

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Pedro Porfírio Vieira Rocha

Projeto de um Laboratório na Cervejeira Sovina

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo de Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor José Maria Marques Oliveira

Supervisor na empresa:
Arménio dos Santos Martins

DECLARAÇÃO

Nome: Pedro Porfírio Vieira Rocha

Título da dissertação:

Projeto de Laboratório na Cervejeira Sovina

Orientador:

Professor Doutor José Maria Marques Oliveira

Supervisor na empresa:

Arménio dos Santos Martins

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica- Ramo de Tecnologia Química e Alimentar

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

Universidade do Minho, 31/10/2015

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

Antes de mais gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Maria Marques Oliveira, orientador desta dissertação, por todo o apoio e disponibilidade prestados ao longo de todas as fases que envolveram a elaboração deste trabalho.

Gostaria também de agradecer a Arménio dos Santos Martins, supervisor na empresa, pela oportunidade de desenvolver este projeto na empresa e por toda a colaboração, disponibilidade e apoio fornecidos.

Gostaria ainda de agradecer:

À Professora Doutora Paula Ferreira pelo apoio prestado na revisão dos resultados obtidos no estudo de viabilidade económica.

A todos os colaboradores e direção da empresa Os Três Cervejeiros, Lda. pelo seu contributo no desenvolvimento deste projeto.

A todas as empresas, aqui não mencionadas, mas que disponibilizaram os seus serviços, orçamentos e apoio técnico.

A Rui Filipe Silva pelo contributo no tratamento das imagens apresentadas nesta dissertação.

A todos os amigos que de alguma forma estiveram envolvidos na realização deste projeto.

A todos os familiares, deixando uma menção especial aos primos Diogo Ribeiro e Daniel Ribeiro e ao tio Arlindo Ribeiro, pelo apoio prestado na elaboração dos planos para instalação do sistema AVAC.

À Bruna, por todo o carinho, incentivo e compreensão demonstrados e por toda a importância que tem para mim.

Aos meus pais, irmãs e cunhado por terem sido sempre um pilar, não só durante o período de elaboração deste projeto mas também em todo o meu percurso de vida.

RESUMO

Esta dissertação propunha-se projetar um laboratório de microbiologia nas instalações da cervejeira Sovina com a capacidade para armazenar culturas puras de estirpes de levedura, propagar leveduras desde a escala laboratorial até à escala de produção, armazenar leveduras de fermentações prévias para a reutilização e realizar análises microbiológicas. Foi também solicitada a elaboração de um Manual de Procedimentos para todas as atividades propostas.

Determinaram-se as tarefas e respetivos procedimentos a realizar no laboratório, para que estes cumprissem com todos os objetivos propostos. O cumprimento dos objetivos propostos é, em geral, possível mediante realização de tarefas de fácil execução e aplicação.

Elaborou-se um plano de construção e montagem do laboratório em que se incluem as plantas de construção, instalação de utilidades e instalação de equipamentos AVAC e as listas de equipamentos e materiais laboratoriais necessários.

De forma a averiguar a viabilidade económica de implementação do projeto determinaram-se os custos de investimento inicial e manutenção e os benefícios gerados. A partir destes, calcularam-se os fluxos financeiros, o *VAL*, o *TIR*, a *AE* e o *TR* do projeto. A avaliação destes fatores determinou que o projeto é viável, embora seja de retorno financeiro a longo prazo.

Palavras-Chave

Laboratório, Leveduras, Propagação, Reutilização, Viabilidade.

Project of Laboratory in the Brewery Sovina

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to design a microbiology laboratory in the facilities of the brewery Sovina with the ability to store pure cultures of yeast strains, propagating yeast from the laboratory scale to the production scale, store yeast from previous fermentations for reuse and perform microbiological analyses. It was also requested that a Manual of Procedures for all proposed activities should be made.

The tasks and the respective procedures to be performed in the laboratory were listed in order to comply with all the goals. Compliance with the proposed objectives is, generally, possible by performing tasks of easy implementation and enforcement.

A lab construction and assembly plan was performed which includes the layouts for the construction, utilities installation and installation of HVAC equipment. Lists of necessary laboratory equipment and materials were also included.

In order to ascertain the economic viability of the project's undertaking the initial investment and maintenance costs and the benefits generated were measured. From these, the financial flows, *NPV*, *IRR*, *EA* and the project *PT* were calculated. The evaluation of these financial indicators determined that the project is viable, although financial returns are set to the long run.

Keywords

Laboratory, Yeast, Propagation, Reuse, Viability.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xii
1. Enquadramento Geral.....	1
1.1 Os Três Cervejeiros, Lda.....	1
1.2 Objetivos e Motivações.....	1
1.3 Estrutura da Dissertação.....	2
2. Introdução.....	3
2.1 A História da Cerveja.....	3
2.2 Produção de Cerveja.....	4
2.2.1 Receção e Armazenamento de Matérias-Primas.....	5
2.2.2 Preparação dos Cereais.....	5
2.2.3 Brassagem.....	5
2.2.4 Fervura do Mosto.....	5
2.2.5 Fermentação.....	5
2.2.6 Maturação.....	6
2.3 Leveduras Utilizadas na Produção de Cerveja.....	6
2.3.1 Morfologia.....	7
2.3.2 Ciclo Celular.....	7
2.4 A Microbiologia da Cerveja.....	8
2.4.1 Leveduras Selvagens.....	9
2.4.2 Bactérias.....	9
2.5 Reutilização de Leveduras.....	10
2.5.1 Recolha de Leveduras para Reutilização.....	10
2.5.2 Armazenamento de Leveduras para Reutilização.....	11

2.6	Propagação de Leveduras	11
2.6.1	Propagação de Leveduras por Subcultura Sucessiva	12
2.6.2	Manutenção e Armazenamento de Culturas Puras de Leveduras	13
2.7	Estudo de Viabilidade Económica de um Projeto	14
2.7.1	Fluxos Financeiros	14
2.7.2	Valor Atual Líquido	15
2.7.3	Taxa Interna de Rentabilidade.....	15
2.7.4	Anuidade Equivalente	16
2.7.5	Tempo de recuperação	16
3.	Procedimentos Analíticos e Funções do Laboratório	17
3.1	Armazenamento e Manutenção de Culturas Puras de Estirpes de Levedura	19
3.2	Propagação de Leveduras	19
3.3	Contagem de Células	20
3.4	Isolamento de Colónias em Meio Sólido.....	21
3.4.1	Sementeira por Espalhamento	21
3.4.2	Sementeira por Riscado.....	21
3.4.3	Sementeira por Incorporação	22
3.4.4	Filtração em Membrana	22
3.4.5	Sementeira por Exposição	22
3.4.6	Colheita por Cotonete Estéril	22
3.5	Testes Bacteriológicos	22
3.5.1	Meio de Cultura UBA	23
3.5.2	Meio de Cultura HLP	24
3.5.3	Meio de Cultura LMDA	24
3.5.4	Meio de Cultura MacConkey	24
3.5.5	Método de Coloração de Gram	24
3.6	Controlo de Qualidade de Leveduras	24
3.6.1	Meio de Cultura WLN.....	25
3.6.2	Teste de Mutações Respiratórias.....	25
3.6.3	Teste de Poder de Acidificação	25

4.	Projeto de construção e montagem do laboratório.....	26
4.1	Construção.....	27
4.1.1	Planta.....	27
4.1.2	Materiais.....	28
4.1.3	Utilidades.....	28
4.1.4	Sistema AVAC.....	29
4.2	Equipamento.....	31
4.2.1	Mobiliário.....	31
4.2.2	Equipamento Laboratorial.....	32
4.2.3	Material.....	33
5.	Análise de Viabilidade Económica.....	35
5.1	Custos.....	35
5.1.1	Construção.....	35
5.1.2	Equipamento.....	36
5.1.3	Sistema AVAC.....	37
5.1.4	Material.....	37
5.1.5	Mobiliário.....	38
5.1.6	Consumíveis.....	38
5.1.7	Outros Custos.....	40
5.2	Benefícios.....	40
5.3	Relação Custos-benefícios.....	40
5.3.1	Fluxos Financeiros.....	41
5.3.2	Indicadores de Viabilidade Económica.....	44
6.	Conclusões.....	46
	Referências Bibliográficas.....	48
	Anexo I – Procedimentos Laboratoriais Para o Armazenamento e Manutenção de Culturas Puras de Várias Estirpes de Levedura.....	51
	Anexo II – Procedimentos Laboratoriais Para a Propagação de Leveduras.....	54
	Anexo III – Procedimentos Laboratoriais Para a Contagem de Células.....	56
	Anexo IV – Procedimentos Laboratoriais Para o Isolamento de colónias em meio Sólido.....	59
	Anexo V – Procedimentos Laboratoriais Para Testes Microbiológicos.....	62

Anexo VI – Procedimentos Laboratoriais Para o Controlo de Qualidade de Leveduras	66
Anexo VII – Descrição do Equipamento AVAC	68
Anexo VIII – Especificações Técnicas do Mobiliário de Laboratório.....	69
Anexo IX - Despesas de Material	74
Anexo X – Cálculo de Fluxos Financeiros.....	75
Anexo XI- Cálculo dos Indicadores de Viabilidade Económica.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma de produção de cerveja.....	4
Figura 2- Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (adaptado de Briggs et al., 2004).....	8
Figura 3- Camadas de leveduras num fermentador cilindro-cónico após sedimentação (adaptado de White & Zainasheff, 2012).....	12
Figura 4- Propagação sucessiva de leveduras a partir de uma cultura pura de leveduras.....	12
Figura 5- Esquema de utilização de leveduras na empresa.....	17
Figura 6- Instalações da empresa e localização do laboratório.....	26
Figura 7- Planta da estrutura a construir, A-laboratório; B- sala de lavagem; C- escritório....	27
Figura 8- Planta de instalações de água da rede e drenagem de água.....	29
Figura 9- Planta de instalações elétricas.....	30
Figura 10- Esquema de instalação de equipamentos AVAC (fornecido pela empresa A).....	30
Figura 11- Planta e alçado do mobiliário técnico de laboratório.....	31
Figura 12- Representação 3D do mobiliário a instalar (fornecido por empresa B).....	32
Figura 13- Representação gráfica dos Fluxos Financeiros ao longo do tempo.....	43
Figura 14- Representação gráfica dos Balanços Totais.....	44
Figura I. 1- Inoculação de uma caixa de Petri (adaptado de White & Zainasheff, 2012).....	53
Figura III. 1- Taxa de depreciação, Valor Residual, Investimento inicial e Amortizações no Ano 1.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Tarefas a realizar no laboratório, frequência de execução e procedimentos a aplicar	18
Tabela 2- Meios de cultura e suas aplicações (adaptado de White & Zainasheff, 2012).....	23
Tabela 3- Parâmetros a testar para o controlo de qualidade de leveduras.....	25
Tabela 4- Lista de equipamentos laboratoriais	33
Tabela 5- Lista de material	34
Tabela 6- Custos de investimento inicial (C_I) e Custos anuais (C_A)	35
Tabela 7- Custos de construção.....	36
Tabela 8- Custo de aquisição de equipamentos de laboratório	36
Tabela 9- Custos de aquisição (c/ instalação) do sistema AVAC	37
Tabela 10- Custos de material laboratorial	38
Tabela 11- Custos de aquisição de mobiliário	38
Tabela 12- Custos estimados de consumíveis	39
Tabela 13- Outros custos.....	40
Tabela 14- Taxas utilizadas no cálculo de indicadores de viabilidade económica	41
Tabela 15- Fluxos Financeiros e Balanços Totais.....	42
Tabela 16- Resultados obtidos para os indicadores de viabilidade económica.....	44
Tabela IX. 1- Preços do material de laboratório	74
Tabela X. 1-Taxa de depreciação, Valor Residual, Investimento inicial e Amortizações no Ano 1	75
Tabela X. 2- Fluxos Financeiros não atualizados	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AC – Ar condicionado

AE – Anuidade Equivalente

AISI – *American Iron and Steel Institute*

AVAC – Aquecimento, Ventilação e Ar Condicionado

CE – Comunidade Europeia

CF – *Cash Flow*

C_I – Custo do Investimento

CTT – Cloreto de Trifeniltetrazólio

DIN – *Deutsches Institut für Normung*

FF – Fluxos Financeiros

FSC – *Forest Stewardship Council*

HLP – *Hsu's Lactobacillus Pediococcus*

HPL – *High-pressure Laminates*

IPA – *India Pale Ale*

IVA – Imposto sobre Valor Acrescentado

IRC – Imposto sobre o Rendimento das Pessoas Coletivas

ISO – *International Standards Organization*

LMDA – *Lee's Multiple Differential Medium*

PEFC – *Programme for the Endorsement of Forest Certification*

PVC – *Polyvinyl Chloride*

TIR – Taxa Interna de Rentabilidade

TR – Tempo de Recuperação

UBA – *Universal Beer Medium*

VAL – Valor Atual Líquido

VR – Valor Residual

WLN – *Wallerstein Laboratories Nutrient*

1. ENQUADRAMENTO GERAL

1.1 Os Três Cervejeiros, Lda.

A Sovina é uma marca registada de cerveja produzida pela empresa Os Três Cervejeiros, Lda. Fundada em 2009, foi uma das primeiras cervejas artesanais a ser produzida em Portugal. Atualmente, a Sovina dedica-se à produção de cinco variedades de cerveja permanentes, em que se incluem, *Stout*, *IPA*, *Amber*, *Trigo* e *Helles*. No entanto, em diferentes épocas do ano, como no natal ou na primavera, a marca aposta no lançamento de outros tipos de cerveja. A empresa, através do projeto Cerveja Artesanal, dedica-se também à venda de materiais destinados à produção de cerveja artesanal como *kits* de extrato de malte e diversos acessórios necessários para esta atividade.

1.2 Objetivos e Motivações

A qualidade do produto e a segurança alimentar são fatores de elevada importância para a marca Sovina, bem como a autenticidade e originalidade. Assim, neste trabalho, foi estudada a viabilidade da implementação de um laboratório nas instalações da empresa. Este projeto tinha como objetivos:

- Armazenamento de culturas puras de leveduras;
- Propagação progressiva de culturas de leveduras desde a escala laboratorial até à escala de produção;
- Armazenamento e acondicionamento de leveduras utilizadas na fermentação de forma a manter a sua viabilidade para reutilização;
- Realização de análises microbiológicas;
- Elaboração de um manual de procedimentos analíticos.

A intenção é que a empresa tenha a capacidade de produzir e armazenar as suas próprias leveduras de forma a contornar a necessidade de fornecimento externo e estudar as potencialidades económicas destas medidas. A possibilidade de a Sovina possuir e manter o seu próprio banco de leveduras poderá também trazer benefícios ao nível da utilização leveduras no processo fermentativo, uma vez que não estará sujeita a limitações inerentes à compra das mesmas.

O armazenamento e acondicionamento de leveduras utilizadas no processo fermentativo

viabilizará a sua reutilização, potenciando, assim, a poupança de recursos inerentes a propagação de leveduras a partir de uma cultura.

Por sua vez, a análise microbiológica tem como objetivo detetar possíveis contaminações por parte de microrganismos estranhos ao processo fermentativo, durante o processo de produção de cerveja bem como ao produto final. Desta forma a empresa pretende aumentar os seus padrões de segurança e qualidade alimentar.

1.3 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está dividida em seis partes.

A primeira parte consiste num enquadramento geral, onde é feita uma breve descrição da empresa e estão definidos os objetivos e motivações da realização desta dissertação.

Na segunda parte apresenta-se uma introdução teórica aos conceitos pertinentes no desenvolvimento deste projeto. Inicia-se por breve referência à história da cerveja e às suas origens, seguida de uma descrição dos processos de produção desta bebida. De forma a enquadrar a relação entre a produção de cerveja e a implementação de um laboratório numa cervejeira artesanal, apresenta-se, de forma sucinta, uma descrição das leveduras utilizadas neste processo e dos microrganismos que podem ser responsáveis pela contaminação deste produto. Apresenta-se, também, uma revisão ao estado da arte no que concerne à propagação e reutilização de leveduras. Finaliza-se com uma revisão aos conceitos teóricos relativos ao estudo de viabilidade económica de um projeto.

Na terceira parte definem-se as funções do laboratório e as estratégias para o seu cumprimento. Descrevem-se métodos a utilizar no funcionamento do laboratório e definem-se os procedimentos a seguir.

O projeto de construção e montagem do laboratório é apresentado na parte quatro. Inicialmente, apresentam-se as plantas de construção, instalação de utilidades e instalação do sistema AVAC fazendo-se referência aos materiais a utilizar e ao processo de tomada de decisão. De seguida apresenta-se uma listagem do mobiliário, equipamento e materiais necessários para a implementação do laboratório.

A quinta parte é constituída por um levantamento dos custos e dos benefícios inerentes a implementação do projeto. Apresentam-se os resultados obtidos no cálculo de indicadores de viabilidade económica e procede-se à sua discussão.

As conclusões da dissertação encontram-se na sexta parte.

2. INTRODUÇÃO

2.1 A História da Cerveja

A história da cerveja e a história da humanidade estão intrinsecamente relacionadas. Os primeiros indícios de que os seres humanos produziam bebidas fermentadas datam do período neolítico (Meussdoerffer, 2009) quando o Homem passou de um estilo de vida de caçador-recolector para um estilo de vida sedentário. Com o advento da agricultura e a produção de cereais terão surgido as primeiras bebidas fermentadas, os antepassados da cerveja.

Os primeiros registos escritos sobre a produção de cerveja vêm da Suméria por volta de 4000 a.C. (Hornsey, 2013). Este povo percebeu que a massa do pão, quando molhada, fermentava. Imagina-se que assim terá surgido uma forma primitiva de cerveja o chamado “pão líquido”.

Existem vários registos que indicam o consumo e produção de cerveja por parte de povos da Mesopotâmia e do Egito. Estes povos utilizavam a cerveja como bebida espiritual em rituais religiosos e situações de grande importância social (Hornsey, 2013). Arqueólogos encontraram recipientes com malte de cerveja em túmulos de faraós que datam de 1550 a.C. (Paquete, 2013). Nos períodos Helénico e Românico a cerveja passou a ser associada como uma bebida das classes mais baixas e dos povos bárbaros hostis (Kiefer, 2001). Os gregos e os romanos eram apreciadores de vinho e consideravam a cerveja como uma bebida impura e indigna de um verdadeiro cidadão.

Com a queda do Império Romano as tribos germânicas quebraram as antigas fronteiras e disseminaram-se pela Europa trazendo consigo a sua cultura cervejeira. Estes foram tempos conturbados em que a terra era fustigada pela guerra, coube aos mosteiros dedicarem-se à produção de cerveja uma vez que serviam como refúgio para esta atividade (Meussdoerffer, 2009).

É aos mosteiros que se atribui a primeira utilização de lúpulo na cerveja. Embora já se usassem outras ervas e especiarias. Atribuía-se ao lúpulo propriedades não só aromáticas como também conservantes.

Em 1516 foi instituída, pelo duque Guilherme IV, a Lei Alemã da Pureza (*Reinheitsgebot*) o mais antigo código de alimentos do mundo, com o objetivo de regulamentar o processo de manufatura da cerveja. Este código ditava que os únicos ingredientes aceites no fabrico de cerveja são: água, malte, lúpulo e levedura (Meussdoerffer, 2009).

A grande evolução da indústria cervejeira verificada nos séculos XVIII e XIX foi em grande parte o resultado da implementação de métodos e princípios científicos que permitiu o desenvolvimento de equipamento e tecnologia mais apropriados. A produção desta bebida em maiores quantidades, bem como a sua popularidade, permitiu a sua disseminação por todo o mundo, sendo hoje uma das bebidas alcoólicas mais apreciadas.

2.2 Produção de Cerveja

A produção de cerveja envolve uma série de processos que visam a transformação das matérias-primas, malte, água leveduras e lúpulo, no produto final. Na Figura 1 apresenta-se um esquema com a sucessão desses processos sob a forma de um fluxograma.

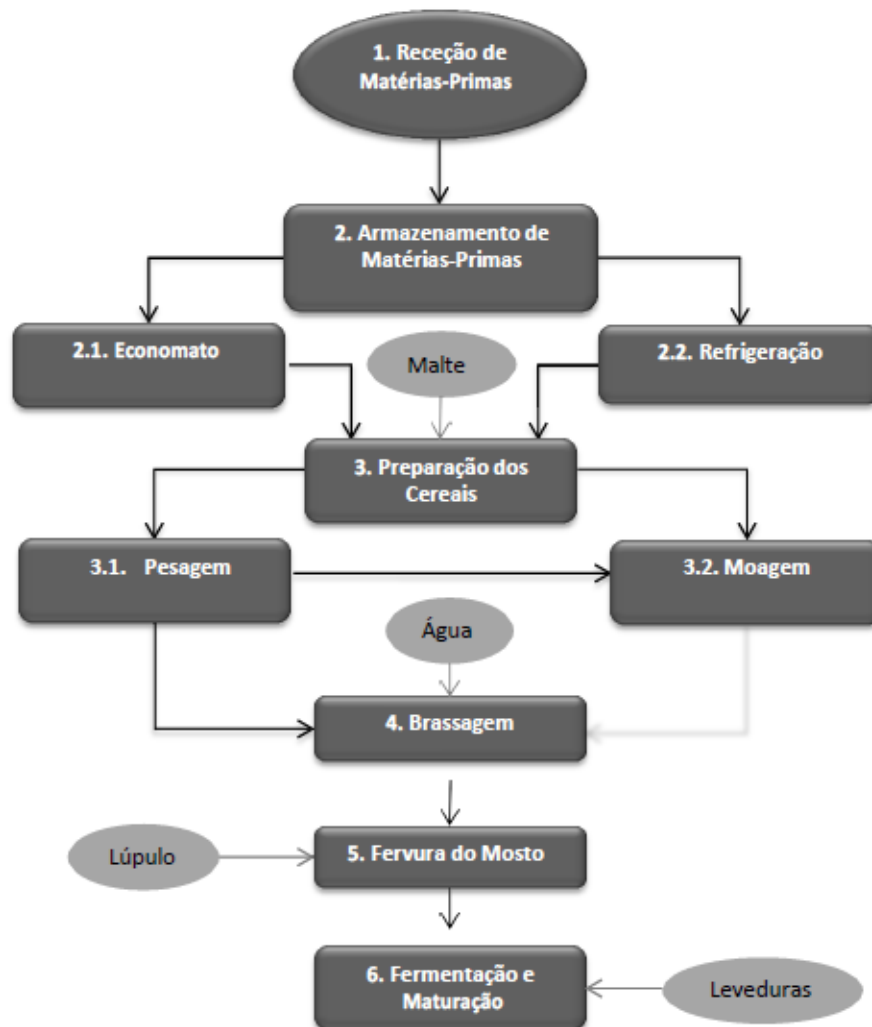


Figura 1- Fluxograma de produção de cerveja.

2.2.1 Receção e Armazenamento de Matérias-Primas

As matérias-primas, após a chegada à empresa são recebidas e separadas pelo responsável de armazém. Os maltes são armazenados á temperatura ambiente, enquanto os lúpulos e as leveduras são armazenados em ambiente refrigerado.

2.2.2 Preparação dos Cereais

Cada cerveja possui uma receita única que resulta da utilização de diferentes tipos de malte em determinadas proporções. Assim, antes de se proceder à brassagem é necessário pesar os diferentes maltes segundo a receita da cerveja que se pretende produzir. Após a pesagem, o malte é moído. A moagem tem como objetivo partir os grãos de malte de forma a obter maior eficiência no processo de brassagem.

2.2.3 Brassagem

A brassagem consiste no processo de mistura do malte moído com uma determinada quantidade de água a uma temperatura adequada de forma a ativar as enzimas. Com a ativação das enzimas o amido é convertido em açúcares fermentescíveis e as proteínas convertidas em nutrientes. As temperaturas de brassagem variam normalmente entre os 60 °C e os 70 °C. Geralmente temperaturas mais elevadas dão origem a mostos ricos em dextrinas, que por sua vez originam cervejas menos alcoólicas e com aromas mais maltados, enquanto temperaturas mais baixas dão origem a mostos mais fermentáveis (Bamford & Ward, 2014).

No final deste processo ocorre a separação da fase líquida, o chamado mosto doce ou não lupulado, e sólida, os restos dos grãos.

2.2.4 Fervura do Mosto

O mosto doce é transferido para um recipiente onde se adiciona lúpulo ou extratos de lúpulo. Posteriormente o mosto com o lúpulo é fervido por cerca de 2 h. Durante a fervura o mosto vai sofrendo alterações, sendo as mais evidentes a coagulação de proteínas, o desenvolvimento de aromas do lúpulo e a destruição de microrganismos. O mosto é de seguida clarificado, arrefecido e arejado como preparação para a fermentação.

2.2.5 Fermentação

A fermentação pode ocorrer em diferentes tipos de recipiente, que tanto podem ser abertos, completamente fechados ou parcialmente abertos durante um período específico da

fermentação. A variedade existente de fermentadores deve-se ao fato de as leveduras, ao crescerem em ambientes diferentes, produzem diferentes variedades de cervejas.

A fermentação inicia-se após a inoculação do mosto arrefecido e lupulado, com a levedura selecionada. A seleção da levedura depende das características que se pretende incluir na cerveja, uma vez que diferentes estirpes originam diferentes produtos que poderão conferir diferentes características à cerveja (White & Zainasheff, 2010).

É usual fazer a distinção de dois tipos de fermentação: a alta e a baixa. A fermentação alta é característica dos “ales” em que a levedura sobe para o topo do fermentador onde se forma a espuma, e a baixa fermentação, tradicional das “lagers” em que a levedura sedimenta no fundo do fermentador. A alta fermentação é caracterizada por ser mais rápida e realizada a temperaturas mais elevadas entre 15 °C e 20 °C durante 2 d a 3 d. Em comparação, a baixa fermentação é realizada a temperaturas mais baixas entre 10 °C e 15 °C e conseqüentemente é mais demorada (Palmer, 1999).

À medida que os açúcares do mosto são convertidos e a concentração de etanol aumenta verifica-se um declínio no valor de massa volúmica. A densidade inicial, a gravidade após a fermentação e o teor alcoólico são características muito importantes na qualificação de cervejas.

2.2.6 Maturação

Após a fermentação a cerveja apresenta-se ainda em estado de pouca maturação, sendo que as suas características aromáticas não estão completamente desenvolvidas. A maturação é necessária para o aprimoramento do sabor. A cerveja é assim armazenada em recipientes próprios, a baixas temperaturas, onde ocorre a segunda fermentação.

2.3 Leveduras Utilizadas na Produção de Cerveja

As leveduras utilizadas na produção de cerveja pertencem género *Saccharomyces* podendo variar na sua espécie e estirpe. Ao contrário das leveduras selvagens deste género, não são capazes de se reproduzir por esporulação e são poliploides (White & Zainasheff, 2010). Dividem-se em duas espécies, “ale” e “lager”. As leveduras “ale”, *S. cerevisiae*, caracterizam-se por flocularem para o topo do fermentador e por realizarem a fermentação a temperaturas mais elevadas (Lodolo *et al.*, 2008). Por sua vez as leveduras “lager”, *S. pastorianus*, floculam para o fundo do fermentador e fermentam a temperaturas mais baixas (Lodolo *et al.*, 2008).

2.3.1 Morfologia

Células individuais de levedura não são visíveis a olho nu, somente quando proliferam formando uma massa de milhões de células é que se tornam evidentes. Quando isto ocorre, em líquidos, as leveduras tomam a aparência de películas superficiais, sedimentos ou turvação. É comum que a biomassa de levedura esteja manchada pelos constituintes do meio que aderem a parede celular, possuindo assim a sua cor. Em meio incolor, as *Saccharomyces* possuem uma cor esbranquiçada, cinzenta ou bege (Briggs *et al.*, 2004).

Aquando da transferência de células de levedura para um meio de crescimento solidificado com gel de agarose, a proliferação subsequente origina a formação de colônias circulares de células. A forma e o tamanho destas colônias variam com a espécie e a estirpe da levedura, a natureza do meio utilizado, com o agente de solidificação e com as condições sob as quais o meio foi encubado. O conhecimento e a correta manipulação destes parâmetros permite a identificação de espécies e estirpes de levedura, uma vez que diferentes leveduras originam colônias de diferentes características. Outras características morfológicas que permitem a identificação de leveduras são o tamanho individual das células, a forma e o padrão de propagação vegetativa.

2.3.2 Ciclo Celular

A proliferação de organismos unicelulares requer a coordenação de vários processos bioquímicos que desencadeiam o crescimento celular e de uma série de eventos que levam à multiplicação celular. A combinação dos eventos que ocorrem durante os intervalos entre a separação de sucessivas células filhas é chamado de ciclo celular (Figura 2). Este ciclo requer a coordenação de eventos contínuos como o crescimento celular com processos descontínuos de replicação de ADN, mitose e excisão da célula filha.

A progressão do ciclo celular considera três pontos de vista. O primeiro tem em conta as alterações morfológicas que ocorrem quando uma célula mãe dá origem a uma célula filha. O segundo, as alterações bioquímicas que sustentam o processo de proliferação de células. O terceiro ponto analisa os mecanismos moleculares que regulam a coordenação de processos de crescimento celular e multiplicação. Por conveniência o ciclo celular é dividido em diferentes fases, G1 a fase pré-sintética, S a fase sintética durante a qual o ADN é replicado, G2 a fase pós sintética e a fase M onde ocorre a mitose e a citocinese.

A *S. cerevisiae* reproduz-se assexuadamente por gemulação, ou seja, a divisão celular é assimétrica, a célula filha é mais pequena que a célula mãe e forma uma estrutura denominada gomo. A formação e a separação do gomo é acompanhada por uma divisão e segregação

nuclear. Este processo é direcional, e portanto, a célula tem de estar polarizada para assegurar a orientação correta da divisão do núcleo e do gomo em desenvolvimento.

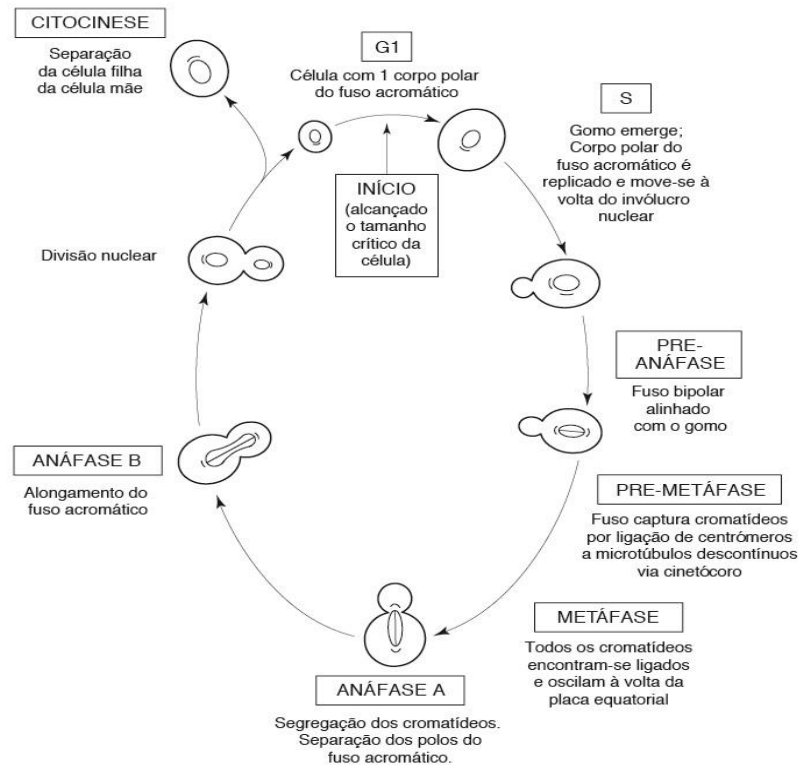


Figura 2- Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Briggs *et al.*, 2004).

2.4 A Microbiologia da Cerveja

Os microrganismos podem exercer efeitos adversos no processo de produção de cerveja tanto direta como indiretamente. Os efeitos diretos são mais óbvios e estão relacionados com a presença de microrganismos estranhos no mosto ou no produto final. O mosto, sendo uma fonte rica de nutrientes e oxigénio, é suscetível de suportar a proliferação de microrganismos. Este risco é diminuído após a adição de lúpulo, uma vez que, este demonstra ter propriedades antibacterianas (Sakamoto & Konnings, 2003). Ainda assim, existem muitos microrganismos que conseguem sobreviver à sua presença, como são exemplo as leveduras e algumas bactérias ácido-lácticas (Suzuki *et al.*, 2006). Os efeitos da contaminação microbiana podem variar desde pequenas alterações no aroma da cerveja até a presença de grandes defeitos que a tornam imprópria para consumo (Vaughan *et al.*, 2005) ou à superatenuação (termo utilizado quando a conversão de açúcares excede o desejado) do mosto (Andrews & Gilliard, 1952). Após a inoculação o mosto fica, em certa medida, protegido pelas leveduras, uma vez que as espécies

contaminantes em concentrações mais baixas são incapazes de competir. A cerveja é considerada um meio hostil para o crescimento microbiano devido à escassez de nutrientes após a fermentação, elevada concentração de etanol e dióxido de carbono, pH baixo e carência de oxigênio, que juntamente com os componentes ácidos do lúpulo confere propriedades antissépticas a esta bebida (Suzuki, 2011).

A presença de microrganismos afeta a cerveja indiretamente de três formas. Primeiramente, o crescimento microbiano na matéria-prima poderá causar alterações no comportamento da mesma durante o processo de produção (Nierop *et al.*, 2006). Segundo, a contaminação da matéria-prima pode gerar metabólitos microbianos que poderão persistir no processo de produção e exercer efeitos adversos tanto a nível da segurança do produto (Gumus *et al.*, 2004, Krogh *et al.*, 1974), como da qualidade em termos organolépticos (Wolf-Hall & Schwarz, 2002). Terceiro, matérias-primas com elevados índices de contaminação microbiana poderão introduzir biomassa microbiana na cerveja “verde” (não maturada) que, apesar de morta, traz problemas em processos como a filtração, causando turvação na cerveja (Nierop *et al.*, 2006). Os microrganismos mais comumente envolvidos na contaminação da cerveja ou de cervejeira podem incluir estirpes selvagens de leveduras, *S. cerevisiae* ou não, bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (Goldammer, 2008).

2.4.1 Leveduras Selvagens

Na indústria cervejeira consideram-se leveduras selvagens todas as leveduras que não são utilizadas deliberadamente na fermentação de uma determinada cerveja. Assim aplica-se este termo a leveduras que não são do género *Saccharomyces*, a espécies e estirpes selvagens de *Saccharomyces* e a leveduras utilizadas na produção de outros tipos de cerveja (Pham *et al.*, 2011). A presença de leveduras selvagens pode originar turvação na cerveja, aromas indesejados, decréscimo de produção de etanol e rácio de conversão de açúcares e superatenuação (Briggs *et al.*, 2004).

2.4.2 Bactérias

Apesar de a cerveja ser considerada uma bebida microbiologicamente estável, algumas bactérias são capazes de proliferar neste meio. A instabilidade microbiológica na cerveja é maioritariamente causada por bactérias dos géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* e *Megasphaera* (Suzuki, 2011). Outras bactérias associadas à contaminação de cerveja são bactérias acéticas, *Zymomonas* e *Enterobacteriaceae* (Vriesekoop *et al.*, 2012).

As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* são bactérias ácido-láticas e são responsáveis por grande parte das contaminações observadas na cerveja (Ogden & Tubb, 1985). Com forma de bacilo ou cocos estritamente fermentativos, estas bactérias são Gram-positivas e anaeróbias facultativas pertencentes à ordem *Lactobacillales* (Vriesekoop *et al.*, 2012).

Pectinatus e *Megasphaeria* são bactérias estritamente anaeróbias que podem contaminar cerveja embalada. A contaminação de cervejas por estas bactérias pode causar formação de sedimentos, turbação e presença de odores e sabores indesejados (Suzuki, 2011).

2.5 Reutilização de Leveduras

A reutilização de leveduras consiste na recolha de leveduras de um lote de cerveja para reaproveitamento na elaboração de um novo lote. Após a fermentação as leveduras são retiradas do fermentador de onde são transferidas para um novo fermentador ou para armazenamento.

Embora teoricamente não exista um limite para o número de vezes que as leveduras podem ser colhidas e re-inoculadas, a maioria das cervejeiras modernas introduzem novas culturas de leveduras de forma periódica (Briggs *et al.*, 2004). Existem várias razões que justificam este procedimento. Numa cervejeira onde são utilizadas diferentes estirpes de levedura, baixos níveis de contaminação são inevitáveis e existe sempre o risco de contaminação por leveduras selvagens e bactérias indesejáveis (Manzano *et al.*, 2005). A constante reutilização de leveduras pode afetar a produtividade devido a instabilidade genética. O aparecimento de mutações que limitam a capacidade da levedura formar mitocôndrias funcionais é muito comum neste setor industrial (Gibson *et al.*, 2008). Por outro lado, as leveduras recém-propagadas em laboratório não apresentam os mesmos índices de produtividade e de qualidade que as leveduras reutilizadas, apresentando uma fase de latência mais prolongada e consequentemente demorando mais tempo a atingir a atenuação final pretendida bem como uma floculação mais lenta (Powel *et al.*, 2003).

2.5.1 Recolha de Leveduras para Reutilização

Após a fermentação, as leveduras podem ser recolhidas tanto do topo do fermentador como do fundo deste, com diferentes resultados. A recolha do topo do fermentador é mais vantajosa, na medida em que permite obter leveduras com melhores índices de viabilidade e vitalidade e com menos detritos (White & Zainasheff, 2012). No entanto, este método é inviável para leveduras “lager” que floculam para o fundo do fermentador. A utilização de fermentadores cilindro-cónicos impede o acesso ao topo do fermentador, assim, a maioria das cervejeiras

atuais recolhem as suas leveduras do fundo do fermentador.

As leveduras depositadas no fundo do fermentador tendem a formar uma espécie de lama (*yeast slurry*) que se distribui em três camadas distintas (Figura 3). A camada inferior é constituída por leveduras que sedimentaram mais cedo e a camada superior é constituída por leveduras que flocularam numa fase mais tardia da fermentação, normalmente tratam-se de células mais envelhecidas (maior número de cicatrizes de gemulação) (Kurek *et al.*, 2009). A floculação tardia ou precoce pode levar à produção de aromas não desejados, ao arranque lento da fermentação e à atenuação (conversão de açúcares) incompleta da cerveja (Verstrepen *et al.*, 2003). A camada inferior deve ser drenada a partir do fundo. Assim que se verifique uma alteração da *yeast slurry*, para uma cor mais clara e aspeto cremoso, está-se perante a camada intermediária onde de encontram as leveduras com floculação normal que devem ser recolhidas para reaproveitamento ou armazenamento. A camada superior é constituída por leveduras que sedimentaram mais tarde e por sedimentos e representa nova alteração na cor e aspeto da *yeast slurry*.

2.5.2 Armazenamento de Leveduras para Reutilização

Quando não é possível a reutilização imediata das leveduras recolhidas procede-se ao armazenamento das mesmas. O objetivo do armazenamento de leveduras é minimizar a atividade biológicas destes seres, mantendo a sua viabilidade pelo máximo de tempo possível. As *slurry* de leveduras devem ser armazenadas à temperatura de 2 °C a 4 °C á qual pode ser adicionada cerveja, água ou uma solução de 2 % de dihidrogenofosfato de potássio (Priest & Stewart, 2006). Os recipientes utilizados neste processo deverão ser fechados, de fácil lavagem e deverão permitir a libertação de CO₂ para o exterior (White & Zainasheff, 2012)

2.6 Propagação de Leveduras

Usualmente as leveduras são reutilizadas de 5 a 20 vezes antes de serem descartadas. Esta variação reflete a subjetividade inerente a esta prática, sendo que cada cervejeiro avalia a necessidade da renovação da população de leveduras de uma forma empírica. A decisão de introduzir uma nova cultura deverá ser baseada tanto em dados microbiológicos como em dados que reflitam a performance das leveduras em utilização. O processo deverá ser conduzido para que uma nova cultura seja introduzida quando a experiência indica que as culturas antigas estão a aproximar-se do final dos seus ciclos úteis.

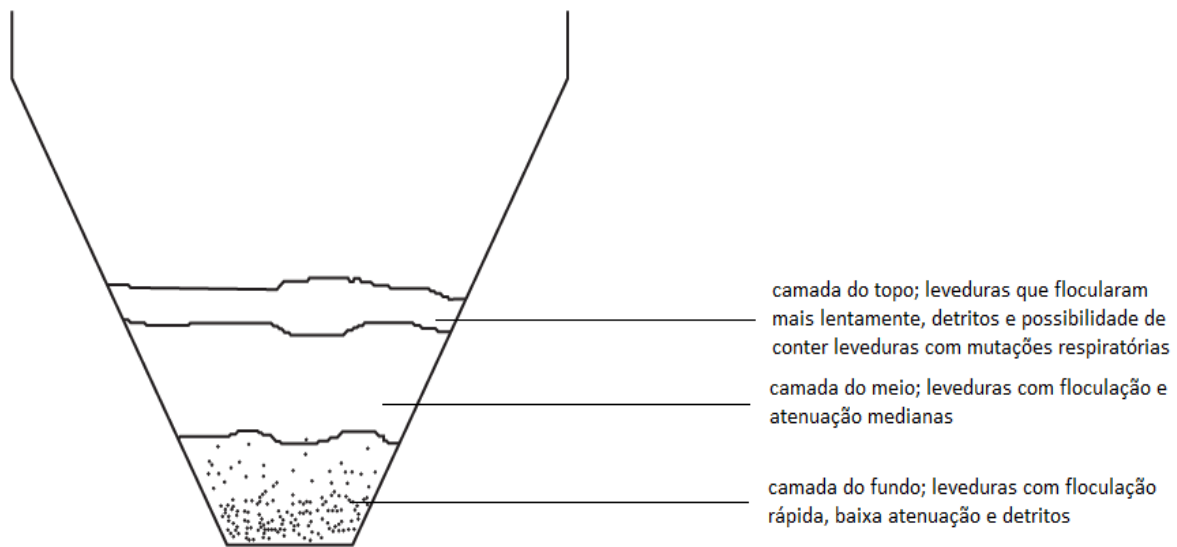


Figura 3- Camadas de leveduras num fermentador cilíndrico-cônico após sedimentação (adaptado de White & Zainasheff, 2012).

2.6.1 Propagação de Leveduras por Subcultura Sucessiva

O principal objetivo da propagação de leveduras em laboratório é fazer crescer uma cultura pura de leveduras com volume suficiente para ser utilizada à escala do processo de produção de cerveja. A propagação é realizada a partir de métodos microbiológicos tradicionais e deve ser conduzida por profissionais especializados. É importante assegurar que a cultura se mantem pura durante esta fase.

Para gerar uma cultura de propagação de laboratório terminal é necessário proceder a uma série de culturas intermédias com progressivo aumento de volume. Todo o processo demora cerca de duas semanas. O crescimento das leveduras é estimulado por aerização contínua e a concentração celular final deverá estar compreendida entre $150 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ a $200 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ e viabilidade superior a 98 % (White & Zainasheff, 2012). Este processo encontra-se esquematizado na Figura 4.

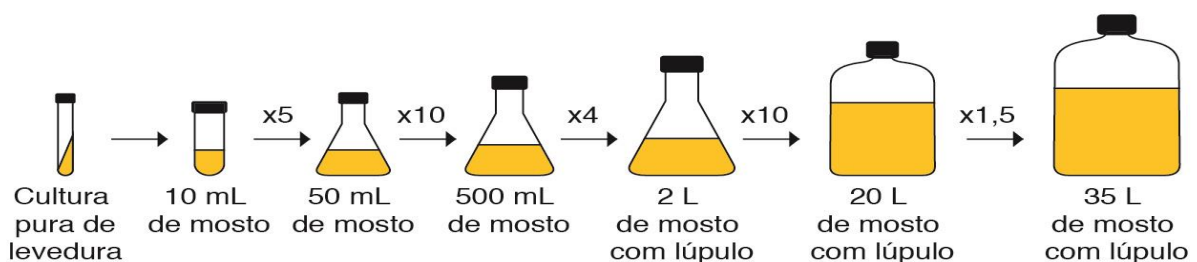


Figura 4- Propagação sucessiva de leveduras a partir de uma cultura pura de leveduras.

2.6.2 Manutenção e Armazenamento de Culturas Puras de Leveduras

A complexidade do processo de armazenamento de leveduras depende do tamanho da operação em curso e das necessidades da mesma. Em suma, deverá garantir que as culturas cheguem ao processo de fabrico com garantida identidade e pureza. De forma a cumprir estes requisitos deverão se utilizados métodos de armazenamento que garantam que as culturas se mantenham puras, viáveis e não sujeitas a alterações genéticas. Existem vários métodos para este efeito com diferentes níveis de sucesso. Entre eles destacam-se o método de subcultura periódica, a liofilização e o congelamento em nitrogénio líquido.

O método de subcultura periódica em tubos de ágar inclinados consiste na utilização de tubos de ensaio com cerca de 10 mL de meio de cultura solidificado com agarose. De forma a maximizar a área de superfície o ágar é solidificado com o tubo posicionado de forma inclinada (*slant*). O ágar é inoculado com uma cultura de leveduras pura na superfície do gel. Os tubos são armazenados a uma temperatura entre 2 °C a 4 °C de forma a minimizar a atividade metabólica maximizando, assim, o tempo de armazenamento. O armazenamento prolongado poderá originar a perda de viabilidade, mas ainda assim garante resultados para períodos compreendidos entre quatro a seis meses. A utilização de tubos de maior volume ou frascos poderá resultar num tempo de armazenamento prolongado, na medida em que, maiores volumes de meio proporcionam maior quantidade de nutrientes. Este método tem como principais vantagens a sua simplicidade e baixo custo. A maior desvantagem da utilização deste método é o risco de surgirem alterações bioquímicas e morfológicas após sucessivas inoculações (Kirsop, 1974).

A liofilização consiste no congelamento rápido das culturas seguido de uma secagem em vácuo para que a água seja removida por sublimação. O processo é executado em ampolas de vidro que são seladas após a secagem. Estas culturas podem ser armazenadas por extensos períodos de tempo e podem ser reativadas quebrando as ampolas de vidro e transferindo a cultura para um meio de crescimento líquido. Apesar do aumento do tempo de armazenamento este método apresenta algumas limitações. A secagem e congelamento provocam a morte de cerca de 95 % das células inoculadas o que reduz a viabilidade (Kirsop, 1955). Mais preocupante ainda é o facto de a liofilização provocar o aparecimento de células com deficiências respiratórias e fermentativas (Wynants, 1962). No entanto, o desenvolvimento de novos métodos de liofilização, nomeadamente através da utilização de trealose como protetor, permitiu atenuar estas limitações aumentando, assim, a viabilidade das leveduras armazenadas (Bond, 2007).

O congelamento de culturas em azoto líquido é o método mais eficaz de armazenamento de leveduras. As culturas são congeladas em azoto líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) de forma controlada, permitindo o armazenamento por vários anos sem comprometer o genótipo das células (Morakile *et al.*, 2002). Apesar de ser o método mais viável apresenta custos muito elevados.

2.7 Estudo de Viabilidade Económica de um Projeto

O estudo de viabilidade deve servir de base à decisão de investir em determinado projeto. Este estudo deve apresentar um projeto com uma capacidade de produção bem definida, numa localização escolhida e que utilize tecnologias específicas em função de materiais e de fatores de produção, custos de investimento e de produção, e com um resultado de benefícios que assegure um dado rendimento ao investimento. Um estudo de 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 um estudo de viabilidade económica de um projeto pressupõe, numa fase inicial, a realização de uma série de estudos técnicos no sentido de determinar se é viável ou não iniciar um novo projeto (Marques, 2000). Estes estudos preliminares permitirão firmar as condições que satisfazem os requisitos de quem promove o projeto no sentido de clarificar as vantagens da sua realização.

Numa fase seguinte é necessário determinar fluxos financeiros gerados pelo projeto com o objetivo de avaliar a sua rentabilidade financeira. É nesta fase que se traça um plano de negócios que irá suportar a viabilidade do investimento a ser feito.

Para quem investe no projeto é necessário que este se torne atrativo na medida em que o lucro gerado seja superior a outros investimentos e, como tal, é necessário determinar o retorno do investimento.

2.7.1 Fluxos Financeiros

Os principais métodos de avaliação de projectões utilizados assentam na noção de *cash flow* ou fluxo financeiro. A determinação do fluxo financeiro pretende ser uma medida da corrente em movimento (daí a designação *fluxo*) dos meios líquidos da empresa, isto é pretende identificar o fluxo de entradas (benefícios/recebimentos) e saídas (custo/pagamentos) de dinheiro e seus equivalentes durante o ciclo de vida do projeto (Moreira, 1999).

Esta determinação é útil na medida em que proporciona uma base para determinar a capacidade de uma empresa gerar dinheiro. Ela permite melhorar o conhecimento das variações ocorridas

na estrutura financeira e a capacidade de gerar, e em que tempo, meios de pagamento com o objetivo de se adaptar a situações de mudança e oportunidades de mercado.

A determinação do fluxo financeiro em atividades de investimento é importante porque representa a extensão pela qual os dispêndios foram realizados para recursos destinados a gerar rendimentos futuros e fluxos de caixa (Silva, 2013).

2.7.2 Valor Atual Líquido

O Valor Atual Líquido é definido como o valor obtido ao atualizar, anualmente, a diferença entre as saídas e as entradas em caixa durante toda a exploração do projeto, a uma taxa de juro fixa e pré-determinada. Inclui os fluxos líquidos gerados pelo projeto e é um indicador quantitativo dos efeitos produzidos pelo investimento no projeto em questão. O cálculo do *VAL* é traduzido pela Equação 1 (Roldão, 2007):

$$VAL_k = \sum_{t=0}^n \frac{CFt}{(1+k)^t} \quad (\text{E.q. 1})$$

Em que:

t – n.º do período;

n – número total de períodos da vida útil do projeto ou do horizonte temporal da análise;

CFt – valor do fluxo financeiro (positivo/negativo) gerado pelo projeto no período t ;

k – taxa de atualização que deve refletir o custo de oportunidade do capital, ou seja, o rendimento que será possível obter efetuando uma aplicação alternativa do capital;

O *VAL* permite ter em consideração a totalidade do período de vida do projeto bem como o escalonamento dos movimentos de fundos e, como tal, oferece grandes vantagens quando se trate de efetuar escolhas em comparação com o período de cobertura ou com a taxa anual de rentabilidade (Camacho & Rosa, 1989).

2.7.3 Taxa Interna de Rentabilidade

O método do *TIR* (taxa interna de rentabilidade) mede o tempo-valor do dinheiro pelo *VAL*. *TIR* é um indicador usado de forma a poder concluir-se se o projeto é ou não rentável de modo a cobrir remunerações de capital, podendo assim ser comparada a taxa de financiamento do projeto. Quanto maior for o valor do *TIR* maior será a rentabilidade do projeto (Young & Ernest, 1994).

O *TIR* é a taxa à qual o valor atualizado das receitas do projeto iguala o valor atualizado do

investimento, com um valor atualizado líquido igual a 0. O procedimento de cálculo do *TIR* é o mesmo que o do *VAL* (Camacho & Rosa, 1989). Este critério é aconselhável quando é desconhecida ou controversa a taxa de atualização e quando são comparados projetos com níveis de investimento e vidas úteis diferentes, sendo por isso completado com o *VAL* (Abecassis & Cabral, 2000).

Poderá então ser calculada ao igualar a expressão do *VAL* a 0, traduzindo-se da Equação 2 (Roldão, 2007):

$$VAL = \sum_{t=0}^n \frac{CFt}{(1+TIR)^t} = 0 \quad (\text{E.q. 2})$$

2.7.4 Anuidade Equivalente

A Anuidade Equivalente (*AE*) é um critério indicado quando se procura estabelecer, para várias alternativas, uma cifra de comparação entre projetos distintos tanto no montante inicial de investimento como durante a sua vida útil. (Abecassis & Cabral, 2000)

Assim será traduzido pela Equação 3:

$$AE_k = VAL_k \times \frac{k(1+k)^n}{(1+k)^n - 1} \quad (\text{E.q. 3})$$

Este critério não esclarece no entanto o grau de rentabilidade do projeto, visto estar limitado ao custo.

2.7.5 Tempo de Recuperação

O tempo de recuperação (*TR*) determina o período de retorno do investimento realizado, isto é, define o prazo necessário para recuperar as despesas iniciais do investimento através dos fluxos gerados (benefícios líquidos) pelo projeto em questão.

A principal vantagem na utilização do período de recuperação é a sua facilidade de cálculo sendo que o seu valor não faz qualquer referência à rentabilidade do investimento (Abecassis & Cabral, 2000). Este critério é essencialmente útil na análise de risco no caso daquelas empresas que querem que o capital investido seja recuperado o mais rapidamente possível por forma a evitar certos riscos (competitividade, instabilidades económicas ou políticas do meio em que se insere, entre outros) (Camacho & Rosa, 1989).

O *TR* representa o momento, no tempo de duração de um investimento, em que a soma de todos os fluxos financeiros (Balanço Total) é igual a zero, podendo ser determinado para fluxos

financeiros atualizados ou não (Camacho & Rosa, 1989).

3. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E FUNÇÕES DO LABORATÓRIO

Os procedimentos analíticos e as funções do laboratório foram determinados segundo os objetivos enumerados em 1.2. Neste capítulo apresenta-se um levantamento das principais funções do laboratório e dos métodos a utilizar na realização das mesmas. Os procedimentos analíticos para a realização das tarefas descritas neste capítulo são apresentados nos Anexos de I a VI.

Na Figura 5 apresenta-se um esquema para o planeamento de utilização de leveduras na empresa.

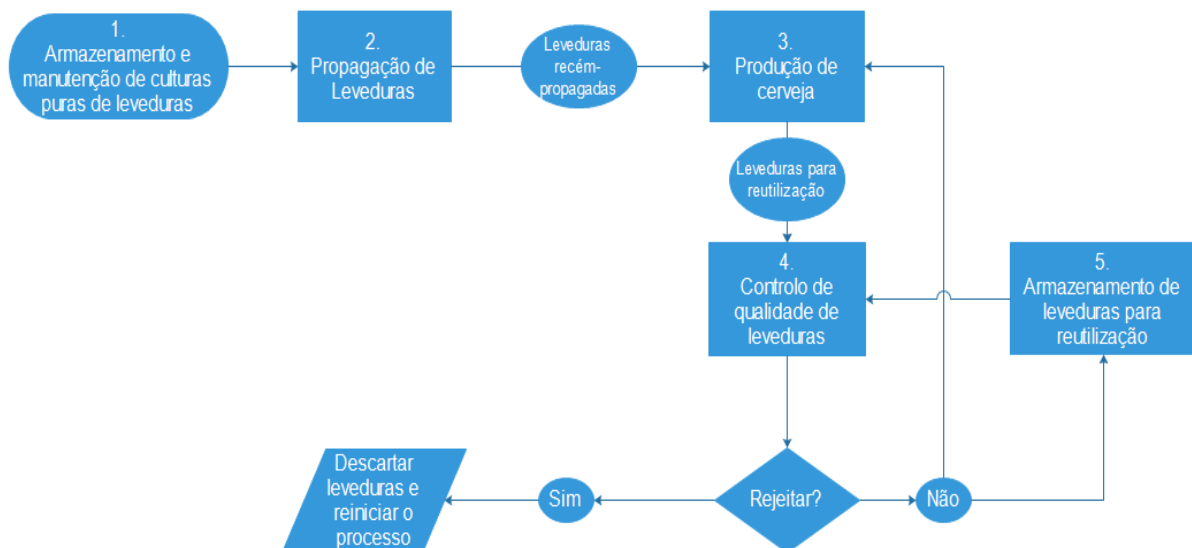


Figura 5- Esquema de utilização de leveduras na empresa.

O objetivo principal deste projeto é que a empresa produza as suas próprias leveduras de forma a cortar a necessidade de fornecimento externo. Para isso, poderá se recorrer a propagação de culturas de leveduras armazenadas ou à reutilização de leveduras de uma fermentação prévia. O armazenamento de leveduras para a reutilização será feito em recipientes de volumes entre os 20 L e 30 L à temperatura de 2 °C a 3 °C. Devido às dificuldades técnicas inerentes ao armazenamento de recipientes deste volume no espaço do laboratório, nomeadamente a aquisição de equipamento de frio que suplante estas necessidades, as leveduras para reutilização serão armazenadas na câmara de frio já existente na empresa. A recolha e armazenamento de

leveduras são da responsabilidade do Departamento de Produção. Cabe ao/s técnico/s de laboratório realizarem o controlo de qualidade das leveduras armazenadas. O controlo de qualidade de leveduras deverá ser realizado antes do armazenamento, antes da utilização e a cada período de 7 dias de armazenamento. As leveduras que não apresentem as condições ideais para a reutilização deverão ser descartadas.

Na Tabela 1 apresenta-se a lista de tarefas a realizar, a frequência a que as tarefas deverão ser cumpridas e os procedimentos a efetuar na sua execução.

Tabela 1-Tarefas a realizar no laboratório, frequência de execução e procedimentos a aplicar

Tarefa	Frequência	Procedimentos
Propagação de leveduras	Sempre que requerido pelo responsável de produção	3.2 (Anexo II)
Renovação de culturas mãe	-trimestral para “ <i>slants</i> ”; -mensal para placas;	3.1 (Anexo I)
Testes a leveduras armazenadas	- Após a recolha;	3.3 (Anexo III)
	- Antes de utilizar;	3.4 (Anexo IV)
	- A cada 7 dias;	3.5 (Anexo V)
		3.6 (Anexo VI)
Testes microbiológicos a cerveja pré engarrafamento	- A cada lote	3.4 (Anexo IV)
		3.5 (Anexo V)
Testes microbiológicos a cerveja engarrafada	- Após engarrafamento; - Trimestral;	3.4 (Anexo IV)
		3.5 (Anexo V)
Testes microbiológicos ao mosto antes da inoculação	- A cada lote	3.4 (Anexo IV)
		3.5 (Anexo V)
		3.6. (Anexo VI)
Teste microbiológicos a superfícies e ambiente na área de produção	- A cada 2 meses	3.4 (Anexo IV)
		3.5 (Anexo V)
		3.6.1 (Anexo VI)
Teste microbiológicos a superfícies, material e ambiente no laboratório	- A cada 2 meses	3.4 (Anexo IV)
		3.5 (Anexo V)
		3.6 (Anexo VI)

3.1 Armazenamento e Manutenção de Culturas Puras de Estirpes de Levedura

O armazenamento de culturas puras das várias estirpes de levedura será feito em tubos de ensaio com rolha inclinados (*slants*), em gel de agarose (método de subcultura periódica). O meio de cultura utilizado será mosto de cerveja a 10° Plato (unidade de medida de gravidade específica utilizada no setor cervejeiro, representa a concentração de sacarose, em massa, numa solução de água, constituindo, assim, uma aproximação da concentração mássica de açúcares no mosto) sem lúpulo. Para cada estirpe deverão ser mantidas três culturas-mãe que deverão ser renovadas a cada 3 meses. Este método de preservação garante resultados satisfatórios para períodos curtos de armazenamento a baixo custo de aplicação. Estas condições, embora adequadas para a dimensão projeto, poderão não ser ideais para manutenção da integridade biológicas das culturas a longo prazo. Recomenda-se, como medida de precaução, o armazenamento das culturas num laboratório especializado que recorra a técnicas mais avançadas como a criopreservação ou liofilização.

Poderão ser mantidas também culturas de trabalho, que deverão servir para operações de transferência de colónias, observação de pureza de uma estirpe, colheita de novas estirpes, entre outras. Para este tipo de operações serão utilizadas placas (caixas de Petri) com meio de cultura idêntico ao utilizado no armazenamento, ou outro adequado a uma função específica. Estas culturas em placas poderão ser armazenadas por períodos não superiores a um mês.

Os tubos de ensaio e as placas, após inoculados e fechados, deverão ser armazenados no frigorífico á temperatura de 2 °C. Todos os tubos e caixas deverão estar selados e identificados com o meio de cultura utilizado e data de elaboração, nome da estirpe de levedura e data de inoculação.

O armazenamento e manutenção de culturas puras de diferentes estirpes de levedura envolve a realização das seguintes tarefas segundo os procedimentos apresentados no Anexo I:

- Preparação do meio de cultura para armazenamento;
- Preparação de tubos de ensaio e placas para armazenamento;
- Inoculação de leveduras em tubo de ensaio;
- Inoculação de leveduras em placas;
- Armazenamento de leveduras.

3.2 Propagação de Leveduras

Esta fase tem como objetivo a propagação de leveduras desde o armazenamento em tubos de

ensaio até à inoculação do mosto para a produção de cerveja. Assim serão feitas propagações sucessivas em crescente volume de forma a atingir a quantidade de células necessárias à produção de cerveja.

A quantidade final de células requerida para inocular o mosto na cervejeira depende tanto do volume a inocular como do tipo de cerveja a produzir. Cervejas “*lager*” necessitam de uma maior quantidade de células para a fermentação em relação a cervejas “*ale*”. Antes de dar início à fase de propagação de leveduras é importante determinar, juntamente com o mestre cervejeiro, qual a quantidade final de células pretendida. A concentração total de células num determinado passo da propagação depende de vários fatores, entre eles, a estirpe da levedura e os parâmetros do processo de propagação como a temperatura e a concentração de açúcares no mosto (°Plato). Assim, torna-se muito difícil prever a quantidade total de células presentes num determinado volume.

A propagação de leveduras compreende a realização das seguintes tarefas segundo os procedimentos apresentados no Anexo II:

- Escolha de colónias;
- Transferência de colónias da placa para a propagação;
- Propagação sucessiva de leveduras até ao volume pretendido.

Os procedimentos descritos no Anexo II não são restritivos. Pelo contrário, é esperado que após o início de funcionamento do laboratório estes sejam testados e ajustados de forma a melhor se adaptarem as especificidades que cada estirpe de levedura apresente.

3.3 Contagem de Células

A determinação da concentração de células numa amostra será feita a partir da contagem de células numa câmara *Neubauer*. Este método permite não só a contagem de células, mas também a determinação da viabilidade das mesmas, a partir da adição de um corante (Allen, 1994).

Para uma contagem mais precisa este método requer, na maioria das vezes, a realização de diluições em série. Concentrações demasiado elevadas dificultam a contagem e conduzem a resultados pouco precisos. O mesmo acontece para amostras com muito baixas concentrações, a escassez de células dificulta a contagem afetando a precisão dos resultados (White & Zainasheff, 2012). O fator de diluição necessário para a obtenção de resultados satisfatórios depende da natureza da amostra. Ou seja, amostras em que se esperam reduzidas concentrações de células (*e.g.* cerveja) requerem poucas, ou nenhuma, diluições. Amostras em que se espera

uma concentração elevada (*e.g.* cerveja em fermentação) requerem um maior número de diluições.

A viabilidade é a percentagem de células vivas numa amostra e pode ser obtida durante a contagem através da utilização do azul-de-metileno. As células mortas não metabolizam este corante apresentando assim uma cor azul escura. As células vivas absorvem o corante lentamente e são capazes de o processar apresentando cor branca. Células azuis claro ou células em gemulação em que a célula filha apresente cor azul escura não estão mortas (Boulton & Quain, 2001).

A realização das tarefas em cima descritas requer a realização dos seguintes procedimentos, apresentados no Anexo III:

- Diluições em série;
- Contagem;
- Viabilidade.

3.4 Isolamento de Colónias em Meio Sólido

Os métodos de análise microbiológica de uma amostra requerem, na maioria das vezes, a isolamento de colónias em meio sólido. Diferentes tipos de amostra necessitam de diferentes técnicas de isolamento.

Em baixo, apresentam-se as diferentes técnicas para o isolamento de colónias e as suas aplicações. Os procedimentos correspondentes a estas técnicas estão descritos no Anexo IV.

3.4.1 Sementeira por Espalhamento

Este método é especialmente indicado para a análise de amostras com concentração elevada de células (*e.g.* lama de leveduras depositada no fermentador) (White & Zainasheff, 2012). Assim, para sua aplicação, é necessário recorrer à diluição da amostra. O fator de diluição a aplicar depende da concentração de células e poderá ser avisado repetir o procedimento para diferentes fatores de diluição (Sinogas *et al.*, 2003).

3.4.2 Sementeira por Riscado

Método de isolamento de colónias bastante simples e apropriado para amostras de concentrações elevadas, cujo objetivo é gerar colónias bem afastadas umas das outras (Sinogas *et al.*, 2003). No início do riscado a concentração de células é elevada, o que pode originar a formação de colónias sobrepostas ou confluentes, mas à medida que o riscado prossegue a

concentração de células diminui e obtêm-se colónias cada vez mais isoladas.

3.4.3 Sementeira por Incorporação

O método de sementeira por incorporação envolve a mistura de uma amostra (de 1 mL a 10 mL) com o meio de cultura ainda quente e no estado líquido. É apropriado para amostras de cerveja não filtrada, cerveja maturada em garrafa e cerveja no fermentador (White & Zainasheff, 2012). A aplicação deste método requer alguns cuidados. A mistura da amostra com o meio de cultura líquido deverá ser feita à temperatura adequada (45 °C a 50 °C). Temperaturas demasiado altas poderão causar a morte de microrganismos e temperaturas demasiado baixas poderão resultar na solidificação do meio à volta de gotas da amostra (Grigorova & Norris, 1990). É importante misturar bem a amostra com o meio de cultura de forma a obter uma distribuição uniforme dos microrganismos (Sumbali & Mehrotra, 2009).

3.4.4 Filtração em Membrana

Método apropriado para testar amostras com reduzidas concentrações de células, como cerveja filtrada ou água. Permite testar maiores volumes de amostra que de outra forma resultariam na formação de poucas ou nenhuma colónias (Goldman & Green, 2009).

3.4.5 Sementeira por Exposição

Este método permite testar os níveis de contaminação de um ambiente por exposição de um meio de cultura ao ar numa determinada área.

3.4.6 Colheita por Cotonete Estéril

Para testar a contaminação de uma determinada superfície utiliza-se o método de colheita por cotonete estéril. Passando o cotonete por uma superfície e depois esfregando-o num meio de cultura podemos observar as colónias formadas e identificar uma possível contaminação.

3.5 Testes Bacteriológicos

A realização de testes bacteriológicos consiste na inoculação de um meio de cultura específico a partir dos métodos referidos em 3.4. A escolha de um meio de cultura a utilizar no teste de uma amostra depende do tipo de microrganismo cuja presença (contaminação) se pretende testar. Cada meio de cultura possui um determinado conjunto de componentes que podem fomentar ou inibir o crescimento de um determinado microrganismo permitindo assim a sua

deteção/contabilização.

A Tabela 2 descreve os meios de cultura utilizados no laboratório, a sua aplicabilidade e a frequência recomendada de aplicação.

Tabela 2- Meios de cultura e suas aplicações (adaptado de White & Zainasheff, 2012)

Meio de Cultura	Tipo de meio	Aplicação	Organismos Comuns em Cervejeiras
UBA	Aeróbio (pode ser usado anaerobiamente)	Leveduras selvagens; Bactérias	<i>Lactobacillus</i> ; <i>Pediococcus</i> ; <i>Acetobacter</i> ; <i>Enterobacter</i> .
HPL	Anaeróbio	Bactérias;	<i>Pediococcus</i> ; <i>Lactobacillus</i> .
LMDA	Aeróbio (pode ser usado anaerobiamente)	Bactérias;	<i>Bactérias acéticas</i> ; <i>Bacillus</i> ; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Enterobacter</i> .
MacConkey	Aeróbio	Bactérias entéricas;	<i>Escherichia</i> ; <i>Klebsiella</i> ; <i>Enterobacter</i> ; <i>Hafnia</i> ; <i>Citrobacter</i> .

3.5.1 Meio de Cultura UBA

O meio de cultura UBA (*Universal Beer Medium*) contém nutrientes e agarose aos quais se adiciona cerveja. A sua composição faz com que este seja o meio que mais se aproxima do ambiente natural de uma cervejaria. A utilização de cerveja na sua preparação torna-o seletivo para microrganismos que adaptados à presença de compostos da cerveja, como o etanol e os lúpulos (Barney *et al.*, 1990). Opcionalmente poder-se-á se adicionar cicloheximidina para inibir o crescimento de leveduras. Os procedimentos correspondentes a estas técnicas estão descritos no Anexo V.

3.5.2 Meio de Cultura HLP

O meio de cultura HLP (*Hsu's Lactobacillus Pediococcus*) é utilizado para testar a presença de bactérias ácido-láticas Gram-positivas do género *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Spedding, 2000). Contém cicloheximidina para inibir o crescimento de fungos e permitir o crescimento bacteriano. A inoculação do meio em estado líquido permite que este solidifique à volta da amostra criando um ambiente anaeróbico. Possui também purificadores de oxigénio que removem algum oxigénio remanescente.

3.5.3 Meio de Cultura LMDA

O meio de cultura LMDA (*Lee's Multiple Differential Medium*) permite testar uma amostra para a presença de bactérias aeróbicas e/ou anaeróbicas (Spedding, 2000). Contém carbonato de cálcio (CaCO_3) para identificar bactérias produtoras de ácidos, verde de bromocresol para diferenciar colónias por cores e opcionalmente cicloheximidina para inibir o crescimento de fungos. Em condições aeróbicas permite deteção de bactérias acéticas e sob condições anaeróbicas permite a deteção de bactérias lácticas (White & Zainasheff, 2012).

3.5.4 Meio de Cultura MacConkey

Este meio permite a diferenciação de bactérias Gram-negativas, por seleção destas, de bactérias Gram-positivas, por inibição. Bactérias lácticas formam colónias avermelhadas ou rosa; colónias de outras bactérias são incolores (Spedding, 2000).

3.5.5 Método de Coloração de Gram

O método de coloração de Gram permite a distinção de bacterias Gram-positivas de bactérias Gram-negativas por coloração. As bactérias Gram-negativas apresentam cor roxa enquanto as bacterias gram-positivas apresentam cor vermelha ou rosa (Harvey *et al.*, 2007).

3.6 Controlo de Qualidade de Leveduras

O controlo de qualidade de leveduras servirá tanto para testar leveduras propagadas no laboratório como para testar leveduras armazenadas para reutilização. Na Tabela 3 apresentam-se os métodos que deverão ser utilizados nos testes para amostras de leveduras destas duas proveniências. Os procedimentos correspondentes a estas técnicas estão descritos no Anexo VI.

Tabela 3- Parâmetros a testar para o controlo de qualidade de leveduras.

Parâmetro a testar	Tipo de teste	Procedimentos
Contaminação por leveduras selvagens	WLN	3.4 (Anexo IV) 3.6.1 (Anexo VI)
Mutações respiratórias	Teste de mutações respiratórias	3.6.2 (Anexo VI)
Vitalidade	Teste de poder de acidificação	3.6.3 (Anexo VI)
Viabilidade	Teste do azul-de-metileno	3.3 (Anexo III)
Concentração celular	Contagem de células	3.3 (Anexo III)
Contaminação bacteriana	UBA	
	LMDA	3.4 (Anexo IV)
	HLP	3.5 (Anexo V)
	MacConkey	

3.6.1 Meio de Cultura WLN

O meio de cultura WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient*) contém verde de bromocresol, um corante que diferentes estirpes de levedura processam de diferentes formas, originando colónias de diferentes cores. A observação de uma cultura com este meio permite concluir quanto ao número de diferentes estirpes presentes numa amostra (Hornsey, 2013).

3.6.2 Teste de Mutações Respiratórias

As mutações respiratórias são das mais comuns no que concerne às leveduras utilizadas na indústria cervejeira. Este método permite estimar a percentagem de leveduras que apresentam este tipo de mutações (White & Zainasheff, 2012).

3.6.3 Teste de Poder de Acidificação

O teste de poder de acidificação permite estimar a vitalidade das leveduras. Baseia-se no facto de que as leveduras em atividade vão baixar o pH do meio, logo quanto mais rápida a acidificação, maior será a sua vitalidade (White & Zainasheff, 2012).

4. PROJETO DE CONSTRUÇÃO E MONTAGEM DO LABORATÓRIO

Neste capítulo apresenta-se o plano para a construção e montagem do laboratório de microbiologia nas instalações de Os Três Cervejeiros, Lda. Na Figura 6 pode-se observar a planta das instalações da empresa e a localização do laboratório.

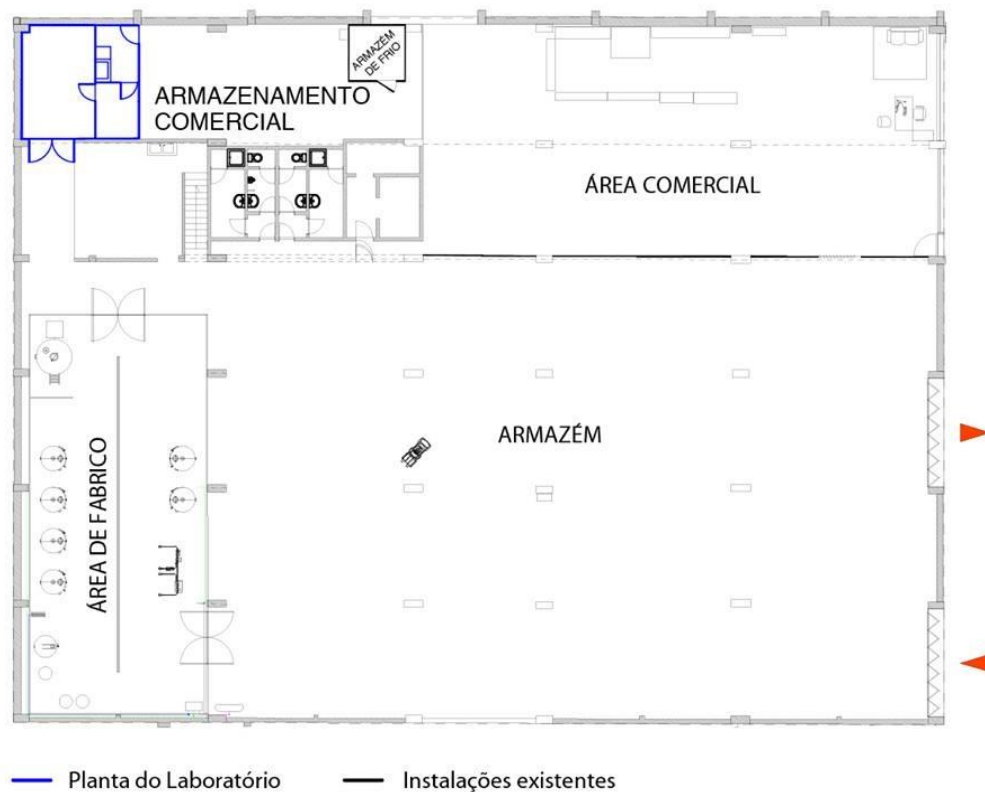


Figura 6- Instalações da empresa e localização do laboratório.

A localização do laboratório foi decidida tendo em conta os seguintes fatores:

- Posição relativamente à produção;
- Posição relativamente a zonas de armazém e de passagem;
- Acesso a pontos de luz, água e esgotos;
- Iluminação natural e artificial.

Assim, a localização do laboratório deverá permitir fácil acesso e proximidade à zona de produção, facilitando o transporte de leveduras, a recolha de amostras e outras atividades que envolvem estes dois espaços. Relativamente a zonas de armazém e de passagem determinou-se a localização do laboratório para que este tivesse interferência mínima noutras atividades da empresa. A proximidade de pontos de luz, água e esgotos é muito importante para implementação deste projeto na medida em que o fácil acesso a estas utilidades permite

simplificar a fase de construção para além dos evidentes ganhos económicos. Por fim, foi tido em conta a iluminação natural (solar) e artificial (iluminação pré-existente) do local, garantindo a não incidência de luz solar direta e proporcionando boas condições de trabalho.

4.1 Construção

4.1.1 Planta

A estrutura na qual está inserida o laboratório tem um a área total de 30,8 m² e está dividida em três compartimentos. Um compartimento maior, o laboratório, e dois compartimentos de apoio a este, de menores dimensões, sendo um deles um escritório e outro uma sala de lavagem de material.

Na Figura 7 apresenta-se a planta da estrutura projetada.

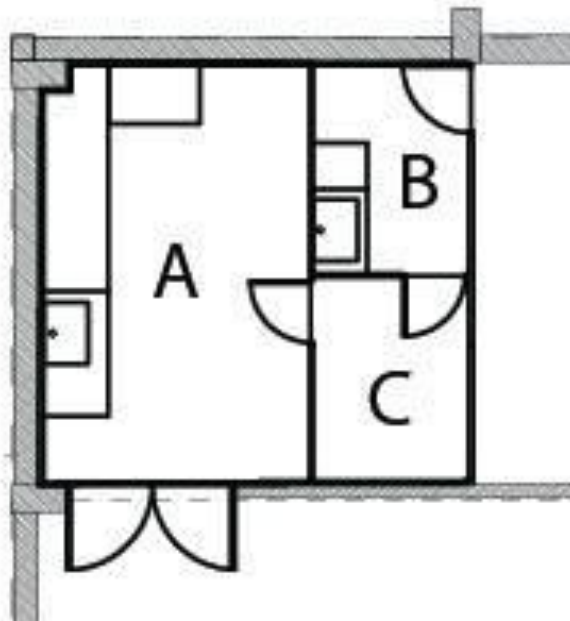


Figura 7- Planta da estrutura a construir, A-laboratório; B- sala de lavagem; C- escritório.

O compartimento correspondente ao laboratório tem uma área de 18,66 m², uma porta de entrada e saída de pessoal a partir do escritório, uma porta dupla de saída para a produção e uma janela para a sala de lavagem. A porta a partir do escritório permite que a entrada e saída de pessoal não seja feita a partir do armazém, evitando a entrada de ar direta deste espaço para o laboratório. A porta dupla servirá para a saída de leveduras propagadas do laboratório para a produção. A existência de uma janela entre o laboratório e a sala de lavagem permite a

transferência de material (lavado/para lavagem) entre estes dois compartimentos.

O escritório é uma sala de apoio ao laboratório, neste espaço serão realizadas tarefas como o processamento de dados e planeamento de atividades. Este compartimento pode ser acedido por meio de duas portas, uma a partir do laboratório e outra da sala de lavagem.

A sala de lavagem, como o nome indica, servirá para a lavagem e esterilização de material. Para além de uma banca com pio e de uma autoclave, este compartimento terá também um cacifo de forma a permitir aos técnicos de laboratório equiparem-se apropriadamente para as atividades laboratoriais.

4.1.2 Materiais

Para a edificação das paredes e do teto foram considerados dois materiais de construção, painéis *sandwich* e placas de *Pladur*. Optou-se pela utilização de painéis *sandwich* porque, embora ligeiramente mais caro, este material é de mais fácil aplicação, não necessita de pintura e sua superfície lisa e resistente facilita a limpeza. O painel *sandwich* foi aconselhado pela empresa responsável pelo orçamento do equipamento AVAC. Esta empresa, doravante designada por empresa A, alega que este material confere melhor e isolamento térmico e mais fácil instalação destes equipamentos relativamente ao *Pladur*.

O projeto contempla a instalação de pavimento em vinil branco com 3 mm de espessura. Este material permite, devido à sua cor, a fácil deteção de sujidades. A sua superfície resistente e lisa permite uma limpeza eficaz.

As portas de acesso do exterior para a sala de lavagem e da sala de lavagem para o escritório serão de madeira folheada pintada de branco com puxadores metálicos. As portas de acesso do escritório para o laboratório e do laboratório para o exterior serão de alumínio lacadas a branco com vidro laminado fosco.

As janelas serão constituídas por caixilharias de alumínio lacado a branco e vidro laminado de 8 mm.

A banca deverá ter uma estrutura de madeira e o pio em aço-inoxidável com 45 mm.

4.1.3 Utilidades

O fornecimento e drenagem de água bem como o fornecimento de eletricidade estão contemplados no projeto. Na Figura 8 e Figura 9 seguintes apresentam-se as soluções encontradas para a instalação destas utilidades.

O fornecimento e drenagem de água compreende a instalação de canalização em dois pontos

do projeto, na pia do laboratório e na banca da sala de lavagem (Figura 8).

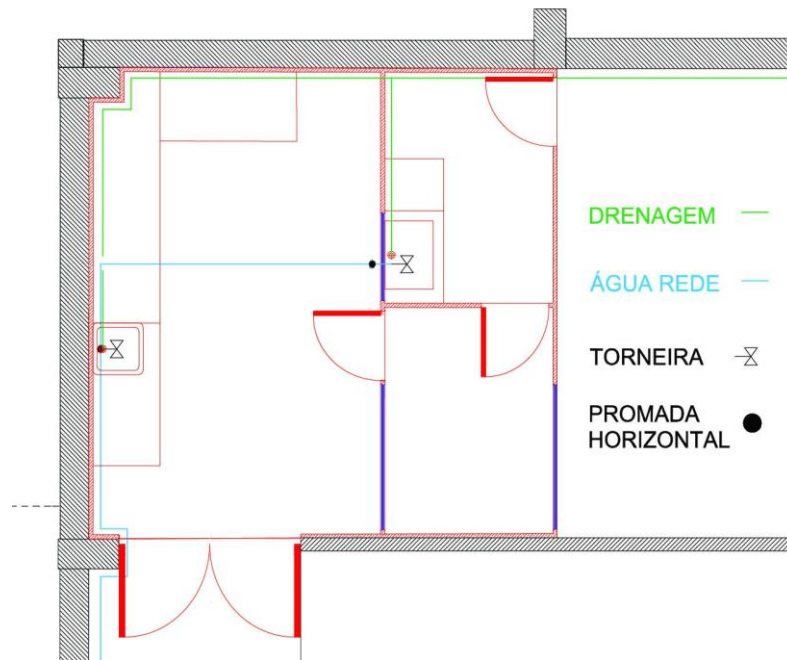


Figura 8- Planta de instalações de água da rede e drenagem de água.

O fornecimento de eletricidade envolve a instalação de tomadas elétricas em vários pontos da estrutura bem como a instalação de pontos de luz para a iluminação (Figura 9).

4.1.4 Sistema AVAC

De forma a se proporcionar um ambiente propício à atividade laboratorial microbiológica e temperaturas ideais para a propagação de leveduras, é necessário instalar um sistema que permita o controlo de temperatura e ventilação de ar sem comprometer a qualidade do mesmo. De forma a cumprir com estas premissas, recorreu-se a uma empresa especializada na instalação destes equipamentos. Segundo as recomendações desta empresa (empresa A) o projeto contempla a instalação de 2 caixas de ventilação e 2 aparelhos de Ar Condicionado (AC).

A caixa de ventilação do laboratório fará a insuflação de ar novo filtrado para o laboratório. Esta opção permite que se fique com “excesso de ar” no laboratório, ou seja cria uma sobrepressão de ar que irá sair depois através de um grelha que poderá estar instalada na porta. Este equipamento permite não só uma maior eficiência na climatização do ar feita pelo AC, mas principalmente, sempre que a porta do laboratório se abra há a garantia que não entra ar não filtrado, mas sim sempre saída do ar de dentro do laboratório. A caixa de ventilação do escritório é responsável pela circulação de ar neste compartimento.

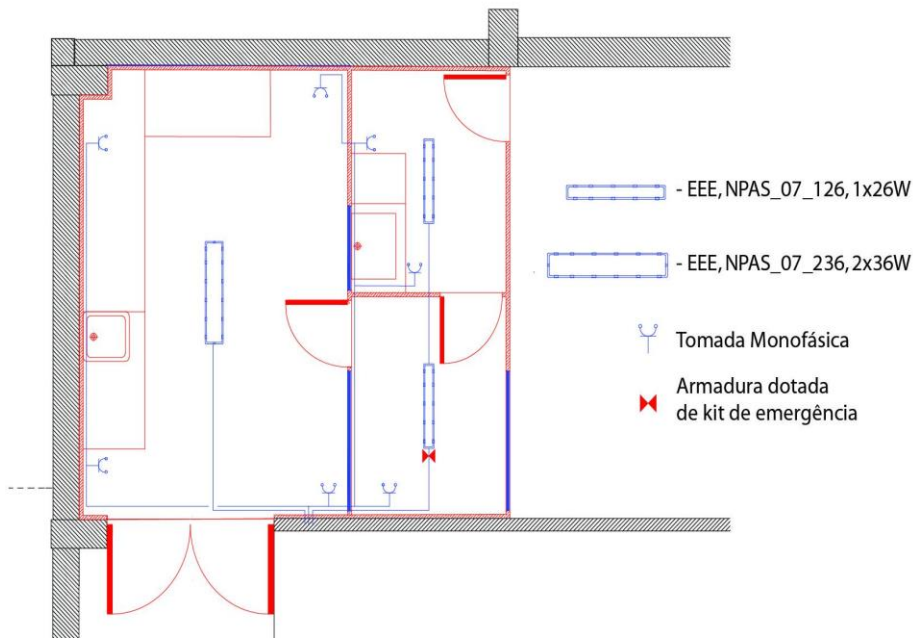


Figura 9- Planta de instalações elétricas.

Os dois aparelhos de AC, uma a instalar no laboratório e outro no escritório, serão responsáveis pela regulação da temperatura nestes espaços. O equipamento a colocar no escritório será um modelo topo de gama com a capacidade de humedificação/desumidificação, ventilação e purificação do ar. O aparelho a instalar no escritório, devido à menor sensibilidade deste espaço, será um modelo mais simples apenas para a climatização.

O esquema de montagem destes equipamentos pode ser observado na Figura 10. Uma descrição mais detalhada dos equipamentos a instalar é apresentada no Anexo VII.

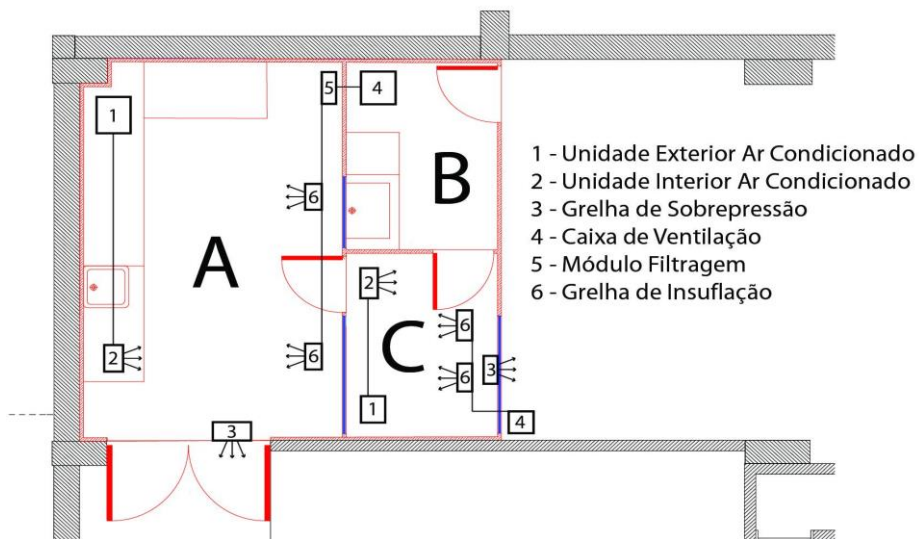


Figura 10- Esquema de instalação de equipamentos AVAC (fornecido pela empresa A).

4.2 Equipamento

Neste capítulo apresentam-se as listagens de equipamentos necessários á realização das atividades propostas neste projeto. As decisões quanto á escolha destes equipamentos foram tomadas tendo em conta os fatores de qualidade, financeiros e adequabilidade às necessidades do projeto.

4.2.1 Mobiliário

O mobiliário projetado consiste numa bancada em “L” de 4,56 m por 1,52 m e um móvel superior. A bancada terá armários embutidos em quase toda a sua extensão e uma pia. O móvel superior concede superior capacidade de armazenamento do material de laboratório. A bancada e os armários foram dimensionados tendo em conta as necessidades de espaço de trabalho e de arrumação. Na Figura 11 apresentam-se a planta e respetivos alçados projetados pelo autor.

Os materiais constituintes do mobiliário deverão conferir-lhe as características técnicas apropriadas à atividade laboratorial de microbiologia. Assim, o mobiliário deverá ter, superfícies lisas de fácil limpeza e sem porosidade, cor branca, resistência a água, produtos de limpeza e esterilização e resistência mecânica ao peso exercido por materiais e equipamento armazenados.

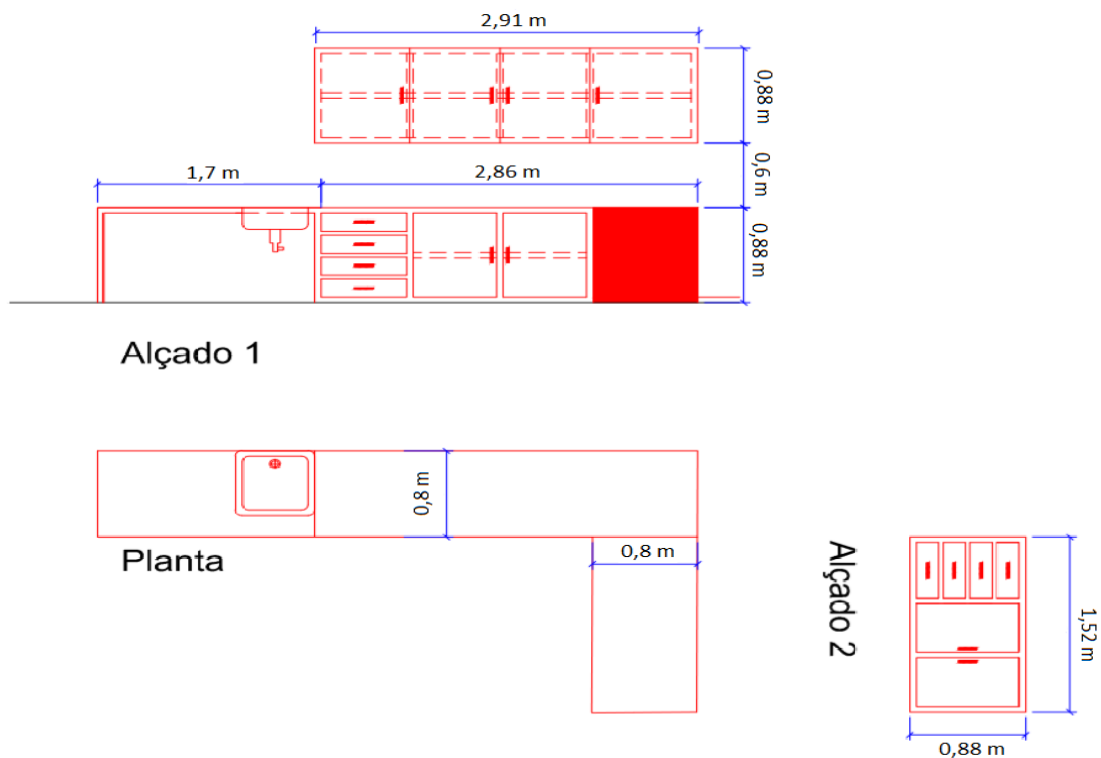


Figura 11- Planta e alçado do mobiliário técnico de laboratório.

De forma a cumprir com estas especificações recorreu-se a uma empresa especializada do setor. As especificações técnicas recomendadas por esta empresa são apresentadas no Anexo VIII. A Figura 12 constitui uma representação 3D do mobiliário a instalar fornecida pela empresa B. O restante mobiliário considerado no projeto consiste em, dois bancos para o laboratório, uma secretária e cadeira para o escritório e um cacifo para a sala de lavagem.



Figura 12- Representação 3D do mobiliário a instalar (fornecido por empresa B).

4.2.2 Equipamento Laboratorial

O projeto equaciona a aquisição do equipamento adequado às atividades laboratoriais propostas. Na Tabela 4 apresenta-se a listagem desses equipamentos.

A autoclave é um equipamento fundamental na implementação deste projeto. As suas principais funções são a esterilização de material e mosto de cerveja para a propagação e meio de cultura. O frigorífico, agitador magnético, agitador mecânico, a incubadora *shaker* e o microscópio são equipamentos essenciais para a manutenção de culturas e propagação de leveduras.

O Banho-maria e a estufa bacteriológica são equipamentos necessários exclusivamente para a realização de testes microbiológicos.

Os restantes equipamentos, como a balança digital, o bico de *Bunsen*, a centrífuga angular, o micro-ondas e o medidor de pH, desempenham funções operacionais e poderão ser utilizados em várias tarefas realizadas no laboratório.

Tabela 4- Lista de equipamentos laboratoriais

Produto	Modelo/Características
Microscópio	Ampliação máxima: 10 × 100
Autoclave	<i>Presoclave</i> 80 L
Bico de <i>Bunsen</i>	Propano
Agitador Magnético	C/aquecimento; 10 L
Balança digital	PBF 600-1 Kern ; 6000 g a 0,1 g
Estufa Bacteriológica	<i>Incubat</i> 36 L
Banho-maria Analógico	5 L
Centrífuga angular	<i>Cencom</i> II
Agitador magnético	S/ aquecimento; 30 L
Incubadora <i>Shaker</i>	<i>Incu-Shaker Mini</i>
Micro-ondas	<i>Kumpf</i> ; 20 L
Medidor de pH	Magnético
Frigorífico Combinado	<i>Samsung</i> A++; 204 L / 98 L

4.2.3 Material

A realização das atividades laboratoriais propostas neste projeto envolve a aquisição de material de laboratório. A listagem de material necessário encontra-se descrita na Tabela 5.

Tabela 5- Lista de material

Produto	Características	Unidades
Camara <i>Neubauer</i>	Dupla S/pinças	1
Ansa	Cromoníquel; Caixa 10 unidades	1
Suporte tubos de ensaio	60tubos × 60 mm	2
Tubo de ensaio c/ rolha	16 × 100 mm, 16 × 160 mm	40 × 2
Proveta Graduada	Vidro; 25 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	2 × 5
Pipeta graduada	Vidro; 1 mL, 10 mL	6 × 2
Pipeta de <i>Pasteur</i>	Plástico; 3 mL	6
Caixa de <i>Petri</i>	15 mm × 60 mm; 12 mm × 40 mm	40 × 2
<i>Parafilm</i>	Rolo, 10 m × 3800 mm	2
Óculos de proteção	Plástico	2
Máscara	100 unidades	1
Touca	100 unidades	1
Proteção de sapatos	100 unidades	1
Fita indicadora de esterilização	Rolo	2
Tubos <i>Ependorff</i>	Caixa 100 unidades; 1,5 mL	2
Espátula/Colher	160 mm	3
Lâminas	Caixa 100 unidades	1
Lamelas	Caixa 100 unidades, 20 mm × 20 mm	1
Espalhador de células	Aço-inox	3
<i>Erlenmeyer</i>	100 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL	6 × 4
Fermentador	Vidro 5 L, 10 L, 20 L, 25 L, 34 L	3 × 5
Termómetro	Vidro	2
Clip para termómetro	Aço	2
Densímetro	2 Escalas	1
Frasco <i>Pyrex</i>	500 mL	6

5. ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÓMICA

5.1 Custos

Os custos associados à implementação deste projeto estão descritos na Tabela 6. Nesta tabela apresenta-se um resumo dos custos totais relativos ao investimento inicial e os custos anuais de funcionamento do laboratório.

Tabela 6- Custos de investimento inicial (C_I) e Custos anuais (C_A)

Descrição	C_I /€	C_A /€
Construção	10 703,45	
Equipamento	15 350,55	
Material	830,10	166,02
Sistema AVAC	4 335,75	
Mobiliário	4 027,83	
Consumíveis		743,41
Outros		2 640,00
Total	35 247,68	3 549,43

5.1.1 Construção

Os custos de construção da estrutura projetada foram obtidos mediante pedido de orçamento a empresas de construção civil. Os valores de custo de construção utilizados neste projeto são retirados do orçamento da empresa com o preço mais competitivo e apresentados na Tabela 7. Os trabalhos de obra incluem os materiais, às deslocações e mão-de-obra referentes a cada uma das especialidades (trolha, canalizador, pintor e electricista) que envolvem a construção do laboratório.

Tabela 7- Custos de construção

Trabalhos	Custo, C/ €
Trolha, Gesso Cartonado, Divisórias, Portas e Janelas	7 835,77
Canalizador	1 057,80
Obra de pintor	746,98
Obra de electricista	1 809,79
Total	10 703,45

5.1.2 Equipamento

Os custos de compra de equipamento foram calculados recorrendo a orçamentos de empresas distribuidoras do setor. Para cada equipamento selecionou-se o fornecedor com preço mais baixo. Na Tabela 8 apresentam-se os valores de custos dos equipamentos selecionados.

Tabela 8- Custo de aquisição de equipamentos de laboratório

Equipamento	Custo, C /€
Microscópio	528
Autoclave	6931,05
Bico de <i>Bunsen</i>	26,95
Agitador Magnético	312,42
Balança Digital	264,4
Estufa Bacteriológica	1 039,35
Banho-maria Analógico	265,68
Centrifuga Angular	559,65
2 Agitador magnético	1 656,27
Incubadora <i>Shaker</i>	2 583,00
Micro-ondas	49,99
Medidor de pH	362,85
Frigorífico Combinado	769,99
Total	15 350,55

5.1.3 Sistema AVAC

O dimensionamento e orçamento para instalação de um sistema AVAC foi fornecido por uma empresa especializada do setor. Na Tabela 9 apresentam-se os custos associados a instalação e aquisição deste equipamento.

Tabela 9- Custos de aquisição (c/ instalação) do sistema AVAC

Produto	Modelo	Custo, C /€
AC escritório	<i>Fujitsu, ASY25UiLLCC</i>	984,00
AC laboratório	<i>Daikin, Ururu Sarara</i>	2 306,25
Módulo de ventilação laboratório	<i>Tria, Cubus DD146-355</i>	1 045,50
Módulo de ventilação escritório	<i>Tria, Cubus DD146-195</i>	799,50
Total		4 335,75

5.1.4 Material

Os custos relacionados com a aquisição e renovação de material estão descritos na Tabela 10. Devido à natureza de fácil desgaste do material de laboratório, considerou-se uma taxa de renovação (T_A) de 20 %. No Anexo IX apresenta-se uma descrição mais detalhada destas despesas.

Tabela 10- Custos de material laboratorial

$C_I/\text{€}$	T_A	$C_A/\text{€}$
830,10	20 %	166,02

5.1.5 Mobiliário

Os custos de aquisição do mobiliário necessário a implementação deste projeto encontram-se descritos na Tabela 11. O orçamento para o mobiliário próprio de laboratório foi pedido a uma empresa especializada no setor. Os preços do restante mobiliário foram obtidos no *website* de uma grande superfície comercial.

Tabela 11- Custos de aquisição de mobiliário

Mobiliário	Custo, C /€
Mobiliário técnico de laboratório	3 737,91
Outro mobiliário	289,92
Total	4027,83

5.1.6 Consumíveis

Consideram-se como consumíveis todos os compostos químicos e bioquímicos utilizados na realização das atividades propostas no laboratório. Na Tabela 12 apresentam-se os valores estimados de consumo anual destes compostos.

Tabela 12- Custos estimados de consumíveis

Composto	Custo, C /(€/kg) ou C /(€/L)	C_A /€
Pó de agarose	282,90	64,50
Meio de cultura UBA	269,59	17,79
Meio de cultura MacConkey	100,97	6,06
Meio de cultura WLN	102,98	9,89
Meio de cultura HLP	224,13	18,83
Meio de cultura LMDA	249,84	24,88
Etanol	12,51	75,07
Iodina de Gram	40,86	40,86
NaH ₂ PO ₄	424,69	6,42
Na ₂ HPO ₄	333,58	4,64
Glucose	34,42	0,83
Safranina	2 689,76	6,72
CTT	3 542,52	85,02
Corante de cristal violeta	92,25	92,25
Isopropanol	11,69	11,69
Cicloheximidina	303,32	87,36
Água destilada	0,31	18,45
Azul-de-metileno	1 721,51	172,15
Total		743,41

5.1.7 Outros Custos

Os custos associados ao material de escritório, consumo de utilidades e gastos com pessoal estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13- Outros custos

Despesa	Valor Mensal, C /€	Valor Anual, C/ €
Material de escritório	5	60
Utilidades	65	780
Pessoal	150	1800

Os valores apresentados na Tabela 13 referentes ao material de escritório representam uma estimativa dos custos associados à aquisição de material de escrita.

Para as utilidades consideraram-se os gastos relativos ao consumo de água e eletricidade necessários para o funcionamento do laboratório.

Os valores referentes aos gastos com pessoal foram fornecidos por Os Três Cervejeiros Lda.

5.2 Benefícios

Consideram-se como benefícios todos os ganhos financeiros envolvidos na aplicação deste projeto. Estes ganhos estão relacionados com a poupança obtida pela propagação e reutilização de leveduras face à alternativa existente, a compra de leveduras. Este valor, fornecido por Os Três Cervejeiros Lda., está estimado em 6 500 € para o ano de 2015.

5.3 Relação Custos-benefícios

A relação custos-benefícios foi analisada mediante a aplicação de métodos de avaliação de viabilidade económica. O cálculo destes métodos requer a utilização de taxas que deverão ser previamente determinadas.

A taxa anual de crescimento, fornecida por Os Três Cervejeiros Lda., trata-se de uma estimativa

de crescimento da empresa, baseada no crescimento observado em anos anteriores e nas projeções de crescimento da empresa. Considera-se, neste projeto, que a atividade laboratorial aumentará proporcionalmente ao crescimento da empresa, traduzindo-se assim num aumento tanto ao nível de benefícios como de despesas.

A taxa de imposto refere-se ao imposto sobre os rendimentos obtidos (IRC) e é estabelecida pela Autoridade Tributária Aduaneira.

A taxa de interesse, ou taxa mínima de atratividade, é a taxa mínima exigida pelo investidor. Esta, definida por Os Três Cervejeiros Lda., é aplicada na atualização de fluxos financeiros.

A taxa de inflação utilizada neste projeto é a média das taxas de inflação dos últimos dez anos. Os valores destas taxas são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Taxas utilizadas no cálculo de indicadores de viabilidade económica

Designação	Valor
Taxa anual de crescimento	30 %
Taxa de impostos	23 %
Taxa interesse	10,0 %
Taxa de inflação	1,563 %

5.3.1 Fluxos Financeiros

Na Tabela 15 apresentam-se os valores de Fluxos Financeiros (*FF*) e Balanço Total (*BT*) analisados ao longo de 10 anos. A designação “Atualizado” refere-se a valores aos quais foi aplicada a taxa de interesse.

Tabela 15- Fluxos Financeiros e Balanços Totais

Ano	FF /€	BT /€	FF Atualizado /€	BT Atualizado /€
2016	-36 747,18	-36 747,18	-36 747,18	-36 747,18
2017	3 776,31	-32 970,87	3 433,01	-33 314,17
2018	4 728,69	-28 242,18	3 908,01	-29 406,16
2019	5 986,15	-22 256,03	4 497,48	-24 908,68
2020	7 646,39	-14 609,93	5 222,59	-19 686,09
2021	9 838,44	-4 771,20	6 108,90	-13 577,19
2022	12 732,64	7 961,44	7 187,24	-6 389,95
2023	16 553,89	24 515,33	8 494,77	2 104,81
2024	21 230,76	45 746,09	9 904,31	12 009,12
2025	27 682,27	73 428,27	11 739,98	23 749,10
2026	41 546,14	114 546,14	16 017,83	39 766,94

Nos dados da Tabela 15 e Figura 13 observa-se uma subida nos Fluxos Financeiros ao longo dos 10 anos estudados. Um Fluxo Financeiro, num determinado período de tempo, representa a diferença entre os benefícios económicos e os custos de operação decorrentes desse período de tempo, ao qual, é deduzido um valor de imposto.

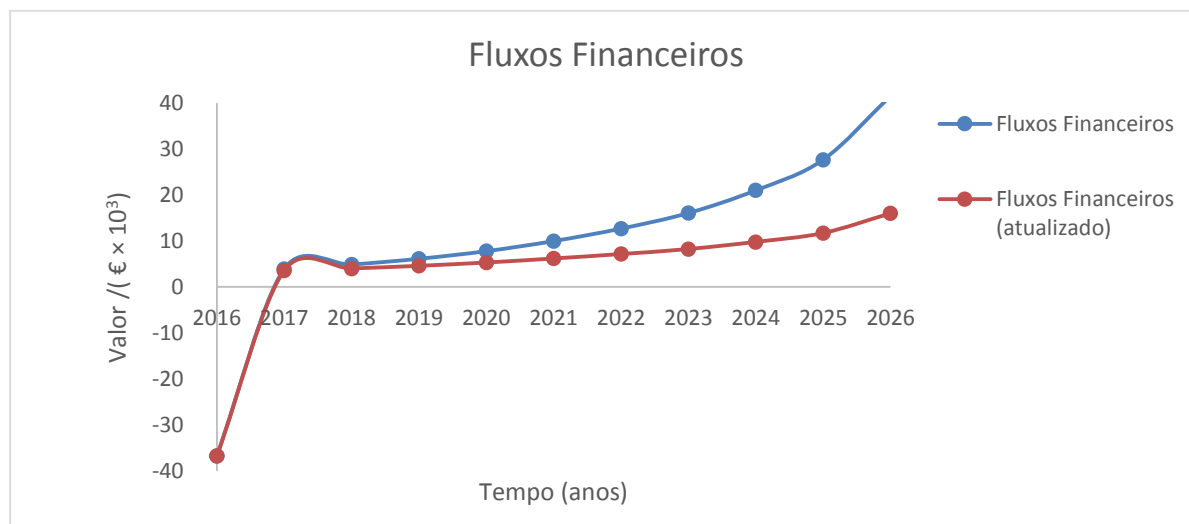


Figura 13- Representação gráfica dos Fluxos Financeiros ao longo do tempo

Um Fluxo Financeiro, num determinado período de tempo, representa a diferença entre os benefícios económicos e os custos de operação decorrentes desse período de tempo, ao qual, se positivo, é deduzido um valor de imposto.

O Balanço Total, num determinado ano, representa a soma de todos os fluxos financeiros até o final desse ano. Os Fluxos Financeiros são sempre positivos, com exceção do ano 2016 (ano 0), ano em que é realizado o investimento inicial. Então, os Balanços Totais aumentam, partindo de um valor negativo (investimento inicial) até valores positivos, mantendo-se positivos até ao final do tempo de estudo de 10 anos (Tabela 15, Figura 14). O ponto em que os Balanços atingem o valor de 0 € representam o Tempo de Recuperação.

Assim, conclui-se que com o aumento da atividade laboratorial, prevista neste projeto, aumentam as mais-valias da implementação do mesmo. No entanto, é necessário considerar que, a taxa de taxa anual de crescimento corresponde ao crescimento estimado da empresa, que poderá não equivaler ao crescimento da produção de cerveja e conseqüentemente ao crescimento da atividade laboratorial. Esta taxa é utilizada no cálculo do crescimento dos benefícios e das despesas, embora, não esteja comprovado que estes sejam diretamente proporcionais com o crescimento da atividade laboratorial. Ainda, o crescimento da atividade laboratorial poderá implicar a aquisição de novo equipamento, o que não está equacionado no cálculo dos Fluxos Financeiros e Balanços Totais.

O Anexo X apresenta exemplos de cálculo e os valores utilizados no cálculo dos fluxos financeiros e balanços totais.

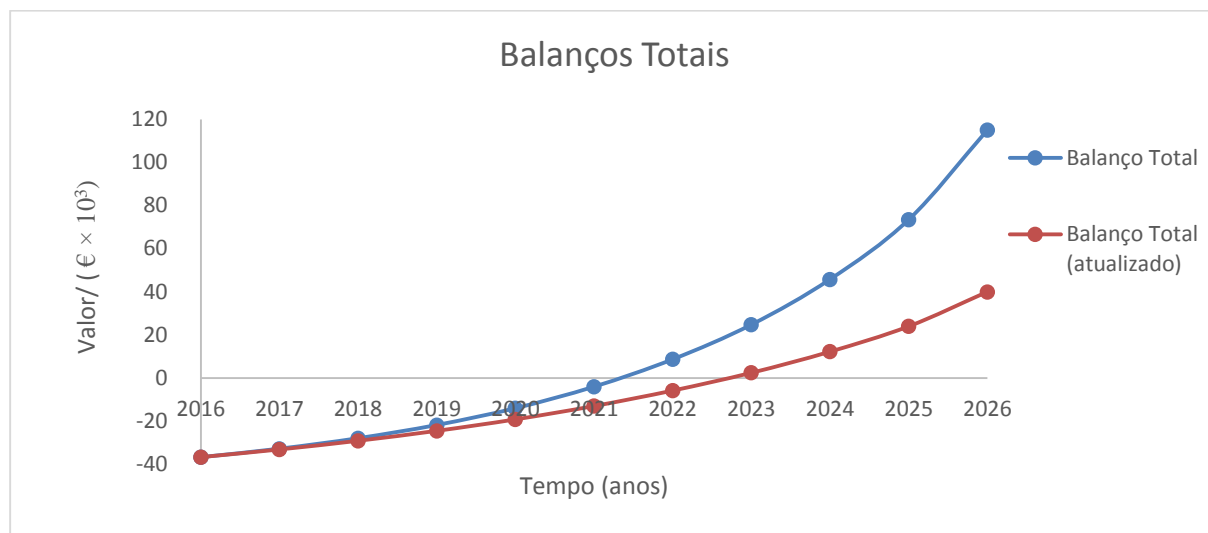


Figura 14- Representação gráfica dos Balanços Totais.

5.3.2 Indicadores de Viabilidade Económica

Foram calculados valores para o *VAL* e *AE* às taxas de 10 % e 15 %. O *TR* foi calculado na sua forma simples, sem aplicar a taxa de interesse, e na sua forma atualizada, na qual foi aplicada a taxa de interesse. Foi também calculado o valor de *TIR*.

Na Tabela 16 apresentam-se os valores obtidos nos cálculos dos indicadores de viabilidade económica.

Tabela 16- Resultados obtidos para os indicadores de viabilidade económica

Indicador	Resultado Obtido
<i>VAL</i> ₁₀	39 855,94 €
<i>VAL</i> ₁₅	20 118,29 €
<i>TIR</i>	23,37 %
<i>AE</i> ₁₀	6 471,29 €
<i>AE</i> ₁₅	4 008,61 €
<i>TR</i> _{simples}	5,37 anos
<i>TR</i> _{atualizado}	6,89 anos

O *VAL* foi calculado para as taxas mínimas de atratividade de 10 % e 15 %, sendo que os

resultados obtidos foram 39 855,94 € e 20 118,29 € respetivamente. Estes valores são superiores a 0 o que permite concluir, segundo este parâmetro, que o projeto é viável. No entanto, a disparidade obtida para os valores de VAL_{10} e VAL_{15} evidencia grande sensibilidade deste método a variações da taxa de mínima de atratividade. Uma vez que a determinação do VAL neste projeto não contabiliza alterações desta taxa ao longo do tempo a sua determinação deverá ser levada a cabo com o maior dos cuidados.

A Anuidade Equivalente (AE) é uma variante do VAL que converte todos os pagamentos e recebimentos num valor anual. Os valores obtidos para a AE_{10} e AE_{15} são de 6 471,29 € e 4 008,61 € respetivamente. Estes resultados, sendo superiores a 0, permitem conferir a viabilidade deste projeto. Uma vez que contabiliza todos os fluxos financeiros e converte-os num valor anual a AE é muito útil na comparação de projetos com diferentes tempos de vida. Assim, este valor deverá ser considerado na comparação deste projeto com outros alternativos. O valor de TIR , calculado foi de 23,38 %. Este indicador representa a taxa de juro mínima que iguala o VAL a 0. O resultado obtido, bastante superior à taxa mínima de atratividade estabelecida de 10 %, indica que a execução deste projeto é viável.

Com um TR_{simples} de 5,37 anos e um $TR_{\text{atualizado}}$ de 6,89 anos pode-se considerar o investimento neste projeto como de longo prazo. No entanto, a análise dos parâmetros anteriormente apresentados revela que este poderá ser bastante atrativo.

6. CONCLUSÕES

A construção e montagem de um laboratório nas instalações da Sovina poderá trazer vantagens tanto ao nível económico-financeiro como da qualidade e segurança alimentar.

O armazenamento de culturas puras de leveduras pelo método de subcultura periódica garante resultados satisfatórios a baixo custo e simplicidade de aplicação. No entanto, tem como principais desvantagens a necessidade de renovação das culturas entre intervalos de tempo reduzidos e o risco de surgirem alterações bioquímicas e morfológicas após sucessivas inoculações.

A propagação de leveduras desde a escala laboratorial até à escala de produção envolve o planeamento atempado das tarefas a realizar e a cooperação entre o pessoal responsável pelo laboratório e pela produção. Embora seja um dos principais fatores motivacionais à realização deste projeto, bem como um dos principais contribuintes dos benefícios financeiros aqui apresentados, a execução desta atividade envolve determinados riscos que deveram ser contabilizados na tomada de decisão. Neste projeto apresentaram-se soluções práticas para a propagação de leveduras, no entanto, sugere-se que os métodos aqui descritos sejam adaptados às características que cada estirpe de levedura apresente.

O armazenamento e recolha de leveduras de fermentações prévias para reutilização, acarreta riscos de contaminação da *yeast slurry* e perda de viabilidade e vitalidade por parte destes seres. Sugere-se que o armazenamento e a recolha de leveduras deverá ser da responsabilidade do departamento de produção e que se utilize a câmara de frio já existente nas instalações da empresa. O laboratório projetado deverá assegurar, mediante a realização de testes microbiológicos, a qualidade das leveduras a serem reutilizadas.

A realização de análises microbiológicas permite assegurar a integridade microbiológica dos espaços e equipamentos da área de produção, das leveduras propagadas no laboratório e das leveduras recolhidas e armazenadas de outras fermentações para reutilização. Este projeto inclui os métodos e respetivos procedimentos e a frequência sugerida para a realização destas tarefas.

Projetou-se a construção e montagem de um laboratório nas instalações da empresa Os Três Cervejeiros, Lda. produtores da marca Sovina. Neste projeto inclui-se um plano para a construção do laboratório que engloba a planta, os materiais, as infraestruturas para as utilidades e instalação de um sistema AVAC. Inclui-se também listagens para os equipamentos, mobiliário e material de laboratório, necessários para a realização das tarefas propostas.

De modo a determinar a viabilidade financeira deste projeto contabilizou-se o investimento inicial e os fluxos financeiros ao longo de um período de 10 anos. A partir destes dados procedeu-se ao cálculo de indicadores de viabilidade que pudessem assistir na tomada de decisão. Os valores obtidos de *VAL*, *TIR*, *AE* indicam que, segundo estes parâmetros, este projeto é viável embora, segundo os valores de *TR*, este investimento seja a longo prazo. Apesar dos resultados positivos, recomenda-se um estudo mais aprofundado do efeito do aumento da produção de cerveja na atividade laboratorial e conseqüentemente na aquisição de mais equipamento e a sua influência nos fluxos financeiros. Recomenda-se, também, a revisão da taxa de atratividade mínima definida no cálculo do *VAL* e *AE*, uma vez que pequenas variações nesta taxa refletem grandes variações nos resultados obtidos para estes dois indicadores. Por outro lado, os custos de construção e aquisição de equipamentos e materiais aqui apresentados foram mensurados segundo preços de tabela não negociados sem aplicação de qualquer desconto. A negociação destes preços poderá reduzir o custo de investimento inicial e tornar este projeto mais atrativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecassis F. & Cabral N. (2000), *Análise Económica e Financeira de Projectos*, Fundação Calouste Gulbenkian, Portugal.
- Allen F. (1994), *The Microbrewery Laboratory Manual- A Practical Guide to Laboratory Techniques and Quality Control Procedures for Small-Scale Brewers, Part 1: Yeast Management, Brewing Techniques*. Consultado em: 13/10/2015, disponível em: <http://morebeer.com/brewingtechniques/library/backissues/issue2.4/allen.html>.
- Andrews B. J. & Gilliland, R. B. (1952), Super-attenuation of Beer: A Study of Three Organisms Capable of Causing Abnormal Attenuations. *Journal of the Institute of Brewing*, 58: 189–196.
- Barney C. M., Kot J. E., Chicoye E. (1990), Culture Medium for Detection of Beer Spoilage Microorganisms, *United States Patent*, Patent Number: 4906573.
- Bond C. (2007), Freeze-Drying of Yeast Cultures, *Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*, UK.
- Boulton C. & Quain D. (2001), *Brewing Yeast and Fermentation*, Blackwell Science Ltd, UK.
- Briggs D., Boulton C., Brooks P., Stevens R. (2004), *Brewing: Science and Practise*, Woodhead Publish Limited, UK.
- Bamford C. M. & Ward E. R. (2014), *The Oxford Handbook of Food Fermentations*, Oxford University Press, USA.
- Camacho A. & Rosa J. T. (1989), Manual para a preparação de Estudos de Viabilidade Industrial, *Publicações D. Quixote*, Portugal.
- Gibson B.R., Prescott K.A., Smart K.A. (2008), Petite Mutation in Aged and Oxidatively Stressed Ale and Lager Brewing Yeast, *Letters in Applied Microbiology*, 46: 636–642.
- Goldammer T. (2008), *The Handbook of Brewing- The Complete Book to Brewing Beer*, Apex Publishers, USA.
- Goldman E. & Green E. L. (2009), *Practical Handbook of Microbiology*, Taylor and Francis Group, USA.
- Grigogova R. & Norris G. R. (1990), *Methods in Microbiology – Volume 22, Techniques in Microbial Ecology*, Academic Press Limited, UK.
- Gumus T., Arici M., Demirci M. (2004). A Survey of Barley, Malt and Beer Contamination with Ochratoxin in Turkey, *Journal of the Institute of Brewing*, 110: 146–149.
- Harvey A. R., Champe C. P., Fischer D. B. (2007), *Microbiology – 2nd Edition*, Lippincott's Illustrated Reviews, USA.
- Hornsey S. I. (2013). *Brewing*, Royal Society of Chemistry, UK.
- Hornsey S. I. (2013). *A History of Beer and Brewing*, Royal Society of Chemistry, UK.
- Kiefer M. D. (2001), Brewing a Legacy of Ancient Times, Today's Chemist at Work. Consultado em: 14/09/2015, disponível em: <http://pubs.acs.org/subscribe/archive/tcaw/10/i12/html/12chemchron.html>.
- Kirsop B. (1955), Maintenance of Yeasts by Freeze-drying. *Journal of the Institute of Brewing*, 61: 466–471.
- Kirsop B. (1974), The Stability of Biochemical, Morphological and Brewing Properties of Yeast Cultures Maintained by Subculturing and Freeze-drying. *Journal of the Institute of Brewing*, 80: 565–570.
- Kučec M., Baszczyński M., Lehnert R., Mota A., Teixeira J. A., Brányik T. (2009), Flow Cytometry for Age Assessment of a Yeast Population and its Application in Beer Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 115: 253–258.
- Krogh P., Hald B., Gjertsen P., Myken F. (1974), Fate of Ochratoxin A and Citrinin During Malting and Brewing Experiments, *Institute of Hygiene and Microbiology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, and Research Laboratory, Carlsberg Breweries, United Breweries*, Denmark.
- Lodolo E. J., Kock J. L.F., Axcell B. C., Brooks M. (2008), The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the Main Character in Beer Brewing, *FEMS Yeast Research*, 8: 1018–1036.
- Manzano M., Giusto C., Bartolomeoli I., Buiatti S., Comi G. (2005), Microbiological Analyses of Dry and Slurry

- Yeasts for Brewing, *Journal of the Institute of Brewing*, 111: 203–208.
- Marques A. (2000). Conceção e Análise de Projectos de Investimento, *Edições Sílabo*, Portugal.
- Meussdoerffer F. G. (2009), A Comprehensive History of Beer Brewing, Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Germany.
- Morakile G., Pretorius E., Pohl H., Kock F. (2002), Comparison of Preservation Methods for the Maintenance of Brewing Yeast, *South African Journal of Science*, 98: 23-24.
- Moreira J. A. C., (1999), Análise Financeira de Empresas da teoria à prática, *Associação da Bolsa de Derivados do Porto*, Portugal.
- Ogden K. & Tubb, R. S. (1985), Inhibition of Beer-spoilage Lactic Acid Bacteria by Nisin. *Journal of the Institute of Brewing*, 91: 390–392.
- Palmer J. J. (1999). How to Brew, *Brewers Publications*, USA.
- Paquete M. (2013), A Cerveja no Mundo e em Portugal, História, Hábitos de Bebida e Gastronomia, *Colares Editora*, Portugal.
- Pham T., Wimalasena T., Box W. G., Koivuranta K., Storgårds E., Smart K.A., Gibson B.R. (2011), Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery ‘Wild’ Yeast Contaminants, *Journal of the Institute of Brewing*, 117: 556–568.
- Powell C. D., Quain D. E., Smart K. A. (2003), The Impact of Brewing Yeast Cell Age on Fermentation Performance, Attenuation and Flocculation, *FEMS Yeast Research*, 3: 149–157.
- Priest G. F., Stewart G. G. (2006), The Handbook of Brewing, *Taylor and Francis Group*, USA.
- Roldão V. S., (2005). Gestão de Projectos, Abordagem Instrumental ao Planeamento, Organização e Controlo, *Edições Monitor*, Portugal.
- Silva E. S. (2012), Gestão Financeira, Análise de Fluxos Financeiros. Edições Vida Económica, *Editorial SA*, Portugal.
- Sinogas C., Alho L., Brito I. (2003), Microbiologia- Textos de Apoio e Manual Prático, *Universidade de Évora- Departamento de Biologia*.
- Spedding G. (2000), Microbiological Medium for Bateria and Wild Yeast Detection in the Brewery, Brewing and Distilling Analytical Services, *200 Seminar*.
- Sumbali G., Mehrotra R. S. (2009), Principles of Microbiology, *Tata McGraw-Hill Education Private Limited*, India.
- Suzuki K. (2011), 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117: 131–155.
- Suzuki K., Iijima K., Sakamoto K., Sami M., Yamashita H. (2006), A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria, *Journal of the Institute of Brewing*, 112: 173–191.
- Sakamoto K, Konnings N. W. (2003), Beer spoilage bacteria and hop resistance, *International Journal of Food Microbiology*, 89: 105–124.
- Vriesekoop F., Krahl M., Hucker B. and Menz G. (2012), 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, 118: 335–345.
- White C. & Zainasheff J. (2012). Yeast -The Practical Guide to Beer Fermentation, *Brewers Publication*, USA.
- Wolf-Hall E. C., Schwarz B. P. (2002), Mycotoxins and Fermentation, Advances in Experimental Medicine and Biology, *Springer US*, USA.
- Wynants J. (1962), Preservation of Yeast Cultures by Lyophilisation, *Journal of the Institute of Brewing*, 68: 350–354.
- Van Nierop S. N. E., Rautenbach M., Axcell B. C. (2006), The Impact of Microorganisms on Barley and Malt Quality- A Review, Department of Biochemistry, *University of Stellenbosch*, South Africa.
- Vaughan A., O'Sullivan T., Van Sinderen D. (2005), Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review, *Journal of the Institute of Brewing*, 111: 355–371.

Verstrepen K. J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delveux F. R. (2003), Yeast flocculation: what brewers should know, *Applied Microbiology e Biotechnology*, 61, 197-205.

Young & Ernest (1994), Manual do Gestor, Guia prático para uma gestão de sucesso. The Manager's Handbook, *Edições Verbo*, Portugal.

ANEXO I – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DE CULTURAS PURAS DE VÁRIAS ESTIRPES DE LEVEDURA

Preparação do meio de cultura para armazenamento

Material:

- Erlenmeyer de 1 L;
- Placa de aquecimento;
- Filtro;
- Agarose em pó;
- Vareta.

Procedimento:

- Preparar 1 L de mosto 10 °P sem lúpulos, num Erlenmeyer;
- Ferver o mosto até que ocorra a coagulação de proteínas no topo do recipiente (*hot break*);
- Deixar arrefecer e filtrar o material coagulado;
- Pesar 15 g de pó de agarose e borrifar na superfície do mosto. Esperar alguns minutos permitindo a hidratação do pó;
- Mexer ou agitar para misturar. De seguida aquecer a mistura até que o pó de agarose se dissolva totalmente e ferver por alguns minutos;
- Deixar a mistura arrefecer até uma temperatura que permita o manuseamento, mas não inferior a 44 °C.

Preparação de tubos de ensaio e caixas de Petri com o meio de cultura

Material:

- Pipetas estéreis;
- Tubos de ensaio com rolha;
- Suporte para tubos de ensaio;
- Folha de alumínio;
- Algodão;
- Autoclave;
- Caixas de Petri.

Procedimento:

- Pipetar 5 mL de meio de cultura nos tubos de ensaio e tapar deixando a tampa solta. Tapar o Erlenmeyer com uma rolha de algodão e folha de alumínio;

- Colocar os tubos de ensaio e o Erlenmeyer a esterilizar na autoclave a 121 °C durante 15 min a 20 min;
- Retirar os tubos de ensaio da autoclave. Pousar o suporte com um objeto por baixo de um dos lados de forma a criar um declive de 20° a 30°. Deixar arrefecer nesta posição até o meio de cultura solidificar. Fechar as tampas, identificar o meio de cultura e a data de elaboração e guardar a 4 °C;
- Retirar o Erlenmeyer da autoclave e deixar arrefecer até uma temperatura que permita manuseamento;
- Desembrulhar as caixas de Petri estéreis e identifica-las com o nome do meio de cultura e data de elaboração;
- Verter 25 mL a 35 mL de meio de cultura nas caixas de Petri em condições de assepsia;
- Deixar solidificar, inverter e armazenar a 4 °C.

Inoculação de leveduras em tubos de ensaio

Material:

- Bico de Bunsen;
- Ansa de inoculação.

Procedimento:

- Acender o bico de Bunsen e trabalhar sempre segundo as boas práticas de assépsia;
- Passar uma ansa de inoculação pela chama;
- Abrir a fonte de levedura (*e.g.* caixa de Petri);
- Tocar no meio de cultura com ansa para arrefecer e de seguida retirar um pequena quantidade de levedura;
- Abrir o tubo de ensaio e esfregar a ponta da ansa de inoculação numa linha serpenteada no meio da superfície do gel;
- Passar a abertura do tubo de ensaio e tapar deixando a tampa solta;
- Colocar na estufa a 22 °C, após 2 d a 3 d deverão ser visíveis colónias e o tubo está pronto para armazenamento.

Inoculação de leveduras em caixas de Petri

Material:

- Bico de Bunsen;
- Ansa de inoculação;

- Incubadora;
- *Parafilm*.

Procedimento:

- Acender o bico de Bunsen e trabalhar sempre segundo as boas práticas de assépsia;
- Colocar a caixa de Petri junto da chama, ainda com a tampa, com a superfície do gel de agarose apontada para baixo;
- Passar uma ansa de inoculação pela chama;
- Mantendo a ansa de inoculação perto da chama, abrir o tubo de ensaio ou outra fonte de levedura e passar a abertura pela chama;
- Inserir a ansa no tubo de ensaio e arrefecer pousando brevemente no meio. Passar com a ansa levemente numa colónia de forma retirar um pequeno número de células. Passar a abertura do tubo novamente pela chama e fechar;
- Pegar na caixa de Petri e, junto a chama, vira-la com a superfície do meio para cima e abri-la.
- Passar com a ansa na superfície do meio de cultura fazendo riscos para frente e para trás numa secção. Rodar a caixa 90° e fazer a ponta da ansa de inoculação passar pelos riscos feitos anteriormente riscando uma nova secção. Voltar a rodar a caixa de Petri e repetir para uma nova secção. O objetivo passa por, primeiro depositar as células no meio de cultura e depois, espalhar cada vez menos células por cada secção. Pretende-se espalhar uma pequena quantidade de células, invisível a olho nu, pela superfície do meio de cultura. A Figura I.1 permite uma melhor compreensão deste procedimento;
- Colocar a caixa na incubadora a 22 °C com a superfície do meio virada para baixo. Ao fim de 2 d a 3 d deverá observar-se o aparecimento de colónias com maior densidade na primeira secção riscada. No caso de não se obter colónias isoladas deverá se proceder a inoculação de uma nova caixa de Petri. Assim que haja crescimento suficiente selar a caixa de Petri com *parafilm* e guardar em ambiente refrigerado.

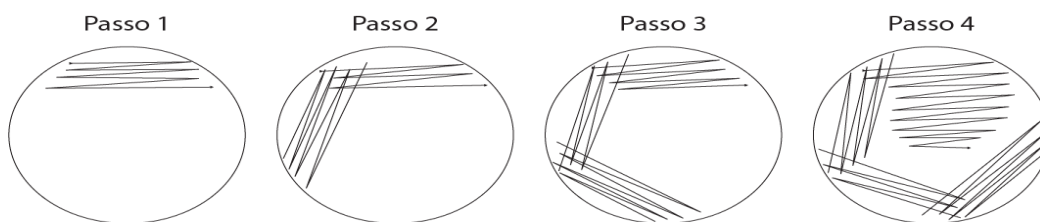


Figura I.1- Inoculação de uma caixa de Petri (adaptado de White & Zainasheff, 2012).

ANEXO II – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA A PROPAGAÇÃO DE LEVEDURAS

Os procedimentos descritos neste manual não são restritivos. Pelo contrário, é esperado que após o início de funcionamento do laboratório estes sejam testados e ajustados de forma a melhor se adaptarem as especificidades que cada estirpe de levedura apresente.

Escolha de colónias

Para uma melhor visualização das colónias deverá se trabalhar com uma cultura em caixa de Petri. Esta cultura deverá ser previamente preparada a partir de uma cultura-mãe. Culturas que apresentem sinais de contaminação deverão ser descartadas. Os sinais mais comuns de contaminação são a presença de bolor e de colónias com diferentes formas, cores ou brilho.

Os fatores a ter em conta para a escolha de colónias são:

- Tamanho das colónias: colónias muito pequenas poderão ser uma indicação de mutações ao nível do sistema respiratório das células ou de privação de nutrientes. Colónias muito grandes podem ser o resultado da fusão de duas colónias ou de uma colónia que se sobrepõe a outra menos saudável. As células de colónias demasiado grandes podem não ser saudáveis por consumirem todos os nutrientes à sua volta e esgotarem todos os seus recursos.
- Distribuição das colónias: deverão ser escolhidas colónias que se encontrem visivelmente isoladas de outras. Colónias que se encontrem demasiado próximas ou em contato poderão entrar em competição pelos recursos circundantes o que resulta em células menos saudáveis. Assim, tendo em conta os fatores mencionados anteriormente deverão ser escolhidas entre 8 a 12 colónias de forma a garantir a quantidade inicial de células ótima para a dar início à fase de propagação.

Transferência de colónias da caixa de Petri para a propagação

Material:

- Balão volumétrico de 25 mL;
- Mosto esterilizado com 5 °P;
- Bico de Bunsen
- Ansa de inoculação;
- Agitador magnético.

Procedimento:

- Preparar um balão volumétrico de 25 mL com 10 mL de mosto esterilizado com 5 °P;
- Acender o bico de Bunsen e trabalhar sempre segundo as boas práticas de assépsia;
- Identificar as colónias a recolher;
- Passar a ansa de inoculação pela chama;
- Rapidamente e sempre perto da chama, abrir a caixa de Petri e pousar a ansa sobre o meio de cultura para arrefecer. Cuidadosamente recolher uma colónia inteira com a ansa evitando tocar noutras colónias;
- Pousar a caixa de Petri e pegar no balão volumétrico. Tirar a rolha do balão e passar a abertura pela chama;
- Mergulhar a ansa com a colonia recolhida no meio de cultura líquido dentro do frasco;
- Repetir o processo transferindo de 8 a 12 colónias;
- Tapar o balão volumétrico deixando a rolha solta;
- Colocar o balão volumétrico no agitador magnético a temperatura de 22 °C durante um período de 24 h a 48 h.

Propagação sucessiva da levedura até ao volume pretendido

Partindo do primeiro passo de propagação (10 mL) deverão se realizar propagações sucessivas com aumento do volume de 6 a 10 vezes. As propagações com volumes superiores ou iguais a 1 L deverão ser feitas com mosto com 10 °P.

A transferência de uma cultura para um volume maior deverá ser realizada segundo o seguinte procedimento:

- Acender o bico de Bunsen e trabalhar sempre segundo as boas práticas de assépsia;
- Junto a chama abrir o recipiente da última propagação e passar a abertura pela chama;
- Novamente junto a chama, abrir o recipiente da próxima propagação e passar a abertura pela chama;
- Transferir o conteúdo do primeiro recipiente para o segundo de maior volume;
- Passar a abertura novamente pela chama e tapar deixando a rolha solta;
- Colocar o recipiente no agitador magnético a 22 °C por um período de 24 h a 48 h.

ANEXO III – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA A CONTAGEM DE CÉLULAS

Após a observação da câmara de contagem se se observar uma distribuição uniforme de células ao longo desta poderá se utilizar o método de contagem curto, caso contrário terá de se recomençar o processo ou utilizar o método de contagem longo.

Como protocolo de contagem, não contar as células que se encontrem sobre as linhas delimitantes do reticulado de cima e da esquerda do quadrado que estamos a contar. Contar as células que se encontrem sobre linhas delimitantes do reticulado de baixo e da direita do quadrado que estamos a contar. Quanto às células que se encontrem em gemulação contar as células-mãe e as células filhas apenas se estas tiverem pelo menos metade do tamanho das células-mãe.

Após a contagem, para obter a concentração de células é necessário recorrer à Equação 4 ou à Equação 5:

– Para o método de contagem curto:

$$\frac{C_{\text{Cel}}}{\text{mL}^{-1}} = N \times 5 \times fd \times V_{\text{Câmara}} \quad (\text{E.q. 4})$$

– Para o método de contagem longo:

$$\frac{C_{\text{Cel}}}{\text{mL}^{-1}} = N \times fd \times V_{\text{Câmara}} \quad (\text{E.q. 5})$$

A viabilidade pode ser determinada a partir da Equação 6:

$$\frac{Viab}{\%} = \frac{N_{\text{celmortas}}}{N_{\text{total}}} \times 100 \quad (\text{E.q. 6})$$

Com:

N – nº. de células contadas;

fd – fator de diluição;

$V_{\text{Câmara}}$ – volume da câmara.

Diluições em série

Serão realizadas diluições sucessivas de 1 para 10, sendo que o número de tubos de ensaio utilizados dependem do fator de diluição que se pretende obter (para uma diluição 1 para 10 necessitamos de 1 tubo de ensaio, para uma diluição de 1 para 10^2 de 2 tubos de ensaio, e assim sucessivamente)

Material:

- Tubos de ensaio;
- Pipetas.

Procedimento:

- Colocar os tubos de ensaio, devidamente identificados com a taxa de diluição de cada um, num suporte por ordem decrescente de fator diluição;
- Adicionar 9 mL de água a cada um dos tubos de ensaio;
- Pipetar 1 mL da amostra no primeiro tubo de ensaio e agitar bem de forma a homogeneizar bem a mistura. Obtém-se assim a primeira diluição de 1 para 10;
- Pipetar 1 mL da primeira diluição no segundo tubo de ensaio e agitar bem a mistura. Obtém-se assim a segunda diluição de 1 para 10^2 ;
- Repetir o processo até a diluição pretendida.

Contagem

Material:

- Hemocitómetro;
- Microscópio;
- Laminas;
- Lamelas.

Procedimento:

- Colocar o hemocitómetro no microscópio, observar a câmara de contagem, centrar o reticulado e averiguar a limpeza da câmara;
- Colocar a lamela sobre a câmara e com uma pipeta de Pasteur preencher por capilaridade o espaço da câmara;
- Observar a câmara no microscópio e focar a imagem de forma a obter uma imagem nítida.
- Para o método de contagem curto contar apenas 5 quadrados, numerados na Figura III.1, de um total de 25;
- Para o método de contagem longo contar as células de todos os 25 quadrados.

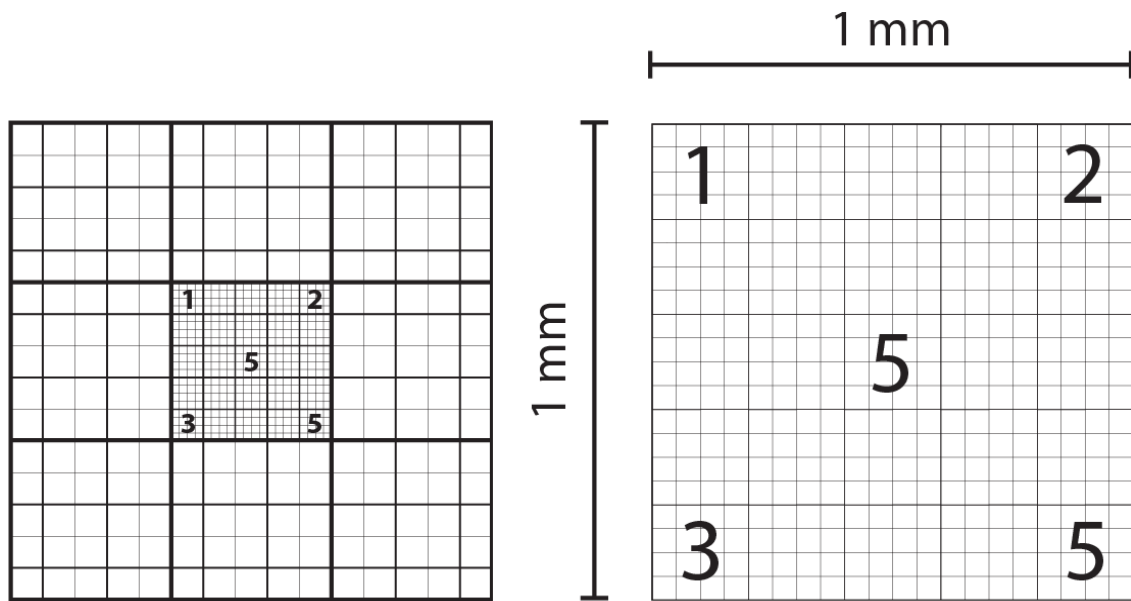


Figura III. 1- Taxa de depreciação, Valor Residual, Investimento inicial e Amortizações no Ano 1

Viabilidade

Material:

- Pipeta;
- Azul-de-metileno.

Procedimento:

- Adicionar 1 mL de solução de azul-de-metileno na amostra ou, caso se tenha efetuado, na última diluição;
- Agitar bem de forma a homogeneizar a solução;
- Durante a contagem de células contar também o número de células mortas.

ANEXO IV – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O ISOLAMENTO DE COLÓNIAS EM MEIO SÓLIDO

Sementeira por espalhamento

Material:

- Amostra a testar, devidamente diluída;
- Caixas de Petri com meio de cultura específico;
- Pipeta esterilizada;
- Espalhador de células;
- Bico de Bunsen;
- Solução de 70 % isopropanol num recipiente apropriado para mergulhar o espalhador de células;
- Incubadora.

Procedimento:

- Pipetar 0,1 mL de amostra na superfície do meio de cultura;
- Mergulhar o espalhador de células na solução de isopropanol e de seguida passar brevemente pela chama para arder o álcool. Deixar o espalhador arrefecer nas imediações da chama;
- Espalhar a amostra sobre a superfície do agar com o espalhador. O espalhamento deverá ser feito com movimentos repetidos para a frente e para trás, rodando a caixa para espalhar a amostra sobre toda a superfície do meio;
- Tapar a caixa de Petri e permitir a absorção do líquido por alguns minutos;
- Colocar a caixa de Petri na incubadora a 30 °C durante 3 d.

Sementeira por riscado

Material:

- Amostra a testar;
- Ansa de inoculação;
- Caixas de Petri com meio de cultura específico;
- Bico de Bunsen;
- Incubadora.

Procedimento:

- Asepticamente recolher a amostra mergulhando a ponta da ansa nesta;
- Pegar na caixa de Petri e, junto a chama, virá-la com a superfície do meio para cima e abri-la.

- Passar com a ansa na superfície do meio de cultura fazendo riscos para frente e para trás numa secção. Rodar a caixa 90° e fazer a ponta da ansa de inoculação passar pelos riscos feitos anteriormente riscando uma nova secção. Voltar a rodar a caixa de Petri e repetir para uma nova secção. O objetivo passa por, primeiro depositar as células no meio de cultura e, depois, espalhar cada vez menos células por cada secção. Pretende-se espalhar uma pequena quantidade de células, invisível a olho nu, pela superfície do meio de cultura;
- Tapar a caixa de Petri e incubar a 30 °C durante 3 d.

Sementeira por incorporação

Material:

- Caixas de Petri esterilizadas;
- Meio de cultura líquido (45 °C a 50 °C);
- Pipeta 10 mL;
- Incubadora.

Procedimento:

- Preparar o meio de cultura específico, num Erlenmeyer, e assegurar que este se encontra à temperatura correta.
- Pipetar a amostra para o Erlenmeyer e agitar bem de forma a misturar com meio de cultura.
- Verter o conteúdo do Erlenmeyer para as caixas de Petri.
- Deixar o meio de cultura solidificar e inverter as caixas de Petri.
- Colocar as caixas de Petri na incubadora a 30 °C por 3 d.

Filtração em membrana

Material:

- Aparelho de filtração membranar;
- Bomba de vácuo;
- Membrana (47 mm de diâmetro; diâmetro dos poros: 0,45 µm);
- Caixas de Petri;
- Espátula de metal;
- Incubadora.

Procedimento:

- Retirar as caixas de Petri (previamente preparadas com o meio de cultura próprio para o teste a realizar) do frigorífico e deixar aquecer até à temperatura ambiente;

- Montar o aparelho de filtração perto do bico de Bunsen;
- Colocar a membrana no topo da base do filtro, verter a amostra no recipiente apropriado e ligar a bomba de vácuo permitindo que todo o líquido passe pelo filtro;
- Desligar a bomba e libertar o vácuo. Remover a membrana do filtro com a espátula esterilizada e colocá-la sobre o meio de cultura na caixa de Petri;
- Inverter a caixa de Petri e colocar na incubadora. Após 2 d a 3 d deverá ter ocorrido crescimento suficiente para a contagem de colónias.

Sementeira por exposição

Material:

- Caixas de Petri com meio de cultura WNL;
- Incubadora.

Procedimento:

- Colocar 2 caixas de Petri, uma de cada meio de cultura, nos locais a testar;
- Abrir as caixas e deixá-las expostas por um período de 60 min;
- Destacar 1 caixa de Petri selada o meio WLN para fins de controlo;
- Recolher as caixas, selá-las e incubar a 30 °C durante 3 d.

Colheita por cotonete estéril

Material:

- Caixas de Petri com meio de cultura específico devidamente identificadas;
- Cotonetes estéreis;
- Incubadora.

Procedimento:

- Pegar num cotonete estéril e esfregar numa das placas para amostra de controlo;
- Pegar noutro cotonete estéril e passar pela superfície a testar;
- Esfregar o cotonete na superfície do meio de cultura. Com o mesmo cotonete pode-se inocular várias caixas de Petri com diferentes meios seletivos;
- Incubar a 30 °C por 3 d.

ANEXO V – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA TESTES MICROBIOLÓGICOS

Meio de cultura UBA

Material:

- Meio de cultura UBA;
- Água destilada;
- Cerveja;
- Cicloheximidina;
- Autoclave;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Algodão.

Procedimento:

- Pesar 5,5 g de UBA no Erlenmeyer.
- Adicionar 75 mL de água destilada [adicionar também cicloheximidina se se pretender inibir o crescimento de fungos (1 mg/L)]. Tapar com algodão e ferver por 1 min com agitação para dissolver.
- Com o meio ainda quente, adicionar 25 mL de cerveja.
- Autoclavar por 10 min a 121 °C.
- Após autoclavar inocular o meio a pelo método de sementeira por incorporação.

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 a incubação);
- Meio de cultura LMDA;
- Cicloheximidina;
- Placa de aquecimento;
- Água destilada;
- Autoclave;
- Pipetas estéreis;
- 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 % 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 CaCO₃ 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 coloca-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 d a 30 °C.

Meio de cultura MacConkey

Material:

- Meio de cultura MacConkey;
- Água destilada;
- Autoclave;
- Caixas de Petri estéreis;
- Erlenmeyer de 500 mL;
- Algodão;
- Incubadora;
- Aparelho de filtração membranar;
- Bomba de vácuo;
- Membrana (47 mm de diâmetro; diâmetro dos poros: 0,45 µm);
- Espátula de metal.

Procedimento:

- Pesar 5 g de meio MacConkey no Erlenmeyer;
- Juntar 100 mL de água destilada. Tapar o Erlenmeyer com o algodão e ferver por 1 min agitando bem a solução para dissolver;
- Autoclavar por 15 min a 121 °C;
- Seguir o processo de filtração membranar para 100 mL descrito anteriormente;
- Inverter as placas e incubar por 3 d a 30 °C.

Método de coloração de Gram

Material:

- Lâmina;
- Pinça;
- Bico de Bunsen;

- Ansa de inoculação;
- Corante cristal violeta;
- Iodina de Gram;
- Etanol 95 %;
- Safranina;
- Água destilada;
- Microscópio.

Procedimento:

- Pegar na lâmina com a pinça e passar levemente pela chama;
- Passar a ansa de inoculação pela chama e retirar uma gota de amostra e vertê-la na superfície da lâmina;
- Esfregar a gota de amostra com movimentos de rotação formando um esfreganço circular ou oval;
- Adicionar 5 gotas de cristal violeta e esperar 60 s;
- Enxaguar com água destilada o excesso de corante;
- Verter 5 gotas de iodina de Gram e esperar 60 s;
- Enxaguar o excesso de iodina;
- Descolorar vertendo gotas de etanol até a solução ficar transparente;
- Enxaguar com água;
- Verter 5 gotas de safranina (corante de contraste) e esperar 30 s;
- Enxaguar o corante de contraste;
- Verter o excesso de água e deixar secar;
- Observar ao microscópio.

ANEXO VI – PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O CONTROLO DE QUALIDADE DE LEVEDURAS

Meio de cultura WLN

Material:

- Amostra de leveduras;
- Meio de cultura WLN;
- Pipetas estéreis;
- Caixas de Petri com meio WLN;
- Espalhador de células.

Procedimento:

- Inocular 0,1 mL de amostra segundo o procedimento de Sementeira por Espalhamento.
- Incubar durante 2 d a 3 d a 27 °C.
- Inspeccionar as colónias e determinar o número de estirpes presentes na cultura (número de cores diferentes apresentadas pelas colónias) e calcular as quantidades relativas.

Teste de mutações respiratórias

Material:

- Caixas de Petri com meio de cultura à base de malte;
- Agarose;
- 2 Frascos de 500 mL com rolha esterilizados;
- Água destilada;
- Cloreto de trifeniltetrazólio (CTT);
- NaH₂PO₃, anidro;
- Na₂HPO₃, anidro;
- Incubadora;
- Autoclave.

Procedimento:

- Diluir a amostra de leveduras para uma concentração celular de 500 /mL a 1000/ mL;
- Verter 0,1 mL da solução de leveduras para as caixas de Petri com o meio de cultura;
- Incubar a 30 °C por um período de 2 d a 3 d;
- Preparar uma solução com 1,26 g de NaH₂PO₃, 1,16 g de Na₂HPO₃ e 3 g de agarose. Juntar a 100 mL de água, agitar bem e tapar com a rolha desenroscada;

- Preparar uma solução com 0,2 g de CTT. Juntar a 100 mL de água, agitar bem e tapar com a rolha desenroscada;
- Autoclavar cada uma das soluções a 121 °C por 15 min. Após a autoclavagem, assim que as soluções atinjam os 55 °C, misturá-las;
- Sobrepor a superfície do meio de cultura com a solução;
- Incubar por 1 h a 3 h a 27 °C.;
- Proceder à contagem imediatamente de forma a evitar a oxidação do CTT. Colónias de cor vermelha ou rosa não apresentam mutações respiratórias, colónias que cuja cor permanece inalterada possuem mutações respiratórias. A percentagem de células não coradas não deverá ser superior a 1 %.

Teste de poder de acidificação

Material:

- Medidor de pH
- Água desionizada;
- Tubos cónicos de centrífuga;
- Barra magnética de agitação;
- Solução 200 g/L de glucose;
- Agitador magnético.

Procedimento:

- Ajustar a água desionizada para 6,5 pH;
- Verter 15 mL de água desionizada para o tubo cónico com a barra magnética.
- Agitar por 5 min no agitador magnético;
- Após os 5 min medir o pH da água (pH₀) e adicionar 5 mL de solução de levedura (concentração celular de $1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$);
- Agitar por 10 min e medir o pH (pH₁);
- Adicionar 10 mL de solução de glucose e agitar por 10 min;
- Medir o valor de pH final (pH₂). Calcular a diferença entre pH₀ e pH₂ para obter o valor de poder de acidificação. Repetir o processo e calcular a média dos resultados.

ANEXO VII – DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO AVAC

Laboratório

Descrição do equipamento a instalar:

- 1 Equipamento de marca Daikin modelo FTXZ25N, equipado com comando por infravermelhos, com 2,5 kW de potência de arrefecimento, com 3,6 kW de potência de aquecimento e com etiqueta energética A+++;
- 1 Caixa de ventilação de marca Troia, modelo Cubus DD146-355 com aproximadamente 500 m³/h de caudal;
- Condução em tubo *spiro* de 200 mm – aproximadamente 10 m;
- Plenos e grelhas com registo de caudal para entradas e saídas de ar;
- Acessórios de montagem e fixação dos materiais referidos;
- Módulo de filtragem C4 (M5 + F7).

Escritório

Descrição do equipamento a instalar:

- 1 Equipamento de ar condicionado Fujitsu modelo ASY25UiLLCC, equipado com bomba de calor, microprocessador e comando à distância sem fios, com capacidade de arrefecimento de 2,5 kW e etiqueta energética A++, capacidade de aquecimento de 3,2 kW e etiqueta energética A+;
- 1 Caixa de ventilação de marca Troia, modelo CUBUS DD146-195 com motor de 4 velocidades e caudal de 250 m³/h a 700 m³/h;
- Condução em tubo *spiro* de 200 mm – aproximadamente 10 m;
- Plenos e grelhas com registo de caudal para saídas e entradas de ar;
- Acessórios de montagem e fixação dos equipamentos referidos.

ANEXO VIII – ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS DO MOBILIÁRIO DE LABORATÓRIO

Móvel Sobre Rodapé

Caraterísticas diferenciais:

- Móveis de boa resistência química, de fácil limpeza e desinfecção e elevada resistência físico-mecânica e estabilidade dimensional;
- Construídos em material não poroso e com boa resistência ao calor húmido, às manchas, ao vapor de água, aos riscos, ao desgaste e ação de detergentes;
- Prateleiras interiores construídas no mesmo material do corpo e reguláveis em altura devido a um sistema de fixação oculto;
- Prateleiras com capacidade de carga vertical mínima de 20 kg;
- Gavetas e portas de grande robustez, construídas com componentes testados e certificados;
- Gavetas de movimento bastante suave, mesmo quando carregadas;
- Dobradiças testadas e certificadas, com capacidade de suportarem continuamente cargas verticais elevadas e grande resistência à fadiga;
- Dobradiças inteiramente metálicas, com acabamento niquelado e fecho automático (mola), *design* ergonómico e elegante, com uma face frontal visível com apenas 3 mm de espessura, contribuindo para uma integração estética bastante equilibrada;
- Ângulo de abertura amplo, potenciando uma grande otimização no uso e manutenção;
- Puxador do “asa” em aço níquel satinado com arestas interiores boleadas, o que permite um manuseamento fácil, ergonómico e seguro.

Componentes e Materiais:

- Corpo e frente dos móveis construídos em placa de aglomerado de 19 mm de espessura, com revestimento melamínico e acabamento do tipo *Topface* de 120 g/cm² para a cor branca;
- Frentes dos móveis orlados com orla de PVC com 2 mm de espessura, da mesma cor do corpo;
- Corpo dos móveis orlados com orla de PVC com 0,4 mm de espessura, da mesma cor do corpo;
- Rodapés construídos em estratificado de resinas fenólicas;
- Dobradiças com ângulo de abertura de 270° e ajuste em altura e função de 2 mm;
- Puxadores com distância entre furos de 128 mm.

Móveis desenvolvidos e testados de acordo com as seguintes normas:

- EN 14056 – Mobiliário de laboratório- recomendações de *design* e instalação;

- EN 12727 – Mobiliário de laboratório. Unidades de armazenamento para laboratório. Requisitos e métodos de teste;
- Processo de produção enquadrado numa política ambiental integrada, possuindo certificação ambiental de acordo com as normativas FSC e PEFC;
- Material dos rodapés com conformidade FSC e PEFC (com opção de certificação) e com as diretivas CE;
- Classe de emissão de formaldeído E1 e classe de reação ao fogo D- s2,d0 (EN13986);
- DIN EN 15570, DIN EN 14749 e DIN EN 14074.

Móveis Superiores

Caraterísticas diferenciais:

- Móveis de boa resistência química, de fácil limpeza e desinfeção e elevada resistência físico-mecânica e estabilidade dimensional;
- Construídos em material não poroso e com boa resistência ao calor húmido, às manchas, ao vapor de água, aos riscos, ao desgaste e ação de detergentes;
- Tipologias disponíveis com e sem portas, consoante as necessidades do cliente;
- Sistema de fixação e afinação dos móveis oculto que permite eliminar os elementos de afinação salientes, não interferindo com as pastas ou *dossiers*;
- Prateleiras interiores construídas no mesmo material do corpo e reguláveis em altura devido a um sistema de fixação oculto;
- Prateleiras com capacidade de carga vertical mínima de 20 kg;
- Portas de grande robustez, construídas com componentes testados e certificados;
- Dobradiças testadas e certificadas, com capacidade de suportarem continuamente cargas verticais elevadas e grande resistência à fadiga;
- Puxador do “asa” em aço níquel satinado com arestas interiores boleadas, o que permite um manuseamento fácil, ergonómico e seguro;
- Permitem a integração de iluminação embutida na face inferior do móvel, para uma maior iluminação da área de trabalho.

Componentes e Materiais:

- Corpo e frente dos móveis e frentes de portas e gavetas construídos em placa de aglomerado de 19 mm de espessura, com revestimento melamínico e acabamento do tipo “*Topface*” de 120 g/cm² para a cor branca;
- Frentes dos móveis orlados com orla de PVC com 2 mm de espessura, da mesma cor do

corpo;

– Corpo dos móveis orlados com orla de PVC com 0,4 mm de espessura, da mesma cor do corpo.

Móveis desenvolvidos e testados de acordo com as seguintes normas:

– EN 14056 – Mobiliário de laboratório- recomendações de *design* e instalação;

– EN 12727 – Mobiliário de laboratório. Unidades de armazenamento para laboratório.

Requisitos e métodos de teste;

– Processo de produção enquadrado numa política ambiental integrada, possuindo certificação ambiental de acordo com as normativas FSC e PEFC;

– Material com conformidade FSC e PEFC (com opção de certificação) e com as diretivas CE;

– Classe de emissão de formaldeído E1 e classe de reação ao fogo D- s2,d0 (EN13986).

Superfície de Trabalho em Estratificado de Resinas Fenólicas – LAB *TopResist*

Caraterísticas diferenciais:

– Superfície de trabalho em laminado de alta pressão (HLP) com elevado desempenho mecânico e químico, especificamente desenvolvida para laboratórios;

– Possui um tratamento por descarga de eletrões, aplicado na superfície que lhe confere caraterísticas excecionais de resistência química.

– Elevada robustez e resistência a arranhões, impacto e abrasões e produtos químicos, tornando-o uma solução ideal e duradoura para os diferentes trabalhos laboratoriais;

– Material higiénico e antiestático, com uma superfície macia e sem poros, impermeável a bactérias, fungos e outros microrganismos, possuindo ainda uma grande facilidade de limpeza e descontaminação;

– É resistente ao calor até 180 °C, bem como aos efeitos de envelhecimento provocados pela luz, conservando o seu aspeto original durante um longo período de tempo;

– Material produzido através de processos certificados, traduzindo-se numa solução sustentavelmente responsável.

Componentes e Materiais:

– Superfície de trabalho constituída por placa plana, produzida a partir de várias camadas de papel, saturados com resinas fenólicas termoendurecidas, e unidas através da ação combinada do calor (≥ 120 °C) e pressão elevada ($7 \geq$ MPa) durante cerca de 50 min;

– As faces do material integram uma superfície decorativa produzida à base de resinas pigmentadas, endurecidas por descarga de eletrões;

- Composição baseada com cerca de 70 % de celulose e 30 % de resinas.

Materiais desenvolvidos e testados de acordo com as seguintes normas:

- EN 438:2005 – High-pressure decorative laminates (HPL) Sheets based on thermosetting resins (usually called laminates);
- ISO 9001:2008 – Sistemas de Gestão de Qualidade;
- ISO 14001:2004 – Sistemas de Gestão Ambiental;
- Material com conformidade FSC e PEFC (com opção de certificação) e com as diretivas CE.

Estrutura para bancada- Tipologia em “O”

Caraterísticas diferenciais:

- Sistema modular e flexível, de fácil montagem e desmontagem;
- Elevada segurança, estabilidade estrutural, dimensional e funcional;
- Grande resistência mecânica e robustez, com capacidade de carga pontual superior a 200 kg;
- Diversidade de profundidades e alturas para adequação a diversos equipamentos e posições de trabalho e adequabilidade a desníveis nos pavimentos, garantindo superfícies niveladas;
- Elevada resistência química do revestimento dos componentes metálicos e dos materiais poliméricos;
- Superfícies fechadas, com juntas impercetíveis, sem necessidade de recorrer a tacos de tapamento;
- Zona técnica com painéis de tapamento, de fácil remoção e acesso rápido às redes técnicas;
- Possibilidade de inserção de móveis suspensos ou rodados.

Componentes e Materiais:

- Estruturas de bancada construídas em tubo de aço de secção quadrangular de 25 mm × 50 mm, com 2 mm de espessura;
 - Estruturas de ligação construídas em chapa de aço com 2 mm de espessura;
 - Painéis de tapamento e ilhargas de remate construídas em chapa de aço, com 0,8 mm de espessura;
- Dois niveladores em PVC com fuso M10 em aço e base plástica, incorporados na zona inferior de cada estrutura de bancada;
- Componentes metálicos revestidos com pintura eletrostática à base de resinas híbridas (epóxi-poliéster), com uma espessura de 0,08 mm a 0,1 mm.

Sistema desenvolvido e testado de acordo com as seguintes normas:

- EN 13150:2001- Bancadas de trabalho para laboratórios: Dimensões, requisitos de segurança

e métodos de teste;

– ISO 9001:2008- Sistemas de Gestão da Qualidade;

– ISO 14001:2004 – Sistemas de Gestão Ambiental.

Pio em aço-inoxidável

Caraterísticas diferenciais:

– Este tipo de pios permitem rápido acesso ao esgoto, sem prejuízo de grande espaço de superfície de trabalho;

– Material de excelência para aplicações hospitalares ou para laboratórios onde se requer elevado nível de assépsia, dada a sua baixa rugosidade superficial e consequente facilidade de limpeza e desinfecção;

– Junções e outros trabalhos executados por técnicos especializados, garantindo superfícies perfeitamente lisas, brilhantes e sem arestas vivas;

– Material com boa resistência ao impacto e ao fogo;

– Resistência à corrosão;

Componentes e Materiais:

– Pio construído em aço inoxidável AISI 304, inserido na zona técnica da bancada.

ANEXO IX - DESPESAS DE MATERIAL

Tabela IX. 1- Preços do material de laboratório

Produto	Modelo/Características	Unidades	Preço c/IVA
Camara Neubauer	Dupla S/pinças	1	23,47 €
Ansa	Cromoníquel, Caixa 10 unidades	1	3,08 €
Suporte tubos de ensaio	60 tubos de 60 mm	2	10,33 €
Tubo de ensaio c/ rolha	16 mm × 100 mm	40	19,68 €
Tubo de ensaio c/ rolha	16 mm × 160 mm	40	22,14 €
Proveta Graduada	Vidro 25 mL	2	8,46 €
Proveta Graduada	Vidro 100 mL	2	6,27 €
Proveta Graduada	Vidro 250 mL	2	14,17 €
Proveta Graduada	Vidro 500 mL	2	20,30 €
Proveta Graduada	Vidro 1000 mL	2	49,74 €
Pipeta graduada	1 mL	6	5,17 €
Pipeta graduada	10 mL	6	6,64 €
Pipeta de Pasteur	Plástico 3 mL	6	0,59 €
Caixa de Petri	15 mm × 60 mm	40	28,04 €
Caixa de Petri	12 mm × 40 mm	40	29,03 €
Parafilm	Rolo 10 mm × 3800 mm	2	52,89 €
Óculus de proteção	Plástico	2	14,76 €
Máscara	100 unidades	1	2,15 €
Touca	100 unidades	1	3,69 €
Proteção de sapatos	100 unidades	1	2,46 €
Fita indicadora de esterilização	Rolo	2	8,61 €
Tubos Ependorff	Caixa 100 unidades; 1,5 mL	2	12,79 €
Espátula/Colher	160 mm	3	6,90 €
Lâminas	Caixa 100 unidades	1	1,85 €
Lamelas	Caixa 100 unidades 20 mm × 20 mm	1	1,85 €
Espalhador de células	Aço-inox	3	9,23 €
Erlenmeyer	100 mL	6	14,76 €
Erlenmeyer	500 mL	6	25,39 €
Erlenmeyer	1000 mL	4	31,14 €
Erlenmeyer	2000 mL	4	59,63 €
Fermentador	Vidro 5 L	3	16,97 €
Fermentador	Vidro 10 L	3	38,30 €
Fermentador	Vidro 20 L	3	63,95 €
Fermentador	Vidro 25 L	3	70,33 €
Fermentador	Vidro 34 L	3	83,14 €
Termómetro	Vidro	2	17,00 €
Clip para termómetro	Aço	2	11,32 €
Densímetro	2 escalas	1	6,37 €
Frasco Pyrex	500 mL	6	27,53 €
		Total	830,10 €

ANEXO X – CÁLCULO DE FLUXOS FINANCEIROS

Fluxos Financeiros Antes de Impostos

Os fluxos financeiros antes de impostos são calculados subtraindo as despesas aos lucros gerados num determinado ano. Para cada ano considerou-se que tanto os lucros gerados como as despesas sobem segundo a taxa de crescimento da empresa estabelecida em 30 %, considerou-se também uma taxa de inflação de 1,563 % calculada pela média das taxas de inflação dos últimos 10 anos.

Amortizações

As amortizações foram calculadas segundo as taxas de depreciação previstas no Decreto Regulamentar n.º 2/90 de 12 de Janeiro. Considerou-se um valor residual de 20 % para todos os equipamentos e 0 % para a construção.

A amortização anual para cada investimento foi calculado pela Equação 7:

$$A = (Ci - VR) \div \left(\frac{1}{d}\right) \quad (\text{E.q. 7})$$

Com:

Ci = custo do investimento

VR = Valor Residual

d = taxa de depreciação

A Tabela X.1 apresenta os valores de taxas de depreciação, custo inicial e Valor Residual e as amortizações no primeiro ano de todos os investimentos contabilizados neste projeto.

Tabela X. 1-Taxa de depreciação, Valor Residual, Investimento inicial e Amortizações no Ano 1

Despesa	Custo €	Taxa de depreciação	Valor residual €	Amortização Ano 1 €
Construção	10 703,45	0,10	0	1 070,34
Equipamento	15 350,55	0,1428	3 070,11	1 754,35
Mobiliário	4 027,83	0,125	805,57	402,78
Sistema AVAC	5 135,25	0,125	1 027,05	513,53
Material	830,10	0,125	166,02	83,01
			TOTAL	3 824,01

Exemplo de cálculo para amortização dos equipamentos laboratoriais equacionados neste projeto no Ano 1:

$$A_{\text{equipamentos}} = (Ci - VR) \div \left(\frac{1}{d}\right)$$

$$(\Rightarrow) A = (15\,350,55 - 3\,070,11) \div \left(\frac{1}{0,1428}\right) = 1754,35$$

O valor total da amortização no Ano 1 é dado pela soma das amortizações de todos equipamentos. Este cálculo deve ser repetido para todos anos até que a soma das amortizações anuais até a data seja igual ao custo do investimento inicial menos o Valor residual.

Rendimento Coletável e Impostos

O Rendimento coletável é calculado subtraindo o valor de amortização ao fluxo financeiro. O valor de impostos é calculado multiplicando o Rendimento Coletável pela taxa de imposto IRC de 23 %. Os valores obtidos para estes parâmetros estão apresentados na Tabela X.2.

Tabela X. 2- Fluxos Financeiros não atualizados

Ano	Fluxos financeiros antes de impostos €	Amortização €	Rendimento coletável €	Impostos €	Fluxos Financeiros €	Balanco Total €
2016	- 36 747,18	0	0	0	- 36 747,18	- 36 747,18
2017	3 763,62	3 824,01	- 60,39	-12,58	3 776,31	- 32 970,87
2018	4 969,18	3 824,01	1 145,17	240,49	4 728,69	- 28 242,18
2019	6 560,90	3 824,01	2 736,89	574,75	5 986,15	- 22 256,03
2020	8 662,47	3 824,01	4 838,46	1 016,08	7 646,39	- 14 609,63
2021	1 437,21	3 824,01	7 613,20	1 598,77	9 838,44	- 4 771,20
2022	15 100,75	3 824,01	11 276,74	2 368,12	12 732,64	7 961,44
2023	19 937,79	3 824,01	16 113,78	3 383,89	16 553,89	24 515,33
2024	26 324,21	2 069,66	24 254,55	5 093,46	21 230,76	45 746,09
2025	34 756,33	1 070,34	33 685,98	7074,06	27 682,27	73 428,36
2026	45 889,39	1 070,34	44 819,05	9412,00	41 546,14	114 974,50

Fluxos Financeiros e Balanço Total

Os fluxos financeiros são calculados subtraindo os Impostos ao fluxo financeiro antes de imposto. O Balanço Total num determinado ano é calculado pela soma de todos os fluxos financeiros até esse ano inclusive.

Aos fluxos financeiros e balanço total pode ainda ser aplicada uma taxa de atualização que os converte ao ser valor presente.

Na Tabela X.2 apresentam-se os valores obtidos para os fluxos financeiros e os valores de todos parâmetros utilizados no cálculo destes.

ANEXO XI- CÁLCULO DOS INDICADORES DE VIABILIDADE ECONÓMICA

VAL

O VAL foi calculado para as taxas de 10 % e 15 % pela Equação 1.

Exemplo de cálculo:

$$VAL_{10} = \frac{-36\,747,18}{(1 + 0,1)^0} + \frac{3\,776,31}{(1 + 0,1)^1} + \frac{4\,728,69}{(1 + 0,1)^2} + (\dots) + \frac{27\,682,27}{(1 + 0,1)^9} + \frac{41\,456,14}{(1 + 0,1)^{10}}$$

$$(\Rightarrow) VAL_{10} = 39\,766,94 \text{ €}$$

TIR

O TIR foi calculado pela seguinte Equação 2.

Exemplo de cálculo:

$$0 = \frac{-36\,747,18}{(1 + TIR)^0} + \frac{3\,776,31}{(1 + TIR)^1} + \frac{4\,728,69}{(1 + TIR)^2} + (\dots) + \frac{27\,682,27}{(1 + TIR)^9} + \frac{41\,456,14}{(1 + TIR)^{10}}$$

$$(\Rightarrow) TIR = 23,37 \%$$

AE

A AE pode ser calculado pela Equação 3.

Exemplo de cálculo:

$$AE_{10\%} = VAL_{10\%} \times \frac{0,1(1 + 0,1)^{10}}{(1 + k)^{10} - 1}$$

$$AE_{10\%} = 6\,471,89 \text{ €}$$

TR

O TR corresponde ao tempo em que o Balanço Total é igual a 0. É obtido por interpolação dos valores de Balanço Total apresentados na Tabela 15.