produção de álcool e é feita uma pequena apresentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, visto ser a mais utilizada na produção de etanol. Após o processo de produção são descritas as operações de acabamento utilizadas na empresa. Também é feita uma pequena referência à microbiologia na destilaria. No final, encontra-se uma revisão teórica à análise da viabilidade económica.

Apesar de não ter havido tempo para a elaboração do vermute, a bebida é apresentada neste capítulo, e descrito o seu processo de produção, visto ser do interesse da empresa para o futuro.

2.1. Bebidas Espirituosas

A produção e consumo de bebidas alcoólicas remonta há, pelo menos, 10 000 anos. Estas bebidas podem ser classificadas em três categorias: cerveja, vinho e bebidas espirituosas. A sua classificação baseia-se nos ingredientes e nos processos utilizados na sua produção. Todas as bebidas alcoólicas são produto da fermentação por leveduras de grãos, uvas, cana-de-açúcar, raízes ou tubérculos (Peterson, 2013; Venturini Filho, 2016).

As bebidas espirituosas representam uma grande porção da agricultura industrial por todo o mundo. Estes produtos vingaram no mercado a nível mundial, há centenas de anos, sendo que a sua reputação é devida à qualidade do sabor. Existem vários regulamentos, a nível nacional e internacional, onde são especificadas as regras e padrões nas definições, descrições e apresentações das diferentes categorias das bebidas espirituosas, podendo ser divididas em bebidas destiladas e em licores (Christoph & Bauer-Christoph, 2007). Estas são produzidas a partir de álcool retificado (96 %) e são sujeitas a processamentos de forma a conferir-lhes características aromáticas (Aylott, 1995; Regulamento (CE) N.º 110/2008). O etanol é um líquido sem cor, altamente inflamável à temperatura ambiente e com maior volatilidade em comparação com a água. O seu ponto de ebulição é de 78 °C à pressão atmosférica e solidifica à temperatura de -114 °C (Peterson, 2013).

O título alcoométrico volúmico (*TAI*) mínimo das bebidas espirituosas é de 15 %. São produzidas por destilação a partir de produtos agrícolas fermentados, e o seu sabor não é apenas derivado do aroma dos compostos fermentativos, mas, também, das matérias-primas e botânicos, do processo de destilação, e de armazenamento e envelhecimento [Christoph & Bauer-Christoph, 2007; Regulamento (CE) N.º 110/2008].

O gin, a vodka e o vermute são considerados bebidas espirituosas, em que o título alcoométrico volúmico, das duas primeiras, não deve ser inferior a 37,5 % e, o da última, inferior a 15 %, segundo o Regulamento (CE) N.º 110/2018 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 2 de agosto de 2018. O valor de *TAV* mínimo dos licores é 15 % e o conteúdo em açúcares não deve ultrapassar os 100 g/L, estes são produzidos por aromatização do álcool e destilados de origem agrícola, ou a partir de uma ou mais bebidas espirituosas com plantas naturais [Regulamento (CE) N.º 110/2008]. Estes destilados não necessitam de tempo de maturação como é o caso do *whisky* e do *rum*. Mais ainda, permitem ao mestre destilador ser criativo e desenvolver um produto diferente do já existente no mercado (Pauley & Maskell, 2017). Apesar do gin e da vodka oferecerem experiências gustativas diferentes ao consumidor, os processos iniciais de produção, e a fermentação, são similares (Pauley & Maskell, 2017).

2.2. Gin

O gin é uma bebida destilada, sem cor, considerada espirituosa, sendo que a sua produção envolve dois métodos de destilação, *Blended Gin* e *London Dry/Gin*, tendo sempre na sua constituição zimbro. O seu nome provém do francês *genievre*, que significa zimbro (Aumatell, 2012; Aylott, 1995).

Esta bebida, já alcoólica, foi descoberta em 1650 por Franciscus de la Boe, professor de medicina na Universidade de Leiden, Holanda, enquanto tentava obter um medicamento com a finalidade de tratar problemas de rins, desenvolvendo uma forma única de fornecer ao corpo óleo de zimbro, uma vez que tem capacidades diuréticas, ficando conhecida como “Genever” (Greer *et al.*, 2008).

A combinação de botânicos utilizados na produção de gin é definida por cada mestre destilador. A receita desta bebida não é divulgada. Desta forma, os mestres destiladores garantem um produto único, impossível de copiar. Para além das bagas de zimbro, podem ser adicionados outros botânicos, como anis, raiz de angélica, canela, casca de laranja ou limão, coentros e casca de cássia. A quantidade de ingredientes adicionados fica ao critério do destilador (Christoph & Bauer-Christoph, 2007). O gin é produzido por destilação de álcool neutro, em alambiques, onde são adicionados os vários botânicos. Antes de ser engarrafado, o produto resultante da destilação é diluído com água para reduzir o título alcoométrico volúmico, de acordo com a legislação. O álcool utilizado neste processo é produzido, essencialmente, a partir de cereais (trigo, centeio, cevada, entre outros) (Aylott, 1995; Christoph & Bauer-Christoph, 2007).

Nesta bebida, podem ser detetados vários compostos, sendo os principais os monoterpenos (hidrocarbonetos formados por duas unidades de isopreno), refletindo o impacto da composição dos

compostos das bagas de zimbro, os monoterpenos oxigenados e os sesquiterpenos, hidrocarbonetos formados por três unidades de isopreno (Christoph & Bauer-Christoph, 2007). Na Tabela 1 estão representados alguns compostos presentes no gin.

Tabela 1 – Compostos presentes no gin (adaptado de Aumatell, 2012; Christoph & Bauer-Christoph, 2017)

Monoterpenos	Monoterpenos oxigenados e ésteres	Sesquiterpenos
α -pineno	Linalol	γ -cadineno
β -mirceno	α -terpineol	δ -cadineno
Limoneno	4-terpineol	Cariofileno
γ -terpineno	Acetato de bornilo	β -elemeno
p -cimeno		

2.2.1. Processo de Produção

Os principais ingredientes utilizados na produção do gin são botânicos, água e álcool de origem agrícola. Define-se como álcool agrícola, álcool sem características distintas, aroma e sabor, que não afete o sabor do gin. Os botânicos deverão ser de boa qualidade e consistentes, uma vez que serão avaliados o teor de humidade, o conteúdo em óleo e as propriedades sensoriais. De forma a avaliar a qualidade do álcool para o gin realizam-se teste sensoriais, é medido o título alcoométrico volúmico e executam-se análises químicas. Tal como o álcool, a água não deverá ter odor nem sabor e deverá estar limpa e pura (Aylott, 1995).

A produção tradicional do gin é um processo realizado em *batch* e são utilizados alambiques de cobre que poderão ter um volume até 20 000 L. O alambique é um recipiente fechado, aquecido na base, em que a parte superior está ligada a um tubo estreito, onde passa o vapor de álcool. Este tubo está direcionado para um condensador de água fria, que causa a condensação do vapor para líquido (Aumatell, 2012; Christoph & Bauer-Christoph, 2007).

A primeira fase da produção é iniciada pela diluição do álcool com água, em recipientes alimentares, de forma a obter o teor de álcool desejado, compreendido entre os 40 % e os 60 %, em volume. Em seguida, adicionam-se os botânicos e deixa-se a macerar, durante um período de tempo definido pelo destilador. Uma vez macerado, o conteúdo dos recipientes é transferido para os alambiques. Nesta fase faz-se um aquecimento, cuidadosamente controlado, até temperaturas entre os 70 °C e os 80 °C (Aumatell, 2012;

Aylott, 1995). A estas temperaturas dá-se a evaporação dos compostos voláteis que serão destilados juntamente com o etanol. Após a destilação, recupera-se a parte central do destilado (corpo), a fração do produto, com cerca de 80 % de volume de álcool. As frações superior e inferior (cabeça e cauda) são combinadas e purificadas por destilação ou então poderão ser enviadas para a indústria/destilaria para recuperação do álcool (Alcarde, 2010; Aylott, 1995).

Antes do engarrafamento, o gin é sujeito a análises sensoriais rigorosas e poderá ser misturado com outros gins e álcool. Nesta fase, é necessário adicionar água de forma a reduzir o título alcoométrico volúmico para o valor requerido (Aylott, 1995; Aumatell, 2012).

2.2.1.1. *Blended Gin*

A produção do *Blended gin* é conseguida pela mistura de diferentes destilados de botânicos, *i. e.*, cada mistura hidroalcoólica/botânico, após a maceração, é destilada individualmente e em seguida, os produtos obtidos, são combinados. Alguns mestres destiladores optam por agrupar dois ou mais botânicos numa única destilação. A vantagem da destilação individual é permitir ao mestre destilador um maior controlo na taxa de extração dos sabores e aromas, uma vez que é possível apropriar o tempo de maceração, o teor alcoólico e a temperatura a que o alambique irá operar (Smith, 2018).

2.2.1.2. *London Dry/Gin*

O *London dry* também conhecido como *London gin* é caracterizado por apenas ter uma destilação em todo o processo, *i. e.*, os ingredientes são destilados em conjunto. Apesar de ser nomeado *London dry*, não é relacionado ao local específico, logo não precisa de ser produzido em Londres (London) [Du Bois *et. al.*, 2015; Regulamento (CE) N.º 110/2008].

2.3. Vodka

A vodka é uma bebida destilada, sem aroma nem sabor definidos, com origem na Europa Oriental, sendo a Rússia o primeiro país produtor (Prentice & Handsjuk, 2016). Foi produzida pela primeira vez por monges em Moscovo na tentativa de substituir as bebidas espirituosas de uvas ou *brandy*. O seu nome é proveniente da palavra russa para água, “*voda*”, e foi usado como sinónimo para álcool do destilado do fermentado de grão (Pauley & Maskell, 2017; Prentice & Handsjuk, 2016; Serna-Saldivar, 2010). As primeiras vodkas podiam ser processadas de forma a serem aromatizadas com frutos ou ervas, muitas vezes para esconder a fraca qualidade da bebida (Pauley & Maskell, 2017).

O álcool agrícola utilizado na vodka é produzido a partir da fermentação de cereais, batata ou outras matérias-primas agrícolas. A qualidade desta bebida é obtida por filtrações do destilado em carvão ativado

e por tratamento da água a utilizar nas diluições, sendo possível adicionar uma vasta variedade de frutos, ervas ou especiarias para lhe dar cor e aroma (Wakely, 2001). À exceção de alguns estilos, a vodka não é colocada em recipientes de madeira (*e.g.* barricas), nem envelhecida durante longos períodos de tempo (Christoph & Bauer-Christoph, 2007).

Tal como o gin, a vodka é destilada em alambiques de cobre onde se fazem cerca de nove destilações de modo a retificar o produto. Alguns mestres destiladores são capazes de obter um produto com cerca de 90 % de volume de álcool (Serna-Saldivar, 2010).

O processo de retificação é utilizado para purificar o álcool, removendo os compostos indesejados por destilações sucessivas, como compostos congêneres, óleos, metanol e aldeídos, que afetam a qualidade do produto final (Abou-Ganim & Faulkner, 2013).

2.4. Vermute

O vermute está classificado como sendo um vinho aromatizado. É um derivado da base de vinho fortificado e infundido com diferentes partes de plantas, como cascas de árvores e de frutas e sementes. O termo vermute deriva da palavra alemã para absinto (*Artemisia absinthium* Linn) *wermut*, em que *wer* significa homem e *mut* coragem. O absinto é uma planta com poderes medicinais e propriedades psicoativas e foi utilizada, em tempos, como medicamento para curar problemas a nível do estômago, incluindo a eliminação de vermes intestinais. Hoje em dia, esta planta já não é adicionada à bebida (Panesar *et al.*, 2009 e 2011, Venturini Filho, 2016).

Na antiga Roma o vermute tinha o nome de *Vinum Hippocraticum*. Pensa-se que Hippocrates macerou flores de ditamno e absinto num forte e doce vinho grego. Mais tarde os romanos começaram a produzir este vinho introduzindo-lhe outras ervas como o tomilho, o alecrim, a murta e o aipo. No início do século dezassete, *Signor Alessio* levou esta bebida para Itália. Mais tarde, no mesmo século, acredita-se que foi levada para a corte real francesa onde foi renomeada como vermute (*vermout*). França perdeu a oportunidade de se tornar o produtor original do vermute quando o jornal *Le Parisien* não se sentiu atraído pela receita de Alessio. No final do século dezassete, a produção do vermute caseiro em Itália tornara-se comum e em 1978 iniciou-se a sua produção comercial. Inicialmente, era produzido a partir do vinho tinto e era adicionado absinto para melhorar o sabor azedo e não comprometer a bebida com os aromas derivados da variedade de botânicos (Panesar *et al.*, 2011).

As matérias-primas utilizadas na sua produção são vinho, álcool, água, açúcar, extratos e destilados naturais de plantas aromáticas e caramelo. A principal característica procurada no vinho é a neutralidade,

para que não interfira no aroma e no sabor do vermute (Venturini Filho, 2016). O vinho é aromatizado com ervas, raízes e cascas de árvore. Pode incluir-se cardamomo, canela, manjerona e camomila, para alterar ou até melhorar o seu aroma. No final é fortificado com bebidas espirituosas. O valor de *TAV* do vermute está compreendido entre os 15 % e os 21 %, o seu aroma e gosto amargo é derivado da mistura de ervas com especiarias. Existem dois tipos de vermute, o doce e o seco, de origem italiana e francesa, respetivamente. Na versão italiana, o volume de álcool pode variar entre os 15 % e os 17 % com 12 % a 15 % de açúcar, enquanto que na versão francesa *TAV* é de 18 % e o açúcar é reduzido para 4 %. Este último, o seco, contém menos extratos de ervas e especiarias comparativamente com o doce, sendo estas quantidades, aproximadamente, entre os 3,74 mL/L e os 5,62 mL/L, para o seco, e entre os 5,62 mL/L e os 7,49 mL/L, para o doce (Panesar *et al.*, 2011).

2.4.1. Preparação do Vermute

O vermute tem como base vinho preparado a partir de sumo de uva ou de mosto concentrado, onde são acrescentados extratos de ervas e especiarias. Em seguida é feita uma fortificação da base até ao nível de álcool pretendido e no final a sua maturação (Panesar *et al.*, 2009).

Para a conversão da base de vinho em vermute é necessário que o vinho seja neutro. É adicionado açúcar, mistelas (um mosto de uvas fortificado) ou caramelo cuidadosamente preparado, de modo a aumentar a concentração de açúcar ou se se pretender escurecer a bebida, respetivamente. Deverá ser fortificado com *brandy* neutro e o extrato pode ser preparado pelo método e extração direta em que é calculada a quantidade adicionada na base até o vinho obter o sabor e aroma pretendidos. Durante este processo pode haver um aquecimento até 60 °C e o contentor deverá ser tapado para evitar perdas de aroma (Panesar *et al.*, 2009 e 2011).

No caso da produção de vermute seco, não deverá ser envelhecido durante muito tempo, pois a volatilização e a oxidação podem causar perdas de aroma. É preferível que seja engarrafado assim que o processo de produção finalize. Tanto o vermute doce como o seco deverão ter um valor baixo de pH. É usual adicionar SO₂, de forma a prevenir a deterioração por ação da *Lactobacillus trichodes* (Panesar *et al.*, 2009).

A qualidade e a natureza do vinho base, a qualidade e a concentração de diferentes botânicos utilizados ditam a qualidade e o tipo de vermute produzido. A sua viscosidade pode ser afetada pelo etanol e pela quantidade de extrato seco no vinho (Panesar *et al.*, 2009).

2.4.2. Botânicos e Especiarias

Todas as diferentes partes dos botânicos utilizados para a produção do vermute encontram-se secos quando misturados com vinho de base. Na Tabela 2 são apresentados os maiores constituintes de botânicos e especiarias utilizados.

2.5. Produção do Álcool

As fases do processo de produção de álcool neutro são a moagem, a brassagem, a fermentação e a destilação. A sua produção é separada de qualquer destilação de botânicos ou de qualquer outra operação na produção de bebidas espirituosas (Aylott, 2003).

2.5.1. Moagem

O método tradicional de produção do álcool para incorporação nas diferentes bebidas espirituosas envolve a seleção de cereais a utilizar (normalmente, são utilizados trigo, milho e cevada), para a produção do mosto. Os cereais são direcionados para um moinho mecânico, onde são moídos até à forma de farinha (Piggott, 2017; Thakur, 2006). Este processo permite, posteriormente, a extração e conversão do amido (Briggs *et al.*, 2004).

2.5.2. Brassagem

Brassagem ou sacarificação é um processo enzimático de transformação do amido em açúcar. Neste processo, a farinha obtida anteriormente é misturada com água e é aquecida até, aproximadamente, 85 °C, e em seguida a mistura é arrefecida até, aproximadamente, 69 °C. Posteriormente, o processo é novamente induzido pela adição de malte de cevada e tem a duração de 1 h à temperatura de 61 °C. Após o arrefecimento até aos 30 °C, a mistura é colocada em tanques de fermentação (Thakur, 2006). Para se obter um maior rendimento na produção de etanol, toda a mistura é fermentada (Piggott, 2017).

As enzimas presentes no malte dos cereais são responsáveis pela hidrólise do amido. Estas enzimas são ativadas pela temperatura de brassagem e degradam os hidratos de carbono, proteínas e substâncias fenólicas presentes na mistura. Desta forma são obtidos açúcares e compostos azotados. Os produtos obtidos irão servir como nutrientes para as leveduras durante o processo de fermentação (Teixeira & Cruz, 2014).

Designa-se por mosto a mistura açucarada obtida no final deste processo. A concentração em açúcares pode ser definida pelo seu extrato ou densidade em graus de Plato (°P). O extrato é uma medida do conteúdo total de açúcares fermentescíveis e de hidratos de carbono solúveis não-fermentescíveis no mosto (Teixeira & Cruz, 2014).

Tabela 2 – Lista de alguns botânicos e a parte da planta utilizada na produção do vermute (adaptado de Panesar *et al.*, 2009)

Nome comum/comercial	Nome científico	Parte da planta utilizada
Absinto	<i>Artemisia absinthium</i> Linn.	Planta
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.	Planta florida
Alho	<i>Syzygium aromaticum</i> (Linn.)	Flor
Aloe	<i>Aloe perryi</i> Baker	Planta
Amêndoa amarga	<i>Prunus amygdalus</i> Batsch	Semente
Angelica	<i>Angelica archangelica</i> Linn.	Raiz (por vezes a semente)
Açafrão	<i>Crocus sativus</i> Linn.	Parte florida
Bálsamo de limão	<i>Melissa officinalis</i> Linn.	Planta florida
Baunilha	<i>Vanilla planifolia</i> Andr. syn. <i>V. fragrans</i> Ames	Feijão
Cardamomo-menor	<i>Elettaria cardamomum</i> Mat.	Fruto seco
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Casca
Carvalhinha	<i>Veronica officinalis</i> Linn.	Planta
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> Linn.	Semente
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Raiz
Laranja amarga	<i>Citrus aurantium</i> Linn. Var. <i>amara</i>	Casca da fruta
Noz-moscada	<i>Myristica fragrans</i> Houtt	Semente
Romã	<i>Punica granatum</i> Linn.	Casca da raiz
Ruibarbo	<i>Rheum rhapanticum</i> Linn.	Raiz
Sábio	<i>Salvia officinalis</i> Linn.	Parte aérea e flores
Sabugueiro	<i>Sambucus nigra</i> Linn.	Flor
Sálvia	<i>Salvia scalera</i> Linn.	Flores e folhas
Segurelha-dos-jardins	<i>Satureja hortensis</i> Linn.	Parte aérea das plantas
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> Linn.	Folha
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i> Linn.	Raiz
Zedoária	<i>Curcuma zedoaria</i> Rosc.	Raiz

2.5.3. Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio que ocorre espontaneamente e envolve uma mistura complexa de microrganismos, leveduras. Industrialmente, é possível selecionar apenas uma espécie de levedura. As leveduras selecionadas transformam os carboidratos (açúcares) em etanol, dióxido de carbono, calor e outros compostos secundários (Briggs *et al.*, 2004). A Equação 1 representa a conversão da glucose em etanol (Cheremisinoff, 2003; Jackman, 1991). O tempo de fermentação do mosto depende da temperatura e do teor em açúcar, entre outros. Quando compreendida entre 25 °C e 30 °C dura cerca de uma semana (Serna-Saldivar, 2010).



Os perfis de concentração de biomassa, etanol, pH e extrato ao longo do tempo de fermentação, são apresentados na Figura 1. O progresso da fermentação é, em geral, monitorizado através da medição do extrato do mosto. O número de células de levedura em suspensão aumenta rapidamente nas primeiras 8 h a 12 h. A produção de etanol segue o crescimento inicial da levedura, passando depois a ter um comportamento linear até ao consumo dos açúcares metabolizáveis. Poderá, também, continuar após o pico da concentração de levedura em suspensão. Também, durante o período de crescimento da levedura, um mau controlo poderá levar a um aumento da temperatura até cerca de 33 °C derivado da rápida metabolização do açúcar. O pH do mosto diminui ao longo da fermentação, verificando-se um ligeiro aumento no final; tal comportamento está relacionado com a produção de ácidos orgânicos (Piggott, 2017; Teixeira & Cruz, 2014).

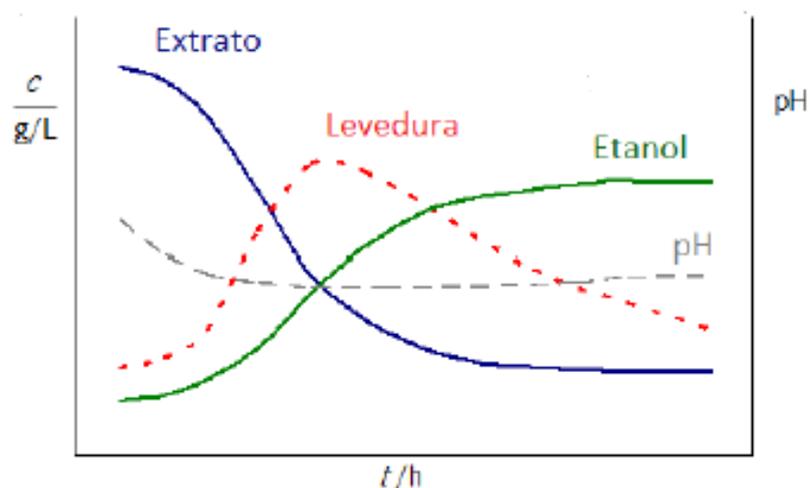


Figura 1 – Perfis de concentração (C) de biomassa, etanol, pH e extrato ao longo do tempo (t) de fermentação (adaptado de Teixeira & Cruz, 2014).

Durante a fermentação, há a formação de compostos voláteis que contribuem para o aroma e o sabor, tais como: álcoois superiores, ácidos orgânicos e seus ésteres e compostos carbonílicos, capazes de passar no destilado e contribuir para o aroma final. Já o glicerol, também produzido, não tem a capacidade de passar no destilado, representando uma perda no rendimento (Oliveira, 2001; Piggott, 2017).

No final da fermentação, entre as 48 h e as 72 h, ocorre a morte e autólise das leveduras. Desta forma, apenas é possível uma concentração de etanol entre 12 % a 15 % no fermentado. Para se obter uma maior concentração de etanol é necessário recorrer à destilação (Cheremisinoff, 2003; Piggott 2017).

2.5.4. Destilação do Álcool

A destilação é um processo de separação por pontos de ebulição. No caso em estudo, sabendo que a temperatura de ebulição da água é 100 °C e a do etanol 78,3 °C, é possível fazer a separação destes dois componentes ajustando a temperatura do processo para um valor mais alto do que o do etanol, mas mais baixo do que o da água. Contudo, não é possível obter-se etanol a 100 %, uma vez que é formado um azeótropo, com 96 % de etanol e 4 % de água (Cheremisinoff, 2003).

Ao contrário da indústria cervejeira, após a fermentação, o mosto é colocado em alambiques e são feitas duas ou três destilações. Ou então os alambiques são equipados com colunas de retificação, que poderão ter cerca de 6 m de altura e com o máximo de 15 pratos, igualmente separados entre si. A primeira destilação contém *TAV* de cerca de 57 %. Para se obter um valor mais elevado (96 %) o produto obtido anteriormente é sujeito a uma segunda destilação (Piggott, 2017; Thakur, 2006).

Industrialmente, a destilação é contínua (uma vez que a produção é em larga escala) em que, por norma, são utilizadas duas colunas. A primeira tem como função a separação do álcool e do caldo fermentado, obtendo-se um produto com *TAV* de 85 %, e a eliminação de substâncias voláteis indesejadas. A segunda tem a função de retificar e concentrar o álcool de forma a obter *TAV* elevado, 96,5 % (Jackman, 1991).

De notar que os processos de produção de etanol para combustível são os mesmos, à exceção que no final este é desidratado e desnaturado com uma pequena percentagem de um produto qualquer (pode ser gasolina), tornando o seu sabor e aroma desagradáveis e, assim, impróprio para consumo (Cheremisinoff, 2003).

2.6. Levedura

As leveduras são microrganismos eucariotas capazes de metabolizar açúcares de diversas origens, sobretudo em CO₂ e etanol, num processo conhecido como fermentação alcoólica (Briggs *et al.*, 2004; Dussap & Poughon, 2017). A seleção apropriada da levedura é essencial para se obter um alto rendimento de etanol e para manter a qualidade sensorial do produto (Walker & Stewart, 2016). Para tal, as características desejadas são, geralmente, listadas. Nesta listagem estão incluídas a utilização de carboidratos, a rapidez da fermentação, a tolerância ao álcool e a estabilidade das culturas. Para além destas características é, também, usual incluir a tolerância ao stress, que contribuirá para a redução da necessidade de água e de energia; a produção mínima de congéneres voláteis e um nível mínimo de aromas indesejáveis. Esta listagem está sumarizada na Figura 2 (Pauley & Maskell, 2017).

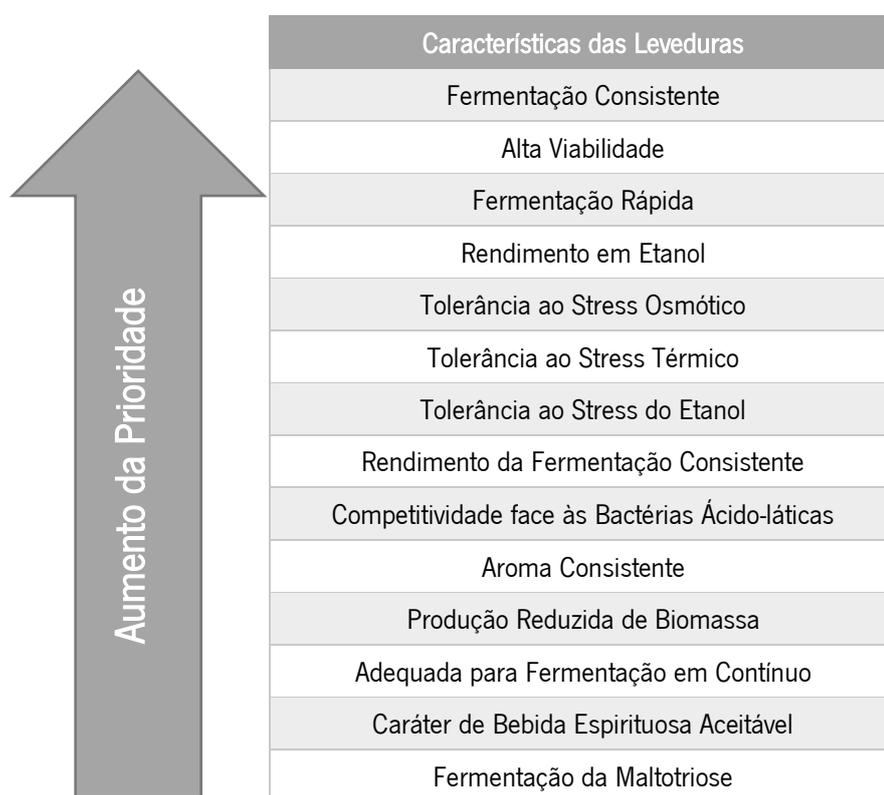


Figura 2 – Características desejáveis das leveduras para produção de álcool neutro (adaptado de Pauley & Maskell, 2017).

Para além destas características é, também, tido em conta as propriedades anti-bacterianas, a tolerância ao dióxido de carbono, a estabilidade genética e a resistência ao stress envolvido aos processos de desidratação e reidratação (Pauley & Maskell, 2017).

A produção de bebidas alcoólicas a partir da fermentação de fontes de carbono por leveduras é a biotecnologia mais antiga e importante economicamente. A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie que

domina, a nível mundial, a produção de álcool. As destilarias, produtoras de álcool e bebidas espirituosas, utilizam culturas puras de estirpes da *S. cerevisiae* específicas (Teixeira & Cruz, 2014; Walker & Stewart, 2016). A escolha desta levedura tem como base a sua influência nas características organoléticas das diferentes bebidas. Estirpes desta espécie, possuem bastantes características desejadas para a produção de etanol (Dussap & Pughon, 2017; Pauley & Maskell, 2017; Walker & Stewart, 2016).

A *S. cerevisiae* é uma levedura poliploide e reproduz-se assexuadamente por gemulação. Este microrganismo tem um número limitado de divisões, que está compreendido entre 10 e 30. Após cada divisão, a célula da levedura fica com uma cicatriz, que é apenas possível visualizar recorrendo à microscopia eletrónica (Briggs *et al.*, 2004; Dussap & Pughon, 2017) ou à microscopia de fluorescência (segundo o Doutor Luís).

2.6.1. Taxonomia

A levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro eucariota a ter o seu genoma sequenciado na totalidade. Foi em 1996 que os 12 milhões de pares de bases deste microrganismo foram sequenciados (Aswad *et al.*, 2015). Na classificação taxonómica, os organismos são agrupados em hierarquias de relações e diferenças tendo em conta a sua genética, morfologia, ciclo celular, propriedades imunológicas e capacidades bioquímicas. O nome do género, *Saccharomyces*, é traduzido como o “fungo dos açúcares”, referindo-se ao local onde o organismo é encontrado e ao reino a que pertence, *Fungi*. O nome da espécie, *cerevisiae*, significa cerveja em latim em que *ceres* significa grãos e *vis* força. Na Tabela 3, está representada a classificação taxonómica da levedura (Briggs *et al.*, 2004).

Tabela 3 – Classificação Taxonómica da *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Aswad *et al.*, 2015 e Briggs *et al.*, 2004)

Taxon	Nome
Super-reino	<i>Eucaryota</i>
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Sub-filo	<i>Saccharomycotina</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordem	<i>Saccharomycetales</i>
Família	Saccharomyceteae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Espécie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.6.2. Morfologia, Estrutura e Composição

As leveduras *S. cerevisiae* são fungos unicelulares, capazes de se organizar em agregados multicelulares ou comunidades (Aswad *et al.*, 2015). Geralmente, as suas células têm o formato de um elipsoide com um diâmetro maior que varia entre os 5 µm e os 10 µm e um menor que ronda os 5 µm (Walker & Stuart, 2016). Estas células apenas são visíveis após a proliferação, resultando num conjunto de milhões de células. Individualmente, são impercetíveis ao olho humano. Em líquidos, este conjunto de células toma a aparência de uma película superficial, sedimentos ou turvação. Já em meio incolor, a *Saccharomyces* poderá possuir uma cor esbranquiçada, cinzenta ou bege. É comum a biomassa da levedura estar manchada pelos componentes do meio que aderem à parede celular (Briggs *et al.*, 2004).

Quanto à estrutura da célula, a membrana que reveste o seu núcleo tem a função de proteger os cromossomas. A parede e membrana celular mantêm a integridade da célula, envolvendo o citoplasma onde se dispõem os vários organelos (Briggs *et al.*, 2004). Como qualquer fungo, a *S. cerevisiae* é constituída por uma parede celular, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vacúolo e vesículas secretoras (Walker & Stuart, 2016). Na Figura 3, encontra-se a estrutura de uma célula de levedura.

Após a transferência de uma célula da levedura para um meio com agar ou gelatina, verifica-se a formação de uma massa circular de células, uma colónia. O seu tamanho e forma varia com a espécie da levedura, natureza do meio de crescimento, do agente de solidificação e das condições de incubação. Com estes parâmetros, é possível fazer-se uma diferenciação de leveduras, uma vez que algumas espécies individuais, ao crescerem para colónias, apresentam uma morfologia própria, característica (Briggs *et al.*, 2004).

A composição da célula da levedura é maioritariamente água, sendo a sua percentagem, aproximadamente, 80 %. O segundo elemento mais abundante é o carbono, o seu peso seco ronda os 50 %. Os restantes elementos são o oxigénio, constituindo cerca de 30 % a 35 %, nitrogénio e hidrogénio, 5 % cada, e fósforo, 1 %. Quanto às macromoléculas, cerca de 40 % a 45 % do peso seco da célula são proteínas, 30 % a 35 % são carboidratos, 6 % a 8 % ácidos nucleicos e 4 % a 5 % são lípidos. A levedura também contém minerais, correspondendo aproximadamente 5 % a 10 % do peso seco da célula (Briggs *et al.*, 2004).

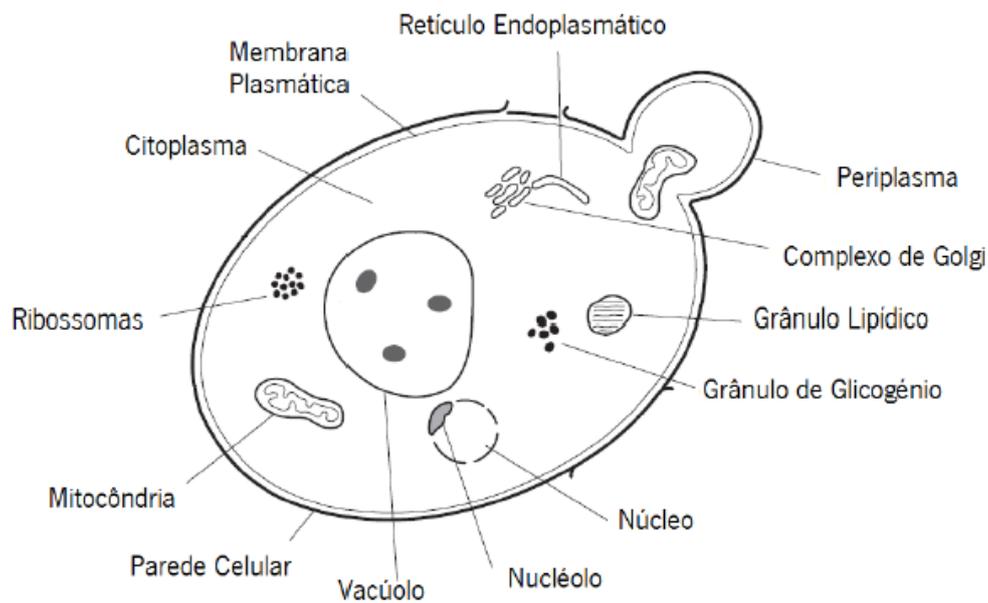


Figura 3 – Estrutura de uma célula de levedura (adaptado de Briggs *et al.*, 2004).

2.6.3. Ciclo Celular

O ciclo celular é a combinação de eventos desencadeados durante os intervalos entre a separação de sucessivas células-filhas. Este processo requer a coordenação de vários processos bioquímicos que levam ao crescimento celular e de uma série de eventos que resultam na multiplicação celular. Este ciclo exige uma coordenação de eventos contínuos como o crescimento celular com processos descontínuos de replicação de ADN, mitose e excisão da célula filha (Briggs *et al.*, 2004).

O ciclo celular pode ser ponderado em três pontos de vista. No primeiro, há uma alteração morfológica no momento em que a célula mãe dá origem a uma célula filha. O segundo, trata-se dos eventos bioquímicos que suportam o processo da proliferação celular. Por último, o terceiro ponto, são os mecanismos moleculares que regulam o processo coordenado do crescimento e multiplicação celular (Briggs *et al.*, 2004). Na Figura 4, é possível visualizar as diferentes fases do ciclo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.7. Operações de Acabamento

2.7.1. Enchimento

Após a preparação das bebidas espirituosas passa-se ao processo de enchimento. Trata-se do acondicionamento do produto em dornas ou diretamente dentro de garrafas com o auxílio de uma enchedora.

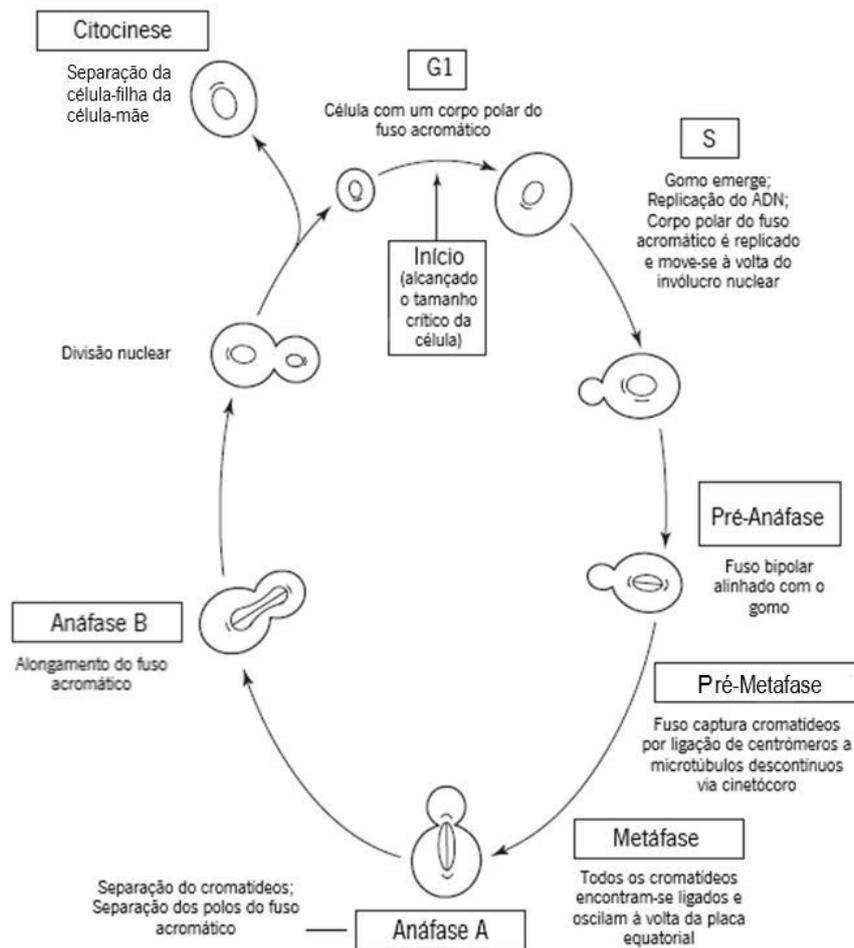


Figura 4 – Fases do ciclo celular da *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Briggs *et al.*, 2004).

O enchimento é realizado com uma enchedora específica, esta é regulada conforme o tamanho da garrafa e a quantidade a encher. Pode ser feito logo após a preparação do produto, a partir da cuba, ou então, a partir da dorna, sendo o produto direcionado diretamente para a enchedora.

Caso se pretenda acondicionar o produto em dornas para, posteriormente, ser engarrafado, a transferência para as cubas é feita com o auxílio de bombas. Tratando-se de produtos à base de álcool, é necessário fazer-se uma boa selagem das cubas e serem mantidas em locais frescos, evitando-se a sua evaporação. Desta forma, é possível armazenar o produto durante um período de tempo alargado.

2.7.2. Rotulagem

Nesta fase, são colocados os rótulos nas garrafas, processo pode ser manual ou ser realizado por uma rotuladora. É importante que os rótulos contenham, para além da marca, a designação e proveniência do produto, a quantidade, o título alcoométrico volúmico, a informação da empresa onde foi produzido e engarrafado (IWV, 2017).

2.7.3. Estampilha

As estampilhas são colocadas de modo a não permitir a sua reutilização e em local bem visível da embalagem, antes da bebida espirituosa ser declarada. Estas apenas são colocadas quando as bebidas são destinadas a ser consumidas no território nacional (Portaria N.º 117/2015). Trata-se de um imposto sobre as bebidas alcoólicas.

2.8. Contaminações Microbianas nas Destilarias

Nas bebidas destiladas, a estabilidade microbiológica do produto final não suscita grande preocupação, uma vez que, estando *TAV* acima de 15 %, o crescimento dos microrganismos é inibido. Contudo, o álcool só é considerado bactericida quando estiver acima dos 60 %. Tal deve-se ao facto de o crescimento microbiológico ser limitado pela concentração de etanol (Hughes, 2018). Assim, apesar das técnicas de processamento utilizadas em destilarias, dos ingredientes e do alto teor em álcool, as bebidas destiladas podem sofrer contaminações microbianas (Marriott, 2012).

As contaminações microbiológicas poderão ocorrer em áreas da destilaria onde a concentração de álcool é suficientemente baixa (Hughes, 2018). Ao contrário da indústria cervejeira, nas destilarias de álcool, a fase de ebulição do mosto não é praticada e assim a contaminação torna-se inevitável (Wilson, 2014). Tal deve-se ao facto de a fermentação não ser um processo estéril (Piggott, 2017). Os potenciais contaminantes que podem ser encontrados nas fermentações são bactérias ácido-láticas (bactérias Gram-positivas), bactérias ácido-acéticas, bactérias entéricas (bactérias Gram-negativas) e leveduras selvagens. As primeiras podem ser encontradas no malte ou em leveduras, afetando o processo de fermentação. As bactérias ácido-acéticas e as bactérias entéricas provêm dos botânicos. Os dois tipos crescem no mosto, na fase inicial da fermentação. Por fim, as leveduras selvagens, tal como as bactérias ácido-láticas, encontram-se no malte e ocorrem na fase inicial da fermentação (Wilson, 2014). As leveduras selvagens, tratam-se de leveduras contaminantes, de diferentes estirpes de *Saccharomyces* ou não-*Saccharomyces*, altamente competitivas e que passam a predominar na população de células presentes. A sua ocorrência poderá levar a reduções no rendimento fermentativo, maior tempo de fermentação e maior formação de espumas. Desta forma, a destilaria produzirá menor quantidade de etanol (Ceccato-Antonini, 2012).

A presença dos microrganismos no mosto poderá provocar efeitos adversos direta ou indiretamente. De forma direta, a contaminação ocorre quando se regista a presença de microrganismos indesejáveis. Tal deve-se ao facto de o mosto ser rico em oxigénio e nutrientes. Ao contrário da indústria cervejeira, as

destilarias não acrescentam lúpulo (um dos ingredientes principais da cerveja) que tem propriedades antissépticas, inibindo o crescimento das bactérias Gram-positivas. A contaminação indireta poderá derivar do crescimento microbiano nas matérias-primas conduzindo a alterações indesejáveis afetando o seu comportamento durante o processo, ao aparecimento de metabolitos indesejáveis, que poderão persistir durante todas as etapas de fabricação do mosto, e ao aparecimento de biomassa microbiana (Briggs *et al.*, 2004). A contaminação por estes microrganismos poderá resultar numa perda de rendimento da fermentação no que diz respeito à produção de etanol e produzir aromas e sabores indesejáveis (Piggott, 2017).

2.9. Análise de Investimento

A análise de investimento de um projeto tem como objetivo verificar se este é sustentável, em termos económicos e financeiros, durante a sua fase operacional (Neto, 2005). Para tal, é necessário definir os objetivos do projeto, identificar opções para os alcançar, identificar os custos, benefícios, horizonte temporal e incertezas associadas a cada opção e, por fim, é necessário realizar um teste da viabilidade de investimento (Couto *et al.*, 2004). Um estudo da viabilidade só será satisfatório se analisar todos os elementos principais e as implicações de base de um projeto industrial. Qualquer lacuna neste domínio limitará a sua utilidade (Camacho & Rosa, 1989).

Fazer uma análise de investimento requer, numa fase inicial, a realização de estudos técnicos com a finalidade de avaliar a viabilidade de iniciar um novo projeto (Marques, 2000). Este estudo permite firmar as condições que satisfazem os requisitos de quem promove o projeto no sentido de clarificar vantagens da sua realização.

Numa fase seguinte, são determinados os fluxos financeiros gerados pelo projeto, de forma a avaliar a rentabilidade financeira do mesmo. Sendo o objetivo das empresas a obtenção de lucros, torna-se necessário determinar o retorno do investimento, após o agrupamento da informação referente ao projeto. Para quem investe é necessário que se torne atrativo o lucro gerado (Couto *et al.*, 2004).

2.9.1. Fluxos Financeiros

Fluxos financeiros, ou *cash-flow*, são os custos ou benefícios que se espera vir a decorrer de um determinado projeto de investimento, *i. e.*, correspondem a entradas ou saídas de fundos de caixa, quer estes se destinem a suportar os custos do investimento, ou a fazer face a despesas de exploração ou alienação do investimento (Saias *et al.*, 1998). Trata-se, então, do melhor método de avaliação para analisar a viabilidade económica de um projeto (Frank & Bernanke, 2004). Este método permite averiguar

a capacidade de uma empresa gerar dinheiro e em que tempo útil o faz, mostrando toda a sua estrutura financeira e todas as variações aí ocorridas (Silva, 2012).

2.9.2. Valor Atual Líquido

O valor atual líquido (*VAL*) corresponde ao valor no momento presente do excedente de fundos gerados pelo projeto, uma vez remunerado e reembolsado o capital investido (Saias *et al.*, 1998). É obtido pela soma algébrica do valor atual de todos os fluxos de caixa inerentes ao projeto, atualizados ao custo de oportunidade do capital. O cálculo do *VAL* é traduzido pela Equação 2 (Couto *et al.*, 2004).

$$VAL_k = \sum_{t=0}^n \frac{CF_t}{(1+k)^t} \quad (Eq. 2)$$

Em que:

n – horizonte de análise;

t – período de tempo;

CF_t – fluxo financeiro gerado pelo projeto no período t ;

k – taxa de atualização.

A taxa de atualização é a taxa em que se avaliam valores futuros do ponto de vista do momento atual. Trata-se da rentabilidade que o investidor exige para implementar um projeto de investimento e irá servir para atualizar os fluxos de caixa gerados pelo menos (Silva, 2016). Se $VAL > 0$, o investimento gera fluxos de caixa que possibilitam a recuperação integral do valor investido, com remuneração do capital a uma taxa de rentabilidade superior à exigida pelo promotor do investimento. Se $VAL < 0$, o investimento não gera fluxos de caixa que possibilitam a recuperação integral do valor investido. Se VAL é nulo, o projeto tem capacidade para repor o capital investido e para remunerar esse capital à taxa exigida, sem criar valor para a empresa (Couto *et al.*, 2004; Lopes, 2012).

O *VAL* permite ao promotor do investimento avaliar a margem que existe para derrapagens no custo do investimento, sem pôr em causa a viabilidade do negócio (Lopes, 2012).

2.9.3. Taxa Interna de Rentabilidade

A taxa interna de rentabilidade (*TIR*) é a taxa de atualização que torna nulo o *VAL* do projeto, *i. e.*, é a taxa máxima a que o investidor pode remunerar os capitais investidos (Silva, 2016). No cálculo de *TIR* trata-se de encontrar a taxa de atualização que iguala o valor atual dos fluxos de exploração líquidos do

projeto ao valor atual dos custos de investimento (Lopes, 2012). O cálculo de TIR é evidenciado na Equação 3. Trata-se de, na Equação 2, igualar o VAL a zero.

$$0 = \sum_{t=0}^n \frac{CF_t}{(1+k)^t} \quad (Eq. 3)$$

A TIR corresponde à taxa máxima a que a empresa poderá financiar o projeto sem que o mesmo se salde numa perda líquida para a empresa (Saias *et al.*, 1998). Esta taxa não torna necessária a determinação do custo de capital do projeto para determinar a sua rentabilidade. Para ser usada como critério de decisão é necessário comparar o valor de TIR obtida, rentabilidade intrínseca do projeto, como o custo do seu financiamento. O critério de decisão é: se o projeto tem uma TIR superior ao custo de capital, cria valor e será aceite, caso contrário, o projeto não deve ser implementado (Lopes, 2012). Se o valor de TIR for igual à taxa de atualização, é indiferente aceitar ou rejeitar o projeto, visto que o investimento remunera os capitais a uma taxa idêntica à do custo de oportunidade do capital (Couto *et al.*, 2004).

2.9.4. Anuidade Equivalente

A anuidade equivalente (AE) é um critério utilizado quando existe mais do que uma alternativa de investimento, ou seja, é utilizada para comparar projetos distintos, *i. e.*, com montantes iniciais e tempos de vida útil diferentes (Abecassis & Cabral, 2000). A Equação 4 traduz o cálculo de AE .

$$AE_k = VAL_k \times \frac{k(1+k)^n}{(1+k)^n - 1} \quad (Eq. 4)$$

2.9.5. Tempo de Recuperação

O tempo de recuperação (TR) mede o tempo necessário para que os *cash-flows* gerados pelo projeto cubram os *cash-flows* nele investidos, *i.e.*, traduz o tempo necessário para o projeto gerar fluxos de caixa suficientes para recuperar o valor investido (Couto *et al.*, 2004; Lopes, 2012). É um método utilizado na avaliação de projetos. O limite máximo de TR de um projeto é estabelecido e o projeto é rejeitado caso exceda esse limite (Lopes, 2012).

3. Produção de Gin e de Vodka

A produção das bebidas espirituosas na empresa Tomorrow's Recipe é feita artesanalmente. Durante o período de estágio foram produzidos dois tipos de bebidas espirituosas, Gin e Vodka.

Para a produção dos Gins foram utilizadas duas técnicas distintas, uma primeira em que os botânicos são macerados e destilados separadamente, produzindo-se um *Blended gin*, e uma segunda em que apenas se faz uma só maceração e destilação, obtendo-se um *London dry/gin*. O processo de maceração dos botânicos é o mesmo para as duas variedades de Gins.

Todo o álcool utilizado para a produção das diferentes bebidas é adquirido a uma destilaria externa. No futuro, a Tomorrow's Recipe virá a produzir o seu próprio álcool.

3.1. *Blended gin*

Como explicado no Subcapítulo 2.2, o *Blended gin* é produzido pela mistura dos diferentes produtos de botânicos destilados separadamente. Assim, inicialmente é feita uma diluição de uma quantidade pretendida de álcool com água de forma a obter-se uma mistura com teor alcoólico entre 40 % e 60 %. Esta diluição e posterior maceração foram realizadas em recipientes alimentares. Desta forma preparou-se vários recipientes para a maceração de cada botânico.

Em seguida, pesou-se o botânico de interesse e adicionou-se ao recipiente. A esta quantidade é definida pelo mestre destilador é ele também quem decide se dois ou mais botânicos serão macerados em conjunto. Este processo é repetido para cada botânico. Para definir a quantidade de cada botânico, é tido em conta o sabor e aroma que pretende dar ao Gin, ou seja, para além do zimbro, o segundo ingrediente mais predominante será aquele que irá sobressair na bebida. O tempo de maceração é, também, estabelecido pelo mestre destilador, podendo ser de 1 dia a 1 semana.

Posteriormente, procedeu-se à destilação. Nesta fase, os conteúdos dos recipientes são colocados em alambiques. Botânicos diferentes são colocados em alambiques diferentes. A destilação tem início quando a temperatura do alambique atinge, aproximadamente, os 80 °C. Inicialmente, retirou-se a cabeça do destilado. A quantidade a remover é previamente acordada com a alfandega e, normalmente, o valor, em percentagem, está entre os 5 % e os 15 %. Após a cabeça, foi recolhido o coração do destilado e por fim a cauda. A quantidade de cauda a remover é, também, acordada com a alfandega e rondará os 10 % a 20 %. O volume é calculado antes de se iniciar a destilação.

Após a destilação, o coração do destilado pode ser armazenado em cubas ou então misturado com outros destilados de botânicos. O título alcoométrico ronda os 60 %. Para a mistura, o mestre destilador, mais uma vez, define o volume de cada destilado a misturar. Após este processo, o título alcoométrico volúmico é corrigido, pela adição de água, para 40 %. A partir deste momento o Gin está pronto para ser engarrafado e rotulado.

Este é o processo utilizado para a produção do *Valley Gin*, o gin criado pelo mestre destilador Pedro Rodrigues, que tem na sua constituição 9 botânicos e são realizadas 7 destilações na sua produção.

3.2. *London dry/gin*

Para a produção do *London dry/gin*, os botânicos são macerados e destilados ao mesmo tempo, ou seja, apenas há uma maceração e uma destilação. Neste caso, opta-se por adicionar as quantidades dos diferentes botânicos ao álcool, já diluído, para macerar. Após a maceração todo o processo de destilação é igual ao descrito anteriormente para o *Blended gin*.

Uma vez retirado o corpo, procedeu-se à correção do título alcoométrico para os 40 % e o engarrafamento e rotulação do mesmo. Também é possível armazenar antes, ou após, da correção. O *Hoppy Gin* e o *Gin 585.5 miles* encontram-se inseridos neste género de Gin.

3.2.1. *Hoppy Gin*

O *Hoppy Gin* é um *London dry/gin* produzido a partir de cerveja. Para a produção deste Gin, a cerveja é destilada duas vezes, de forma a obter-se um produto com um título alcoométrico volúmico mais elevado, uma vez que a cerveja produzida para este efeito tem um título de 10 %. Visto que o produto obtido das destilações já tem um título alcoométrico volúmico entre os 40 % e os 60 % não há a necessidade de se recorrer a uma diluição. Em seguida, é feita a maceração dos botânicos e posterior destilação. Apesar de se tratar de um *London dry/gin*, os botânicos são divididos por três macerações e destilações, *i. e.*, fazem-se três macerações e destilações com um conjunto de botânicos diferentes. Após a destilação, os destilados são misturados e o resto do processo de produção do *Hoppy Gin* é idêntico ao descrito no ponto 3.2.

3.2.2. *585.5 miles*

O *Gin 585.5 miles*, é também *London dry/gin* com três destilações diferentes. Apesar de se tratar de um *London dry/gin*, dois dos seus botânicos são destilados em separado dos restantes. É um Gin cujo botânico mais abundante, que lhe dá o seu sabor e aroma distintos, são as algas.

3.2.3. Experiência Realizada com Corantes

Em qualquer gin pode ser adicionado um corante de forma a alterar a sua cor. Foi realizada uma pequena experiência, em que foi adicionado ao gin um corante azul. Este tem a capacidade de mudar a cor do gin de azul para cor-de-rosa, após a adição de um componente carbonatado (água tônica). A planta responsável pela sua coloração é a *Clitoria ternatea*, originária da Ásia Tropical, pertencente à família *Fabaceae*. A adição desta planta ao Gin pode ser feita aquando da homogeneização do destilado com a água.

De forma a obter-se uma diluição mais eficiente, para os dois modelos de Gin, pode-se recorrer ao uso de pás ou de uma bomba de modo a homogeneizar todo o produto, *i. e.*, para que todo o volume tenha o mesmo título alcoométrico volúmico.

3.3. Vodka

A vodka produzida é considerada um produto de serviço. Tal denominação deve-se ao facto de ser de produção simples e pouco dispendiosa. Para tal, retificou-se, por diluição, o título alcoométrico volúmico do álcool para 37,5 %, volume mínimo requerido para ser considerada vodka.

Quando a empresa começar a produzir o próprio álcool, já poderá ter maior controlo nos cereais a utilizar na fermentação e produzir uma vodka diferente.

3.4. Engarrafamento e Rotulagem

Inicialmente, o engarrafamento era feito utilizando uma enchedora de um bico. Neste momento, a empresa adquiriu uma enchedora de seis bicos capaz de encher cerca de 120 garrafas no espaço de 30 minutos. O enchimento é manual, assim como a colocação da rolha, a selagem e a colocação do rótulo e da estampilha.

4. O Laboratório

O laboratório a projetar para a empresa tem dois objetivos, um deles é o de servir de local para a criação de novos produtos e o outro o de execução de análises físico-químicas e microbiológicas ao mosto. Neste capítulo serão apresentadas todas as funções laboratoriais a realizar, de acordo com as necessidades da empresa.

Para a primeira parte, criação de novos produtos, há apenas a necessidade de ferramentas básicas de laboratório. Sendo estas: tubos de ensaio e respetivo suporte, balões volumétricos, pipetas e provetas. Estes materiais têm o objetivo de auxiliar num maior controlo das características do produto e nas análises físico-químicas e microbiológicas.

Os métodos de análises físico-químicas das bebidas espirituosas, foram escolhidos de acordo com os métodos de referência do Regulamento (CE) N.º 2870/2000, de 19 de dezembro de 2000, e com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), sendo eles: a determinação do título alcoométrico volúmico (*TAI*), do extrato seco total, da acidez volátil e dos açúcares totais, das substâncias voláteis e do metanol, deteção de compostos congéneres voláteis, entre outros (anetol, ácido glicirrízico, açúcares totais). Como já foi referenciado anteriormente, tratando-se de uma empresa em desenvolvimento não é economicamente viável o investimento em equipamentos muito caros. Desta forma, foi decidido implementar os três primeiros métodos de análise e, também, analisar o pH.

Os testes microbiológicos têm o objetivo de identificar e detetar microrganismos contaminantes no mosto, podendo, também, ser uma mais valia na deteção da origem da contaminação. Esta identificação pode ser feita de acordo com os princípios taxonómicos (Briggs *et al.*, 2004).

A identificação das bactérias encontradas no mosto poderá ser feita recorrendo a técnicas microbiológicas clássicas, como a morfologia celular (forma de bastonete = *bacilli*, esféricas = *cocci*), a mobilidade, a morfologia da colónia quando cultivada e meio solido e propriedades bioquímicas. As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são identificadas por coloração, em que as primeiras resultam numa cor violeta e as segundas cor de rosa (Briggs *et al.*, 2004).

Sendo um dos principais objetivos da destilaria a produção de etanol com o máximo teor alcoométrico possível, torna-se relevante a deteção e identificação de microrganismos indesejáveis no mosto. A presença de qualquer organismo que apresente resistência à levedura *S. cerevisiae* poderá levar a um decréscimo no rendimento do etanol e até mesmo levar a alterações de sabor e aroma do produto final.

Os métodos de análises físico-químicas apresentadas para as bebidas espirituosas podem ser consultados no compêndio de métodos internacionais de análises de bebidas espirituosas de origem vitivinícola (OIV,2014), recomendado pelo Regulamento (CE) N.º 2870/2000 da Comissão de 19, de dezembro de 2000.

4.1. Título Alcoométrico Volúmico

O título alcoométrico volúmico (*TAV*) de uma bebida espirituosa é definido como o número de litros de álcool etílico em 100 L de uma mistura hidroalcoólica de densidade idêntica à da bebida espirituosa após a destilação. A temperatura de referência, para a determinação de *TAV*, e da densidade, é 20 °C [Regulamento (CE) N.º 2870/2000]. Este poderá ser determinado por picnometria, por densimetria eletrônica, por densimetria com balança hidrostática ou por areometria. Os três primeiros métodos consistem na determinação da densidade do destilado para em seguida calcular *TAV*.

- A picnometria recorre ao peso da solução para determinar a densidade da mesma e em seguida o título alcoométrico volúmico (Heymann *et al.*, 2016).
- A densimetria eletrônica, determina a densidade do líquido por medição eletrônica as oscilações de um tubo em U sujeito a vibração. Esta medição baseia-se na alteração, pela massa da amostra adicionada, da frequência específica de oscilação de um sistema oscilante [Regulamento (CE) N.º 2870/2000].
- A densimetria com balança hidrostática baseia-se no princípio de Arquimedes para determinar o *TAV* de bebidas espirituosas. Este princípio indica que um corpo imerso num líquido está sujeito a uma impulsão vertical, dirigida para cima, igual ao peso do líquido deslocado [Regulamento (CE) N.º 2870/2000].
- A areometria é um método que permite uma determinação rápida e fácil do volume de álcool das bebidas alcoólicas. O hidrómetro tem de estar calibrado para medir a concentração de álcool das soluções. Nas bebidas destiladas, as amostras podem ser medidas diretamente, uma vez que contêm poucas matrizes de interferência (açúcares, ácidos, proteínas e/ou polissacáridos), ao contrário dos vinhos, cervejas e licores que necessitam de uma destilação antes de efetuar a medição do volume de álcool com o hidrómetro (Heymann *et al.*, 2016).

4.2. Extrato Seco

Entende-se por extrato seco toda a matéria que em condições específicas não é volátil. Estas condições físicas devem ser estabelecidas de tal forma que as substâncias que constituem o extrato sofram transformações mínimas (Peynaud, 1981).

A determinação do extrato seco pode ser feita por gravimetria, que consiste na pesagem do extrato resultante da evaporação da bebida espirituosa em banho-maria e secagem em estufa, a peso constante. Alternativamente, pode ser determinada por cálculo indireto baseado na densidade da amostra, à qual é removido o álcool e é adicionada água até perfazer o volume inicial [Regulamento (CE) N.º 2870/2000; OIV, 2014].

4.3. Acidez Volátil

O cálculo da acidez volátil (*AV*) é conseguido pela subtração da acidez fixa (*AF*) da acidez total (*AT*). De forma a obter-se a acidez total faz-se uma titulação direta da bebida espirituosa. A acidez fixa é determinada pela titulação de uma solução aquosa obtida pela dissolução do resíduo obtido após a evaporação da bebida espirituosa (OIV, 2014).

4.4. pH

O pH indica a concentração do ião de hidrogénio dissolvido nas bebidas espirituosas, *i. e.*, $\text{pH} = -\log [C_{\text{H}^+}/(\text{mol/L})]$. Este pode afetar a perceção de acidez e é importante para determinar a cor, as taxas das reações químicas e a estabilidade microbiana (Heymann *et al.*, 2016). As características do pH das bebidas alcoólicas dependem de vários parâmetros, tais como a qualidade da água de redução do teor alcoólico, a natureza das matérias-primas aromáticas e qualquer aditivo que possa ser adicionado (OIV, 2009).

As medições do pH das soluções são feitas com medidores de elétrodos combinados. O eletrodo é constituído por uma membrana cilíndrica e um diafragma rodeado de teflon (OIV, 2014).

Os valores de pH das bebidas espirituosas, por norma, são os mesmos que a água desmineralizada, variando entre 5 e 8 (Aylott, 2003). O pH irá diferir de acordo com as matérias-primas utilizadas, cabendo ao mestre destilador o seu controlo.

4.5. Análises Microbiológicas

Na Tabela 4 estão indicadas algumas análises microbiológicas próprias para a deteção e identificação de diferentes microrganismos no mosto, e durante a fermentação, que poderão vir a ser efetuadas no laboratório da empresa. Os protocolos laboratoriais para as análises microbiológicas encontram-se no Anexo I.

Tabela 4 – Análises microbiológicas (adaptado de Briggs *et al.*, 2004; Hill, 2015)

Tipo de Teste	Microrganismo Alvo
<i>Hsu's Lactobacillus Pediococcus</i> (HLP)	Bactérias ácido-láticas (ambiente anaeróbio)
<i>Lee's Multiple Differential Medium</i> (LMDA)	Bactérias ácido-acéticas ou láticas
Coloração de Gram	Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
<i>Lins Wild Yeast Media</i> (LWYM)	Leveduras selvagens

4.5.1. Lee's Multiple Differential Medium (LMDA)

O meio de cultura LMDA permite verificar a presença de bactérias aeróbicas e/ou anaeróbicas numa amostra (Hill, 2015; Spedding, 2000). O carbonato de cálcio presente neste meio permite a identificação de bactérias produtoras de ácidos, o verde de bromocresol permite a diferenciação de colónias por cores e no caso de se pretender a inibição do crescimento de fungos poderá conter cicloheximidina. As bactérias acéticas são identificadas em condições aeróbicas e as láticas em condições anaeróbicas (White & Zainasheff, 2012).

4.5.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é um método que permite a diferenciação entre as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas pela cor. As primeiras apresentam uma cor roxa, após um tratamento de calor do esfregaço realizado com o corante violeta cristal. As segundas, após reação com a coloração safranina, apresentam uma cor rosa. Este processo é constituído por diferentes passos, sendo iniciado por um tratamento do esfregaço com uma solução de iodo e iodo de potássio, seguido por uma lavagem com etanol e por último faz-se uma adição da coloração rosa (Briggs *et al.*, 2004). O protocolo a seguir para a realização deste método pode ser consultado no compêndio de métodos internacionais de análises ao vinho e ao mosto de 2018 (OIV, 2018).

4.5.3. Lins Wild Yeast Media (LWYM)

O meio de cultura LWYM permite a deteção de leveduras selvagens (não *Saccharomyces*) (Hill, 2015). Este meio é composto por uma mistura de violeta cristal e sulfito de fucsina que inibe o desenvolvimento das leveduras de fermentação e permite o crescimento das leveduras selvagens em colónias distintas (Spedding, 2000).

5. Projeto do Laboratório

Neste capítulo é englobado todo o planeamento de construção e montagem do laboratório nas instalações da Tomorrow's Recipe, Lda. Aqui são apresentados todos os equipamentos e utensílios laboratoriais necessários para o cumprimento das funções do laboratório.

É importante salientar que, tratando-se de uma microdestilaria, onde a produção de bebidas espirituosas é relativamente menor em comparação com outras destilarias de maior dimensão, o investimento económico num laboratório muito avançado é injustificável. Sendo assim, a empresa pretendia o projeto de um laboratório, fácil de operar, e com os equipamentos necessários para todos os ensaios de conceção de novos produtos e posteriores análises de rotina. As análises que exigem equipamentos mais sofisticados, como o controlo de qualidade das bebidas espirituosas, serão feitas em laboratórios independentes contratados, certificados pelas entidades reguladoras.

No caso de a empresa mudar de localização, é provável que venha a optar pela construção integral da instalação fabril, visto que a única contenção será de ordem económica. Neste caso, o espaço que o laboratório ocupará será maior e terá melhores condições, podendo o espaço das análises estar separado do espaço de esterilização e limpeza do material. Assim, todo o planeamento aqui apresentado será apenas uma ideia-base.

5.1. Planeamento e Construção

Inicialmente, foram equacionados o espaço necessário e a localização do laboratório. A sua localização está dependente do acesso ao esgoto, do fornecimento e drenagem de água, da iluminação natural e artificial e do armazenamento das matérias-primas e álcool. Tendo em conta os fatores inumerados e a necessidade de acesso direto entre a produção e o laboratório, optou-se pela sua localização na sala de destilação.

Na sala de destilação, o sistema de esgoto e a canalização de fornecimento e drenagem de águas já estão instaladas, assim como o sistema elétrico. O acesso rápido entre o laboratório e o local de produção e o local de armazenamento reduz o risco de contaminação, principalmente no transporte de leveduras, e facilita a mobilidade entre os compartimentos. O laboratório estará próximo de uma janela, garantido maior luminosidade e assim maior visibilidade.

5.1.1. Planta do Laboratório

O laboratório projetado conta com uma área de 9 m², com 4,50 m de comprimento e 2 m de largura, ficará localizado na sala de destilação que tem 50,90 m². Na Figura 5 está representada a planta do laboratório.

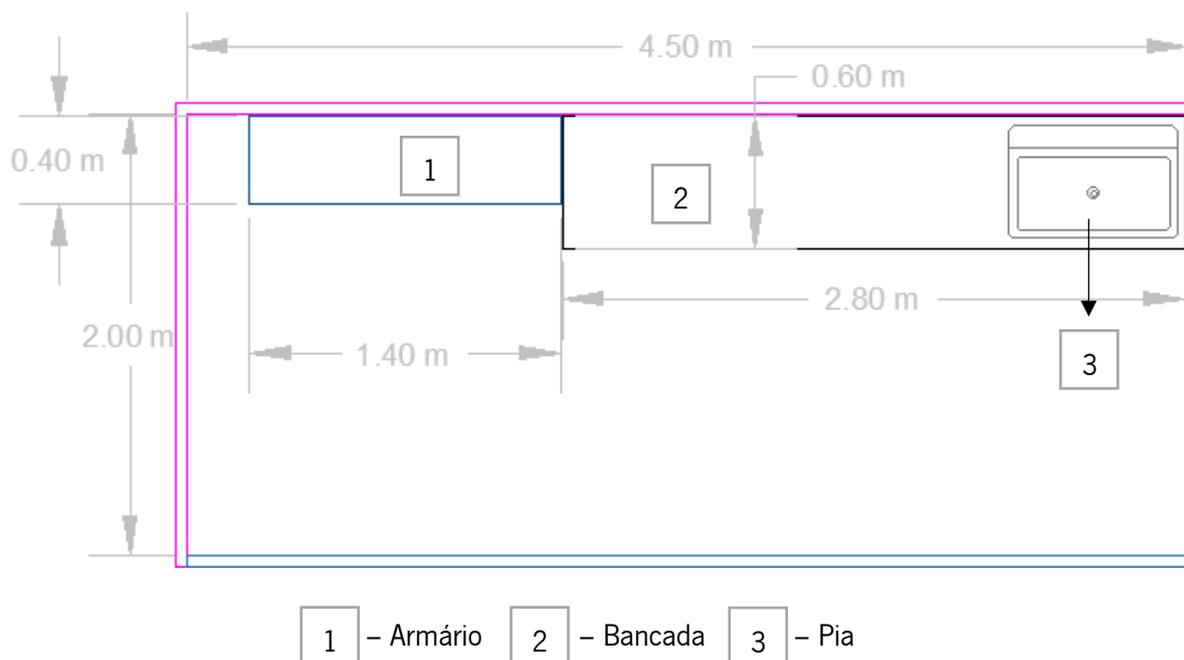


Figura 5 – Planta do laboratório.

O laboratório será separado da sala de destilação por uma parede em vidro temperado, duplo por todo o seu comprimento. A limpeza e esterilização do material utilizado nas funções laboratoriais serão, também, realizadas no mesmo compartimento devido à falta de espaço na destilaria. Posto isto, o risco de uma possível contaminação, após exercerem-se as funções laboratoriais, será maior. Assim, o laboratório deverá ser bem limpo e esterilizado ao mesmo tempo que os materiais utilizados e após qualquer recurso que se faça ao mesmo.

5.2. Equipamentos e Utensílios Laboratoriais

5.2.1. Mobiliário

O mobiliário projetado consiste numa única bancada de 2,8 m por 0,60 m, com uma altura de 0,87 m e um armário vertical de 1,4 m de comprimento, 0,40 m de largura e 1,60 m de altura. O projeto da bancada inclui uma pia e armários embutidos, com porta de correr, em toda a sua extensão. Para o estabelecimento das dimensões foram tidas em conta as necessidades de espaço de trabalho e de arrumação, sendo limitadas pelo espaço disponível. Tendo em conta o dimensionamento do espaço disponível e do mobiliário, foram contactadas algumas empresas especializadas no setor, A e B. Foi a empresa B que apresentou a proposta mais económica.

O mobiliário deverá ser constituído por materiais capazes de conferir as características técnicas adequadas à atividade laboratorial. Desta forma, o mobiliário deverá apresentar superfície lisa, sem porosidade, resistente aos produtos de limpeza, esterilização e água, e ter a capacidade de suportar o peso dos materiais e equipamentos a utilizar. A cor da bancada deverá ser branca, permitindo, assim, a verificação da existência de sujidade. A representação do mobiliário em 3D encontra-se na Figura 6.

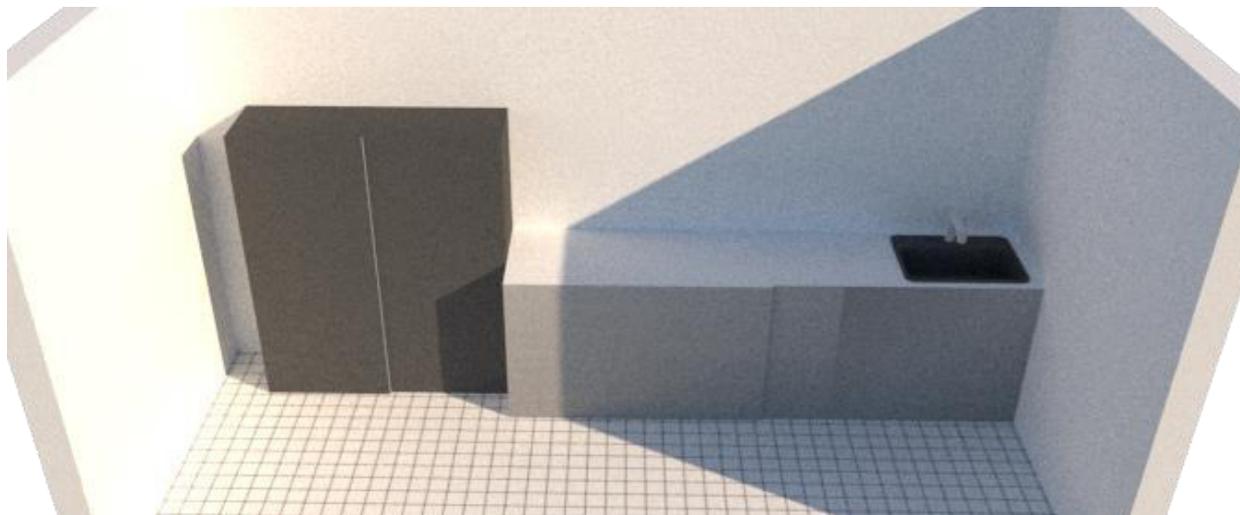


Figura 6 – Planta 3D do mobiliário do laboratório.

5.2.2. Equipamento Laboratorial

A escolha dos equipamentos proposta no Capítulo 3 é influenciada pelo investimento económico e pelas análises a executar no laboratório. Na Tabela 5 são apresentados os equipamentos necessários para a realização de testes físico-químicos e microbiológicos e para a esterilização dos mesmos.

Tabela 5 – Lista de equipamentos laboratoriais

Produto	Características
Balança Analítica	3000 g a 0,01 g
Banho-maria	5 L; 2 lugares
Estufa	30 L
Medidor de pH	Magnético
Autoclave	<i>Presoclave</i> 50 L
Bico de <i>Bunsen</i>	Gás butano/propano
Microscópio	Ampliação: 4x, 10x, 40x e 100x
Incubadora	Agitação: 40 min ⁻¹ a 400 min ⁻¹
Titulador automático	2 Entradas de Medição
Frigorífico	A ⁺⁺⁺ 217 L / 98 L
Cuba de Fermentação	550 L

É importante que o projeto contemple uma autoclave, visto tratar-se de um equipamento cuja principal função é a esterilização dos materiais utilizados nas funções laboratoriais. O frigorífico terá a função de armazenar reagentes, leveduras e meios de culturas. A cuba de fermentação deverá ter uma pequena entrada para a colocação de um termómetro. Serão consideradas duas cubas com uma capacidade de 550 L, uma vez que a empresa irá adquirir um alambique de 500 L e está, também, limitada ao espaço.

5.2.3. Material Laboratorial

Na Tabela 6 estão listados os materiais laboratoriais necessários para a realização das atividades laboratoriais propostas neste projeto.

Tabela 6 – Lista de material laboratorial

Produto	Especificações	Unidades
Termómetro	Junta de vidro esmerilado; $10 \leq T/^{\circ}\text{C} \leq 30$	2
Picnómetro	Vidro Pirex; 100 mL; Comprimento lateral = 25 mm; $\varnothing = 1 \text{ mm}$	2
Frasco-tara	100 mL	2
Areometro	0 % a 100 %	3
Pipeta Graduada	1 mL, 10 mL	2 x 2
Proveta Graduadas Vidro	250 mL, 500 mL, 1000 mL	3 x 2
<i>Erlenmeyers</i>	250 mL, 500 mL	2 x 5
Tubos de Ensaio com Rolhas	16 mm x 100 mm	40
Suporte para Tubos de Ensaio	60 tubos x 16 mm	2
Caixas de Petri	Vidro: $\varnothing = 60 \text{ mm}$, $\varnothing = 80 \text{ mm}$	2 x 10
Lâminas	Embalagem de 100 unidade	1
Lamelas	Embalagem de 100 unidades	1
Ansa	Cromoníquel; Embalagem de 10 unidades	1
Placa de evaporação cilíndrica	Fundo plano: 55 mm	1

6. Análise da Viabilidade Económica

Neste capítulo será debatida a análise económica e financeira do projeto, indicando todos os custos de investimento iniciais e manutenção anuais. Serão analisados e discutidos os valores indicadores de viabilidade económica obtidos, resultantes do estudo do Fluxo Financeiro ao longo de 10 anos.

6.1. Custos

Na procura dos equipamentos e materiais necessários para o funcionamento do laboratório da empresa Tomorrow's Recipe, foi tido como base materiais de qualidade, eficientes e económicos, recorrendo-se apenas ao essencial. Foram contactadas algumas empresas, para a obtenção de orçamentos, que posteriormente, foram minuciosamente comparados e estudados de forma a avaliar os preços mais competitivos e maior interesse no projeto. Para os equipamentos e materiais laboratoriais necessários contactaram-se quatro empresas, para o mobiliário duas e para a parede de vidro uma.

6.1.1. Equipamentos e Utensílios Laboratoriais

A empresa B forneceu o orçamento do mobiliário e a empresa A para a parede de vidro. Os valores recebidos contemplam a aquisição, transporte e instalação do material. Os valores totais, para o mobiliário e para a parede, seriam de 1 301 € e 2 500 €, respetivamente.

Quanto aos equipamento e materiais laboratoriais, as empresas B e D ofereceram os preços mais competitivos e uma maior variedade de escolha. Os custos de investimento inicial dos equipamentos encontram-se na Tabela 7.

O custo inicial dos materiais de laboratório encontra-se discriminado na Tabela 8. Uma vez que o material de laboratório tem a tendência a desgastar ao longo do tempo devido ao uso, teve-se em consideração uma taxa de renovação anual de 20 %, de acordo com o Decreto Regulamentar n.º 2/90, de 12 de janeiro.

6.2. Benefícios

Os benefícios são todos os ganhos financeiros envolvidos na aplicação deste projeto. No caso da Tomorrow's Recipe, Lda., os ganhos estão relacionados com a poupança obtida pela produção do álcool e pela construção do laboratório, que possibilitará a realização de testes físico-químicos e microbiológicos. Assim, a poupança anual está estimada em 1 300 €, sendo que neste valor não está

contemplado o gasto em testes microbiológicos, uma vez que a empresa apenas terá necessidade de os fazer assim que iniciar o processo de produção do álcool.

Tabela 7 – Custos de investimentos iniciais (C_i) dos equipamentos laboratoriais

Produto	$C_i/€$
Balança Analítica	283,25
Banho-maria	312,00
Estufa	785,08
Medidor de pH	249,09
Autoclave	5 251,00
Bico de <i>Bunsen</i>	28,11
Microscópio	399,00
Incubadora	3 172,11
Titulador Automático	266,41
Frigorífico Combinado	549,00
Cuba de Fermentação	670,00

6.3. Fluxos Financeiros e Balanço Total

O estudo dos fluxos financeiros (FF) e do balanço total (BT) foi realizado de acordo com o método de avaliação de viabilidade económica do projeto. Este estudo foi efetuado para um período de 10 anos. Na Figura 7 e na Figura 8 encontra-se a representação gráfica de cada um.

Tabela 8 – Custo de investimentos inicial (C_i), taxa anual (T_a) e custo de renovação anual (C_a) dos materiais laboratoriais

$C_i/€$	T_a	$C_a/€$
870,57	20 %	174,12

A aplicação destes métodos requer a utilização de um conjunto de taxas, sendo estas, a taxa de imposto, a taxa de interesse, a taxa de inflação e a taxa anual de crescimento da empresa. A primeira taxa é estipulada pela Autoridade Tributária Aduaneira, designa-se por IRC, tem valor igual, nesta data, a 21 %. A taxa de interesse, ou taxa mínima de atratividade, é a taxa mínima exigida por quem investe no projeto.

Para este projeto foi definida em 10 %. Para a taxa de inflação, calculou-se uma média dos últimos 5 anos, sendo o resultado obtido 1,5 %. De acordo com os registos contabilísticos dos anos anteriores, a empresa estimou uma taxa de crescimento anual de 20 %. Os valores destas taxas são apresentados na Tabela 9.

Designam-se por Fluxos Financeiros atualizados (FF_a) e Balanços Totais atualizados (BT_a), os Fluxos Financeiros e os Balanços Totais aos quais foi aplicada a taxa de interesse de 10 %, respetivamente.

Tabela 9 – Taxas utilizadas no estudo da viabilidade económica

Designação	Valor
Taxa de Imposto	21 %
Taxa de Interesse	10 %
Taxa de Inflação	1,5 %
Taxa Anual de Crescimento	20 %

Os valores dos Fluxos Financeiros e Fluxos Financeiros atualizados e dos Balanço Total e Balanço Total atualizado encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Fluxos Financeiros e Balanços Totais ao longo de 10 anos de investimento

Ano	$FF/€$	$BT/€$	$FF_a/€$	$BT_a/€$
2019	-16 636,62	-16 636,62	-16 636,62	-16 636,62
2020	1 528,04	-15 108,58	1 375,23	-15 261,39
2021	1 738,30	-13 370,28	1 564,47	-13 696,92
2022	1 990,62	-11 379,66	1 791,56	-11 905,36
2023	2 293,40	-9 086,27	2 064,06	-9 841,30
2024	2 656,74	-6 429,53	2 391,06	-7 450,24
2025	3 092,74	-3 336,78	2 783,47	-4 666,77
2026	3 615,95	279,16	3 254,35	-1 412,41
2027	3 884,99	4 164,15	3 496,49	2 084,08
2028	4 528,90	8 693,05	4 076,01	6 160,09
2029	5 433,00	14 126,06	4 889,70	11 049,79

Fazendo a análise da Tabela 10 e do gráfico da Figura 7, é possível verificar que os Fluxos Financeiros vão aumentando ao longo do período de tempo considerado, sendo o seu máximo 5 433,00 €. O Fluxo Financeiro representa a diferença entre os benefícios económicos e os custos de operação durante um determinado período de tempo. Se o valor resultante desta diferença for positivo, é deduzido um valor de imposto. Assim, à exceção do primeiro ano (2019), ano de investimento, os valores dos Fluxos Financeiros são sempre positivos. Para os Fluxos Financeiros atualizados, verifica-se o mesmo, sendo que estes atingem um máximo de 4 889,70 €. Para ambos os casos, no ano em que seria feito o investimento inicial (2018), ano zero, os valores seriam negativos.

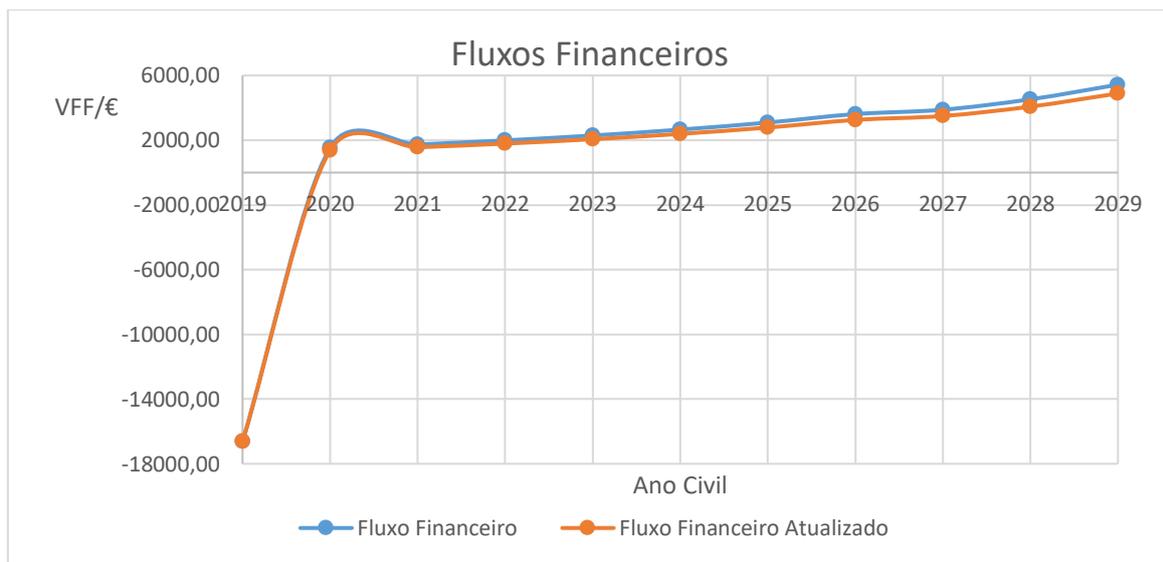


Figura 7 – Valor dos Fluxos Financeiros (V_{FF}) ao longo de 10 anos de investimento.

Quanto aos Balanços Totais, estes resultam da soma de todos os fluxos financeiros, num determinado ano, até ao final do mesmo. Analisando a Tabela 10 e a Figura 8, é possível verificar que o Balanço Total atualizado se mantém negativo nos 7 primeiros anos. Nos anos seguintes atinge valores positivos, que vão aumentando até 2029, atingindo um valor máximo de 11 049,79 €. Os Balanços Totais, têm um comportamento semelhante, atingindo valores positivos no mesmo ano que os atualizados, em 2029 apresentam um máximo de 14 126,06 €.

Quando os Balanços Totais atualizados atingem um valor nulo, determina-se como o período de retorno real do investimento efetuado. O Tempo de Recuperação é o período que decorre desde o ano zero até esse momento.

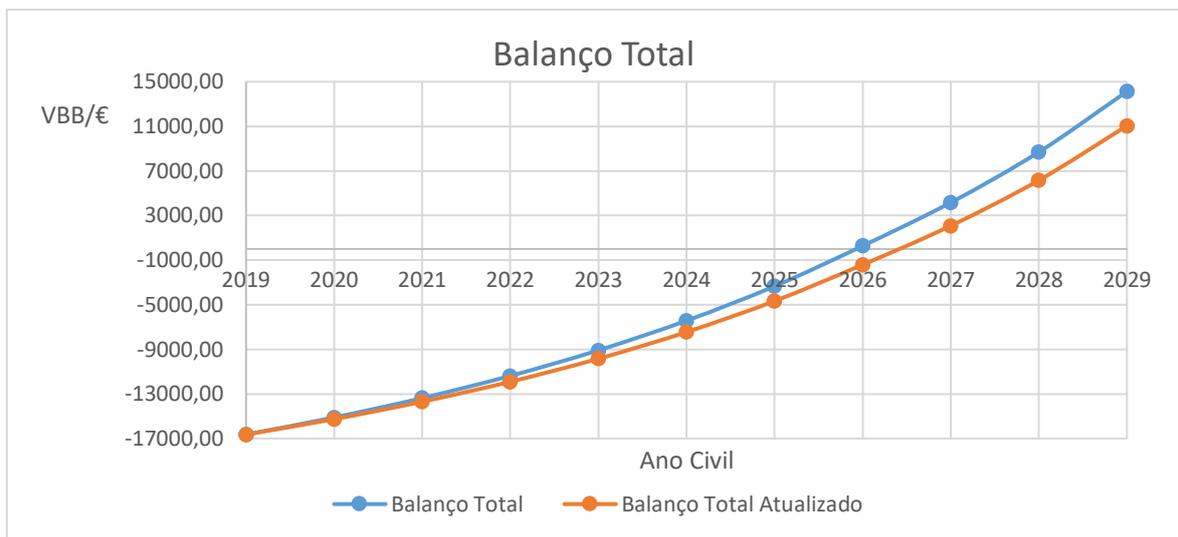


Figura 8 – Valor do Balanco Total (V_{BT}) ao longo de 10 anos de investimento.

6.4. Indicadores de Viabilidade Económica

Os cálculos dos indicadores de viabilidade económica do projeto, foram realizados usando as equações presentes no subcapítulo 2.9. O Valor Atual Líquido foi calculado aplicando uma taxa de atualização de 10 % e 15 %. A Tabela 11 mostra estes valores.

Tabela 11 – VAL para as taxas de atualização de 10 % e 15 %

Indicador	Valor Obtido
VAL_{10}	299,82 €
VAL_{15}	-3 004,95 €

Os valores da Taxa Interna de Rentabilidade obtida e o Tempo de Recuperação estão representados na Tabela 12. O Tempo de Recuperação foi calculado na sua forma simplificada sem aplicação de taxa mínima de atratividade e na sua forma atualizada, ao qual foi aplicada a taxa de interesse de 10 %.

Tabela 12 – Taxa Interna de Rentabilidade (TIR) e Tempo de Recuperação (TR)

Indicador	Valor Obtido
TIR	10 %
TR (simples)	5,93 anos
TR (atualizado)	7,40 anos

Os resultados obtidos de VAL , presentes na Tabela 11, para as taxas mínimas de atratividade de 10 % e 15 %, foram de 299,82 € e - 3 004,95 €, respectivamente. Sendo o primeiro valor superior a zero, o estudo permite concluir que o projeto é viável. Significa que o investimento permitirá a recuperação do valor investido inicialmente. Para uma taxa de atualização de 15 %, o VAL assume um valor negativo, o que significa que o investimento não gera fluxos de caixa que possibilitam a recuperação do valor investido, logo, o projeto nessa condição é inviável. A diferença obtida entre os valores de VAL_{10} e VAL_{15} mostra grande sensibilidade deste método a variações da taxa mínima de atratividade.

A Taxa Interna de Rentabilidade obtida foi de 10 %, o mesmo valor da Taxa Mínima de Atratividade estabelecida. Este resultado mostra que a execução deste projeto é viável, uma vez que o investimento remunera os capitais a uma taxa idêntica à do custo de oportunidade do capital. Analisando as TR (simples) e TR (atualizada), pode-se considerar o investimento neste projeto como de longo prazo, os seus valores são de 5,93 anos e 7,40 anos, respectivamente.

7. Considerações Finais

O trabalho realizado consistiu no auxílio de produção de novos produtos e do já existente, nomeadamente gin e vodka utilizando métodos artesanais. Para tal, procedeu-se a dois métodos distintos de produção de gin, o *Blended Gin* e o *London Dry/Gin*. O primeiro consiste na destilação individual de cada macerado de botânicos e posterior mistura e o segundo na maceração e destilação de todos os botânicos juntos. Para a produção da vodka, apenas se fez a diluição do título alcoométrico volúmico do álcool para 37,5 %.

O projeto do laboratório teve como objetivos a conceção de novos produtos e a possibilidade de se efetuar análises físico-químicas e microbiológicas na própria empresa. A realização dos testes físico-químicos aos produtos finais permitirá garantir a conformidade das características das bebidas espirituosas. Os testes microbiológicos deverão permitir assegurar a qualidade e segurança alimentar do mosto e, desta forma, a produção de etanol sem perdas de rendimento ou de aromas. No estudo realizado, incluem-se as plantas do compartimento, o mobiliário e as listagens dos equipamentos e materiais laboratoriais necessários para ser possível o desempenho das funções estipuladas. A escolha de todos os materiais e utensílios foi feita tendo em conta o seu preço, a qualidade, a adequabilidade e a eficiência. Também foi tido em conta nesta escolha, o espaço disponível para o projeto do laboratório e o facto de as instalações apenas serem temporárias. Daí ter sido projetado um laboratório simples e funcional.

Para a análise da viabilidade financeira do projeto, foram contabilizados o investimento inicial e os fluxos financeiros durante um período de 10 anos. Com estes dados, foi possível calcular os indicadores de viabilidade económica: *VAL*, *TIR* e o *TR*. Os valores obtidos no cálculo destes parâmetros mostram que o projeto é viável apenas para a taxa de atualização de 10 % e, segundo os valores de *TR*, será um investimento a longo prazo. Quando as instalações mudarem para um local permanente, recomenda-se um estudo mais aprofundado, uma vez que a produção será em maior escala e haverá a necessidade de aquisição de mais equipamentos, influenciando, assim, os fluxos financeiros. Este projeto visa apenas a construção de um laboratório em pequena escala, que permita a realização de testes rápidos e a investigação de novos produtos.

Referências bibliográficas

- Abecassis, F. & Cabral, N. (2000). *Análise Económica e Financeira de Projetos*. Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Abou-Ganim, T. & Faulkner, M. E. (2013). *Vodka Distilled: The Modern Mixologist on Vodka and Vodka Cocktails*. Agate Publishing.
- Alcarde, A. R. (2010). *Chapter 21: Bebidas Retificadas: Vodka e Gin, In Bebidas Alcoólicas (Venturini Filho, W. G.)* Blucher.
- Aswad, F. A., Kulkarny, V. V., Asare, K. & Lee, S. A. (2015). *Chapter 30: Saccharomyces and Kluyveromyces Infections, In Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi (Paterson, R. R. M. & Lima, N.)* CRC Press.
- Aumatell, M. R. (2012). *Chapter 12: Gin: production and sensory properties. In: J. Piggott Alcoholic Beverages: Sensory evaluation and consumer research, 267-280.*
- Aumatell, M. R. (2012). *Chapter 19: Sensory Analysis in Quality Control: The Gin as an Example, In Wide Spectra of Quality Control (Akyar, I.)* Intechopen.
- Aylott, R. I. (1995). *Vodka, Gin and Other Flavoured Spirits. In: Fermented Beverage Production (Second Edition) (Lea, A. G. H. & Piggott, J. R.)*. Springer Science + Business Drodercht.
- Aylott, R. I. (2003). *Chapter 13: Vodka, Gin and Other Flavored Spirits, In Fermented Beverage Production (Lea, A. G. H. & Piggott, J. R.)*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). *Brewing Science and Practice*. England: Woodhead Publishing Limited.
- Camacho, A., & Rosa, J. T. (1989). *Manual para a preparação de Estudos de Viabilidade Industrial*. Portugal: Publicações D. Quixote.
- Ceccato-Antonini, S. R. (2012). *Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias*. Edufscar
- Cheremisinoff, N. P. (2003). *Industrial Solvents Handbook*. (Second Edition) USA: Marcel Dekker, Inc.
- Christoph, N. & Bauer-Christoph, C. (2007). *Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation and Ageing. In: R. Berger (Eds) Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer
- Couto, G., Porfirio, J., & Lopes, M. (2004). *Avaliação de Projetos: Da Análise Tradicional às Opções Reais*. Publisher Team.
- Du Bois, F. & Boons, I. (2015). *Gin & Tonic: The Complete Guide for the Perfect Mix*. (Second Edition) Belgium: Lannoo Meulenhoff.

- Dussap, C.-G. & Poughon, L. (2017). *Chapter 10: Microbiology of Alcoholic Fermentation, In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry (Eds) (Pandey, A., Sanromán, M. Á., Du, G., Soccol, C. R & Dussap, C.-G.)*. Elsevier.
- Frank, R., & Bernanke, B. (2004). *Princípios de Economia*. McGraw-Hill.
- Greer, D., Pfahl, L., Rieck, J., Daniels, T & Garza, O. (2008). Comparison of a Novel Distillation Method versus a Traditional Distillation Method in a Model Gin System Using Liquid/Liquid Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 9030-9036.
- Hill, A. E. (2015). *Chapter 13: Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms, In Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. Elsevier.
- Hughes, P. S. (2018). *Chapter 8: Stabilization of Distilled Spirits, In Post-Fermentation and Distillation Technology: Stabilization, Aging and Spoilage (Bordiga, M.)*. CRC Press
- Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. (2017). Manual de Rotulagem. Disponível em: www.ivv.gov.pt
- Jackman, E. A. (1991). *Chapter 11: Alcohol Industrial, In Biotecnologia Basica (Bu'Lock, J. & Kristiansen, B.)*, Espanha: Editorial Acribia, S.A.
- Lopes, M. D. S. (2012). *Elaboração e Análise de Projetos de Investimento*. Portugal: FEUP Edições.
- Marques, A. (2000). *Concepção e Análise de Projetos de Investimento*. Portugal: Edições Silabo.
- Marriot, N. G. (2012). *Essentials of Food Sanitation*. USA: Springer-Science + Business Media, B.V.
- Neto, D. L. (2005). *Formulação de Projetos para o Setor Privado*. Posead.
- OIV – Office International de la Vigne et du Vin, (2014). Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin.
- OIV – Office International de la Vigne et du Vin, (2018). Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.).
- Oliveira, J. M. M. (2001). *Aromas Varietais e de Fermentação Determinantes da Tipicidade das Castas Loureiro e Alvarinho*. Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- Panesar, P. S., Kumar, N., Marwaha, S. S. & Joshi, V. K. (2009). Vermouth Production Technology – An overview. *Nature Product Radiance*, 8: 334-344.
- Panesar, P. S., Joshi, V. K., Panesar, R. & Abrol, G., S. (2011) *Vermouth: Technology of Production and Quality Characteristics. In: R. Jackson Advances in Food and Nutrition Research. Volume 63. Speciality Wines*.

- Pauley, M. & Maskell, D. (2017). *Mini-Review: The Role of Saccharomyces cerevisiae in the Production of Gin and Vodka*. UK: Academic Editors: Graeme Walker and G. Stewart.
- Peterson, L. I. (2013). *Chapter 7: Chemistry of alcoholic beverages, In Alcohol: Science, Policy and Public Health (Eds) (Boule, P., Boffetta, P., Lowenfels, A. B., Burns, H., Brawley, O., Zatonski, W. & Rehm, J.)* UK: Oxford University Press.
- Peynaud, E. (1981). *Connaissance et travail du vin*. Paris: Bordas.
- Piggott, J. R. (2017). *Chapter 15: Whisky, In Currente Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry (Eds) (Pandey, A., Sanromán, M. Á., Du, G., Soccol, C. R & Dussap, C.-G.)*. Elsevier.
- Portaria N.º 117/2015. Diário da República, 1.ª série (2015). Ministério das Finanças.
- Portaria N.º 10/1990. Diário da República, Série I (1990). Ministério das Finanças.
- Prentice, C. & Handsjuk, N. (2016). Insights into Vodka consumer attitude and purchasing behaviors. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 32, 7-14.
- Regulamento (CE) N.º 110/2018 do Parlamento Europeu e do Conselho (2018). Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) N.º 2870/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho (2000). Jornal Oficial da União Europeia.
- Saias, L., Amaral, M. C. & Carvalho, R. (2000). *Instrumentos Fundamentais de Gestão Financeira*. Portugal: Universidade Católica Editora.
- Salovaara, H. & Simonson, L. (2006). *Chapter 40: Fermented Cereal-Based Functional Foods, In Handbook of Food Science, Technology and Engeneering (Hui, Y. H., Culbertson, J. D., Duncan, S., Guerrero-Legarreta, I., Li-Chan, E. C. Y., Ma, C. Y., Manley, C. H., McMeekin, T. A., Nip, W. K., Nollet, L. M. L., Rahman, M. S., Toldr, F. & Xiong, Y. L.)*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Serna-Saldivar, S. O. (2010). *Cereal Grains: Properties, Processing and Nutritional Attributes*.
- Silva E. S. (2012), *Gestão Financeira, Análise de Fluxos Financeiros*. Edições Vida Económica, *Editorial SA*, Portugal.
- Smith, D. T. (2018). *The Gin Dictionary*. UK: Hachette.
- Spedding G. (2000), *Microbiological Medium for Bacteria and Wild Yeast Detection in the Brewery, Brewing and Distilling Analytical Services, 200 Seminar*.

- Thakur, I. S. (2006). *Industrial Biotechnology: Problems and Remedies*. India: I. K. International Pvt. Lda.
- Teixeira, J., & Cruz, J. (2014). *Produção de cerveja*. In: J. Teixeira, J. Vasconcelos, A. Vicente, M. J. Vieira (Eds) *Reatores Biológicos Fundamentos e Aplicações*. Lidel - Edições Técnicas Lda.
- Venturini Filho, W. G. (2016). *Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia*. Editora Edgard Blucher Ltda.
- Wakely, J. (2001). *The international spirits industry*. Woodhead Publishing Limited.
- Walker, G. M., Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages*. UK: Academic Editor: Edgar Chambers IV.
- White C. & Zainasheff J. (2012). *Yeast -The Practical Guide to Beer Fermentation, Brewers Publication, USA*.
- Wilson, N. (2014). *Chapter 8: Contamination: bacteria and wild yeast in whisky fermentation (Russell, I. & Stewart, G.)* (Second Edition ed.). USA: Elsevier.

Anexo I – Protocolos Laboratoriais para Testes Microbiológicos

Os procedimentos aqui descritos não são restritivos. É esperado que após o início de funcionamento do laboratório, estes sejam testados e ajustados de forma a adaptarem-se às especificidades apresentadas por cada estirpe de levedura.

São descritos os procedimentos para utilização os meios de cultura HLP, LMDA e LWYS. Os restantes poderão ser consultados no compêndio de métodos internacionais de análises ao vinho e ao mosto de 2018 (OIV,2018). As análises físico-químicas poderão ser consultadas no compêndio de métodos internacionais de análises de bebidas espirituosas de origem vitivinícola de 2014 (OIV, 2014).

Meio de Cultura HLP

Material:

- Meio de Cultura HLP;
- Agarose;
- Pipetas estéreis;
- Tubos de ensaio com rolha (16 mm × 50 mm), devidamente identificados;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Algodão;
- Incubadora.

Procedimento:

- Pesar 7 g de meio HLP e 2 g de agarose. Misturar com 100 mL de água no Erlenmeyer.
- Tapar o Erlenmeyer com o algodão.
- Aquecer até à fervura agitando frequentemente até que o HLP se dissolva.
- Deixar arrefecer até à temperatura de 45 °C.
- Pipetar 1 mL da amostra a testar nos tubos de ensaio.
- Transferir 17 mL de meio para os tubos de ensaio e fechar as tampas.
- Inverter os tubos de ensaio repetidamente de forma a distribuir a amostra uniformemente ao longo do tubo.
- Incubar a 30 °C por 48 h.
- Efetuar uma contagem preliminar. As colónias de *Lactobacillus* assemelham-se a gotas de água invertidas de cor branca e as colónias de *Pediococcus* são esféricas e também de cor branca.
- Incubar, novamente, por 48 h.
- Proceder à contagem final.

Meio de Cultura LMDA

Material:

- Amostra, devidamente diluída (pretende-se obter 25 a 50 colónias após incubação)
- Meio de cultura LMDA;
- Cicloheximidina;
- Placa de aquecimento;
- Água destilada;
- Autoclave;
- Pipetas estéreis;
- Autoclave;
- Caixas de Petri estéreis;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Algodão;
- Incubadora.

Procedimento:

- Pesar 8,3 g de LMDA no Erlenmeyer.
- Juntar 100 mL de água destilada e 10 % de cicloheximidina.
- Tapar o Erlenmeyer com o algodão e ferver por 1 min agitando bem a solução para dissolver.
- Autoclavar por 10 min a 121 °C.
- Após a autoclavagem agitar o líquido enquanto este arrefece, mantendo o CaCO_3 em suspensão e evitando a formação de espuma.
- Deixar arrefecer até aos 45 °C. De seguida verter porções de 10 mL a 15 mL de meio nas caixas de Petri e deixar solidificar. Se houver formação de espuma, utilizar um bico de Bunsen para quebrar as bolhas com a chama.
- Inverter as caixas e colocá-las a secar na incubadora a 30 °C por um período de 12 h.
- Inocular o meio de cultura segundo o método de sementeira por espalhamento.
- Incubar por 7 dias a 30 °C.

Meio de Cultura LWYM

Material:

- Amostra, devidamente diluída (pretende-se obter 25 a 50 colónias após incubação)
- Meio de cultura LWYM;
- Solução Violeta Cristal
- Placa de aquecimento;
- Água destilada;
- Autoclave;
- Pipetas estéreis;
- Autoclave;
- Caixas de Petri estéreis;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Algodão;
- Incubadora.

Procedimento:

- Pesar 4,4 g de LWYM no Erlenmeyer.
- Juntar 100 mL de água destilada e 1 mL de solução violeta cristal.
- Tapar o Erlenmeyer com o algodão e ferver por 1 min agitando bem a solução para dissolver.
- Autoclavar por 15 min a 121 °C.
- Transferir o Erlenmeyer para um banho de água a 45 °C. De seguida verter porções de 10 mL a 15 mL de meio nas caixas de Petri e deixar solidificar. Se houver formação de espuma, utilizar um bico de Bunsen para quebrar as bolhas com a chama.
- Inverter as caixas e colocá-las a secar na incubadora a 3 °C por um período de 24 h a 48 h.
- Inocular o meio de cultura segundo o método de sementeira por espalhamento.
- Incubar em condições aeróbias entre 4 a 6 dias entre 28 °C a 30 °C.