



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MARIA CAROLINA RAFAEL CARNEIRO DE MENEZES**

**CONTROLE DE QUALIDADE EM UMA CERVEJARIA ARTESANAL:  
ANALISE DE CONTAMINANTES DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO E  
EFICÁCIA DO SISTEMA DE *CLEAN IN PLACE***

**GARANHUNS - PE**

**2018**

**MARIA CAROLINA RAFAEL CARNEIRO DE MENEZES**

**CONTROLE DE QUALIDADE EM UMA CERVEJARIA ARTESANAL:  
ANALISE DE CONTAMINANTES DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO E  
EFICÁCIA DO SISTEMA DE *CLEAN IN PLACE***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Souza Porto

**GARANHUNS - PE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

M543c Menezes, Maria Carolina Rafael Carneiro de

Controle de qualidade em uma cervejaria artesanal : análise de contaminantes do processo de fabricação e eficácia do sistema / Maria Carolina Rafael Carneiro de Menezes. - 2019.

57 f. : il.

Orientador(a): Tatiana Souza Porto  
Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Engenharia de Alimentos, Garanhuns, BR - PE, 2019.

Inclui referências

1. Controle de qualidade 2. Cerveja - Microbiologia 3. Cerveja Análise I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Título.

CDD 663.42

Maria Carolina Rafael Carneiro de Menezes

**CONTROLE DE QUALIDADE EM UMA CERVEJARIA ARTESANAL: ANÁLISE  
DE CONTAMINANTES DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO E EFICÁCIA DO  
SISTEMA DE CLEAN IN PLACE (CIP)**

Comissão julgadora do trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Alimentos

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto (Presidente)  
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

---

Prof. Dr. André Felipe de Melo Sales Santos (Membro Titular Interno)  
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

---

Rodrigo Lira de Oliveira (Membro Titular Externo)  
(Engenheiro de Alimentos, Doutorando RENORBIO-UFRPE)

*Dedico este trabalho aos meus pais  
que nunca mediram esforços  
para me auxiliar nos sonhos que almejo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter proporcionado que eu chegasse até aqui, por sempre está me abençoando e colocando pessoas especiais em meu caminho.

A meus pais, por todo incentivo e dedicação ao longo desses anos, a meu irmão por estar sempre presente, apoiando e cuidando de mim. Sem vocês eu não chegaria a lugar algum!

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto, pela constante ajuda e orientação neste trabalho. Obrigada profa!! Foi uma ótima experiência tê-la como orientadora, e durante este período pude confirmar a pessoa incrível que és.

Não poderia de deixar de agradecer também ao Prof. Dr. André Fellipe, pela indicação de Tatiana, e por sempre está disponível para me auxiliar e me aconselhar. Tenho um grande carinho pelo senhor.

À Jatobá por ter me dado a oportunidade de trabalho, contribuindo muito para minha formação. Ao meu supervisor, Químico Industrial Leandro Santos, por ter me recebido na fábrica, pela paciência e pelo grande ensinamento passado durante o meu trabalho.

A Pedro, por estar sempre comigo, me apoiando em tudo o que preciso. ;

A Marcolino, por ser minha companhia durante todo o meu trabalho, me ajudando e julgando e fazendo rir. Obrigada Lino!!!.

Aos meus colegas de turma que me acompanharam durante toda essa fase; A UFRPE e a todos os professores que contribuíram para minha formação. Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa importante da minha vida.

Obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAB – Bactéria Ácido Acética

AAM – Meio de Cultura para Bactérias Acéticas

BAL – Bactéria Ácido Láctica

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CIP – *Cleanig in Place*

CO<sub>2</sub>- Dióxido de Carbono

FAN- *Free Amino-Nitrogen*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PIB – Produto Interno Bruto

POP – Procedimento Operacional Padronizado

RDC – Resolução das Diretoria Colegiada

SVS/MS - Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

UFC – Unidade Formadora de Colônia

FA1 - Fermentador Antes da CIP (Meio Raka-Ray)

FA2 - Fermentador Antes da CIP (Meio AAM)

FA3 - Fermentador Antes da CIP (Meio Teckback)

FD1- Fermentador Depois da CIP (Meio Raka-Ray)

FD2- Fermentador Depois da CIP (Meio AAM)

FD3- Fermentador Depois da CIP (Meio Teckback)

BA1 - Barril Antes da CIP (Meio Raka-Ray)

BA2 - Barril Antes da CIP (Meio AAM)

BA3 - Barril Antes da CIP (Meio Teckback)

BD1 - Barril Depois da CIP (Meio Raka-Ray)

BD2 - Barril Depois da CIP (Meio AAM)

BD3 - Barril Depois da CIP (Meio Teckback)

**LISTA DE FIGURAS****CAPÍTULO II**

- Figura 1.** Fluxograma do processo de cerveja artesanal.....42
- Figura 2.** Crescimento microbiano após os dias de incubação correspondente para cada meio.46
- Figura 3.** Microscopia óptica para cada amostra com crescimento de micro-organismos.....49

## RESUMO

A qualidade da cerveja pode ser comprometida por vários fatores durante o seu processo de fabricação, sejam eles inerentes ao próprio processo ou microbiológicos, como a presença de micro-organismos contaminantes. A cerveja apresenta condições desfavoráveis para o crescimento de micro-organismos, porém alguns deteriorantes da cerveja ainda conseguem se multiplicar levando a alterações tais como aumento da turbidez e desagradáveis mudanças sensoriais, as quais afetam negativamente a qualidade do produto final. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi realizar controle dos micro-organismos contaminantes do processamento de cerveja artesanal e avaliar a eficácia do sistema de *cleaning in place* dos principais pontos críticos. Os meios utilizados para análises se mostraram eficientes, porém com baixa seletividade apresentando o crescimento de leveduras, sendo necessário a utilização de antibióticos. Quanto ao processo de CIP, não foi detectado o crescimento de micro-organismos após a sanitização do fermentador, porém, tal comportamento não se repetiu no barril, apresentando crescimento de bactérias ácido lácticas mesmo após a limpeza, tornando-se, assim, necessárias mudanças nos parâmetros da CIP. Estas mudanças foram descritas em um POP, com todos os detalhes para a execução correta e de forma eficiente. Esse estudo é uma importante ferramenta para controle microbiológico em cervejaria, bem como para definição das condições adequadas da CIP, sendo relevante tendo em vista a carência de dados para cervejas artesanais no Brasil atualmente.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade, contaminantes de cerveja, cerveja artesanal, POPs.

## ABSTRACT

The quality of the beer can be compromised by several factors during its manufacturing process, whether inherent to the process itself or microbiological, such as the presence of contaminating microorganisms. Beer has unfavorable conditions for the growth of microorganisms, but some beer deteriorants can still multiply leading to changes such as increased turbidity and unpleasant sensory changes, which negatively affect the quality of the final product. In view of the above, the objective of this work was to control the contaminating microorganisms from the artisan beer processing and to evaluate the effectiveness of the cleaning in place system of the main critical points. The media used for analysis were efficient, but with low selectivity showing the growth of yeasts, being necessary the use of antibiotics. As for the CIP process, the growth of microorganisms after fermentation sanitization was not detected, however, this behavior was not repeated in the barrel, presenting growth of lactic acid bacteria even after cleaning, thus making necessary changes in the CIP parameters. These changes have been described in a POP, with all the details for the correct and efficient execution. This study is an important tool for microbiological control in brewery, as well as to define the appropriate conditions of the CIP, being relevant considering the lack of data for artisanal beers in Brazil currently.

Used.

**Key-words:** Quality control, contaminants of beer, artisanal beer, POPs.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	II
<b>RESUMO</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	8
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	8
<b>CAPÍTULO I</b> .....	9
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	9
3.1 Conceitos e legislação .....	9
3.2 História.....	10
3.3 Matéria-Prima.....	12
3.3.1. Água .....	13
3.3.2. Malte.....	13
3.3.3. Lúpulo .....	14
3.3.4. Levedura.....	15
3.4 Processamento .....	15
3.4.1. Moagem.....	15
3.4.2. Mosturação .....	16
3.4.3. Filtração.....	17
3.4.4. Fervura .....	18
3.4.5. Resfriamento .....	19
3.4.6. Fermentação .....	19
3.4.7. Maturação.....	20
3.4.8. Envase .....	21
3.5 Controle de qualidade.....	21
3.5.1. Coleta e Viabilidade celular .....	22
3.5.2. Contaminantes.....	23
3.5.2.1. Bactérias ácido lácticas .....	24
3.5.2.2. Bactérias ácido acéticas.....	25
3.5.3. Limpeza e Sanitização.....	26
3.5.3.1. Agentes de químicos .....	27

3.5.3.2. CIP (Cleaning In Place, Limpeza no local).....	28
3.5.4. Procedimentos Operacionais Padrões. ....	28
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>36</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>36</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
2.1. Fluxograma do processo.....	39
2.2. Determinação dos pontos de coleta.....	40
2.3. Cleaning in place dos pontos avaliados.....	40
2.34. Análises microbiológicas .....	40
2.4.1. Filtração por membrana .....	41
2.4.2. Detecção de Bactérias Ácido Lácticas (Meio Raka-Ray) .....	41
2.4.3. Detecção de Bactérias Ácido Acéticas (Meio AAM) .....	41
2.4.4. Detecção de bactérias produtoras de ácido (Meio Teckback).....	41
2.4.5. Identificação e classificação de micro-organismos desenvolvidos. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
2.4.6. Coloração de Gram.....	42
2.4.7. Elaboração do Procedimento Operacional Padronizado .....	42
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
3.1. Pontos de monitoramento.....	43
3.2. Detecção de bactérias lácticas e ácido acéticas deteriorantes da cerveja e eficácia da CIP.....	43
3.3. Elaboração do POP.....	48
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O mercado consumidor de cerveja tem apresentado uma notável mudança no comportamento, o qual têm se mostrado mais sofisticado, exigente quanto à qualidade da bebida e disposto a pagar preços acima do mercado convencional por produtos diferenciados, entre os quais destacam-se as cervejas artesanais (MORADO, 2009).

As cervejas artesanais caracterizam-se por serem produzidas em pequena escala, por um processo de fermentação relativamente lento, com alguma diferenciação quando comparada com as cervejas comerciais mais populares. A sua elaboração tem como foco a qualidade do produto, levando em consideração a qualidade dos seus ingredientes, o que culmina na produção de variados tipos de cerveja, que são cuidadosamente elaboradas conferindo melhor aroma e sabor à bebida (KLEBAN, 2012).

No Brasil, cerveja é definida e regulamentada pela Lei Federal nº 8.918/94 e pelo Decreto 2.314/978 9, como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo este do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Compreende-se então, que os ingredientes principais para a indústria cervejeira são quatro: água, malte, lúpulo e levedura (BRASIL, 1977).

Não há uma classificação definitiva para os vários estilos de cervejas existentes, dependendo apenas da legislação de cada país e de suas tradições relacionadas ao consumo da bebida. A classificação de Jackson, aceita por vários especialistas e grupos de referência divide a cerveja em três grandes famílias (MORADO, 2009), de acordo com seu tipo de fermentação: as de alta fermentação (*Ale*), as de baixa fermentação (*Lager*) e as de fermentação espontânea (*Lambic*), as quais podem ser divididas em sub-estilos.

Entre os atributos de qualidade da cerveja incluem-se aspectos externos que são imediatamente perceptíveis pelo consumidor no momento da aquisição do produto como por exemplo a ausência de sujidades externas e de rótulos danificados, barris sem amolgadelas, entre outros defeitos, e os atributos organolépticos (aroma, sabor, brilho e transparência, formação e estabilidade da espuma), aqueles mais determinantes na aceitabilidade da cerveja, sendo decisivos no que respeita à repetição da aquisição e fidelização de uma marca de cerveja pelo consumidor. Associa-se a uma cerveja de qualidade, uma limpidez e transparência, uma coloração dourada-clara e brilhante viva, preta ou avermelhada a depender do tipo de cerveja, uma boa espuma, e *flavors* puros revelando os componentes naturais da cerveja, como o lúpulo, o malte ou compostos aromáticos agradáveis produzidos durante a fermentação. Estas características associadas à qualidade organoléptica da cerveja podem, no entanto, ser

comprometidas por vários fatores durante o seu processo de fabricação, dentre eles os fatores físico-químicos, fatores relacionados com os processos e fatores microbiológicos, como a qualidade da levedura cervejeira utilizada, incluindo a sua percentagem de viabilidade, que deve ser excelente de forma a garantir a eficiência do processo fermentativo; e a ausência de micro-organismos contaminantes (HUGHES AND BAXTER, 2001; FERNANDES,2012;).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Realizar controle dos micro-organismos contaminantes do processamento de cerveja artesanal e avaliar a eficácia do sistema de *cleaning in place* dos principais pontos críticos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Estabelecer os pontos de monitoramento na cervejaria, onde serão coletadas amostras para realização das análises para controle microbiano;
- Padronizar o método para detecção de bactérias lácticas e ácido acéticas deteriorantes da cerveja;
- Comparar os resultados das metodologias aplicadas com os *kits comerciais* para controle de qualidade microbiológico em cervejarias;
- Avaliar a eficácia da *cleaning in place* (CIP) mediante as análise microbiológicas;
- Elaborar procedimentos operacionais padronizados (POPs) da CIP dos pontos críticos de monitoramento.

## CAPÍTULO I

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Conceitos e legislação*

Segundo o decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a lei nº 8.918, de 14/07/1994 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a cerveja é definida como “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo do malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo”, sendo que o malte e o lúpulo podem ser substituídos pelos seus extratos. Segundo a mesma legislação, parte do malte de cevada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros, que não devem exceder 45% em relação ao extrato primitivo, sendo considerados adjuntos a cevada cervejeira e outros cereais malteados ou não malteados, assim como amidos e açúcares de origem vegetal. Quanto à proporção de malte de cevada, aquelas que têm como única fonte de açúcares o malte de cevada podem ser denominadas de “cerveja de puro malte”; aquelas em que o malte de cevada representa quantidade igual ou superior a 55% em peso sobre o extrato primitivo recebem a denominação “cerveja” e aquelas cuja proporção de malte de cevada for maior que 25% e menor que 55% devem conter a expressão “cerveja de...”, seguida do nome do vegetal predominante (BRASIL, 2009).

No Brasil ainda não há legislação definida para cerveja artesanal, a regulamentação começou a ser discutida apenas em 2012 pelo MAPA, onde a portaria nº 142, de 6 de novembro de 2012 estabeleceu uma consulta pública sobre diversos assuntos, incluindo a cerveja, para regulação de registro de estabelecimentos. Em 2013 o projeto de lei nº 5.191/13 veio para estabelecer regras para a cerveja, com a justificativa de as normas regulamentares relativas às bebidas caseiras e artesanais, em geral, e às cervejarias artesanais, em particular, não constavam dos decretos regulamentadores. Seu 1º parágrafo citava “Poderá ser designado estabelecimento produtor de cerveja artesanal aquele localizado em área urbana cuja produção máxima anual não ultrapasse trinta mil litros” (GARBIN, 2017).

Esse segmento de cerveja tem perfil sensorial muito mais complexo se comparada às cervejas produzidas em escala industrial. Ela oferece sabor diferenciado e consegue ao mesmo tempo dispensar o consumo exagerado do produto (BELTRAMELLI, 2012). A sua elaboração tem como foco a qualidade do produto, levando em consideração a qualidade dos seus

ingredientes, o que culmina na produção de variados tipos de cerveja que são cuidadosamente elaborados conferindo melhor aroma e sabor à bebida (KLEBAN,2012). Esse ramo de cervejaria conquista cada vez mais adeptos que estão dispostos a pagar mais por um produto melhor e que também estão em busca de uma qualidade de vida melhor em decorrência da menor ingestão de bebidas alcoólicas, por não ser necessário o consumo em quantidades elevadas (BELTRAMELLI, 2012).

Quanto a classificação, não há nenhuma definição para os vários estilos de cervejas existentes, dependendo da legislação de cada país e de suas tradições relacionadas ao consumo da bebida. A primeira classificação reconhecida publicamente foi elaborada em 1977 pelo jornalista inglês Michael Jackson, no livro *The World Guide To Beer*, tornando-se grande referência sobre o assunto. De acordo com essa classificação as cervejas se agrupam em três ramos principais, conforme o processo de fermentação: o das cervejas do tipo *Lager*, de baixa fermentação; o das cervejas do tipo *Ale*, de alta fermentação; e o das cervejas de fermentação espontânea, raras e muito específicas. Considerando a classificação mais usual as cervejas são divididas em duas principais famílias: *Lager* e *Ale* as quais se diferenciam pelo fermento utilizado. As cervejas do tipo *Ale*, são as preferidas pelos cervejeiros artesanais; enquanto as *Lager*, são produzidas em escala industrial (VIOTTI, 2012).

As cervejas *Ale* são produzidas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e possuem uma temperatura de fermentação entre 15 e 25°C, sendo antigamente consideradas como “cervejas de alta fermentação” (AMORIM, 2013). Neste tipo de cerveja, as leveduras sobem para a superfície do líquido e os aromas e sabores são mais complexos, devido a maior quantidade de ésteres e outros compostos aromáticos gerados, principalmente, pela temperatura da fermentação (VIDGREN et al., 2010). Por outro lado, as cervejas *Lager* que geralmente tem um perfil menos aromático, são fermentadas pela levedura *Saccharomyces pastorianus* numa faixa de temperatura entre 6 a 14°C e são conhecidas como “cervejas de baixa fermentação” na terminologia mais antiga, tendo o acúmulo de leveduras no fundo do líquido (VIDGREN et al., 2010).

### 3.2 História

A produção e o consumo de bebidas alcoólicas são algumas das atividades mais antigas desenvolvidas pelo homem. No caso da cerveja, a mais popular das bebidas, sua produção vem de milhares de anos, sofrendo aprimoramento técnico visando o aumento da produção e do consumo. A prática da cervejaria originou-se na região da Mesopotâmia, onde a cevada cresce

em estado selvagem, porém a origem das primeiras bebidas alcoólicas ainda é incerta, mas provavelmente tenham sido feitas de cevada, tâmaras, uvas ou mel. No passado o processo cervejeiro era exercido por padeiros, devido à natureza da matéria prima (grãos de cereais e leveduras). No Egito, a cerveja era uma bebida nacional e de grande consumo, ocupando um lugar importante nos rituais religiosos (DRAGONE et al., 2010). Morado (2009) ressaltou os diversos indícios que levam a crer que nos anos 6000 A.C. a produção de cerveja já estava estabelecida e organizada entre os sumérios. Tábuas sumérias registram o consumo de uma bebida chamada *sikaru*, que era utilizada como remédio, pagamento de salários ou como oferenda aos deuses. Até a Idade Média, a cerveja era produzida por mulheres responsáveis pela produção tanto do pão quanto da bebida. Esta era considerada fonte nutricional e um complemento importante para as refeições diárias, além de ser considerada mais pura do que a água. Era produzida para as classes mais abastadas como forma adicional ao cardápio diário e considerada também como um pão líquido por sua riqueza em vitaminas e minerais. (BELTRAMELLI, 2012).

As primeiras iniciativas de produção em grande escala aconteceram nos mosteiros na Europa Ocidental a partir do século VI. Em uma época de civilização iletrada, os mosteiros eram locais de conhecimento, desenvolvimento de técnicas para as mais diversas áreas. Diante disso, os religiosos por diferirem do resto do povo, tornaram-se de fato os primeiros pesquisadores sobre cerveja, tendo aprimorado seu método de fabricação e introduzindo a conservação a frio da bebida (MORADO, 2009).

No Brasil, têm-se registros de que a cerveja tenha chegado pelas “mãos” da Companhia das Índias Orientais, no século XVII, junto com os holandeses. Com a saída dos holandeses em 1654, o produto não seria mais encontrado até 1808, quando a família Real Portuguesa, desembarcou no Brasil colônia (SUZIGAN, 2000).

O início do século XX foi marcado pelo surgimento de muitas micro-cervejarias, animadas com a nascente sociedade burguesa, o início da industrialização e a chegada de um grande número de imigrantes europeus. Em 1966 surgiu a Cerpa – Cervejaria Paraense - e em 1967 a Skol. Quatro anos depois, foi lançada a primeira cerveja em lata brasileira, feita de folha de flandres: a Skol Pilsen. Em 1980, surgiu a cervejaria Kaiser, em Divinópolis (MG), e em 1989 a Primo Schincariol passou a produzir cerveja no interior de São Paulo (MORADO, 2009; DRAGONE et al., 2010). Em 1999, a partir da fusão entre a Companhia Antártica Paulista e a Companhia Cervejeira Brahma, surge a AmBev. A criação da Ambev e sua posterior fusão com a gigante belga Interbrew foram dois dos fatos mais marcantes da história da cerveja brasileira e mundial das últimas décadas. Com o nome de InBev, a nova empresa mundial, a

partir de 2004, tornou-se a maior produtora do mundo, mantendo seu posto até então (SILVA et al, 2016).

O investimento do setor cervejeiro em 2013 foi de R\$ 4,3 bilhões, e em 2014 este setor gerou 2,7 milhões de empregos, correspondendo a 2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e 15 % da indústria de transformação. Com uma produção de 14 bilhões de litros de cerveja gerados e R\$ 21 bilhões em impostos (SILVA et al, 2016).

Apesar da popularidade e preferência no mercado em território nacional, a cerveja industrializada, por ser feita em grande escala, não utiliza a cevada em sua fórmula e sim outros grãos, como já dito anteriormente, milho, trigo, arroz, entre outros, e também são utilizados aditivos químicos como corantes, conservantes e estabilizantes. A utilização de outros grãos faz com que a qualidade da cerveja diminuía significativamente, além de fazer com que o preço da bebida também fique menor, justificando parte da preferência da população. Entretanto, em meados dos anos 70 alguns cervejeiros da costa oeste dos Estados Unidos, em busca de retomar os estilos tradicionais de cerveja, iniciaram um movimento de resgate dos costumes com o propósito de primar pela qualidade do produto e não pelo volume distribuído (OLIVER, 2012).

De acordo com Castilho, Maymone e Oliveira (2016), no Brasil o interesse pela cerveja artesanal surgiu por volta de 1990 de forma muito sutil, devido à chegada de cervejas importadas e o estabelecimento das primeiras cervejarias artesanais. Nos últimos anos, a produção de cervejas artesanais encontra-se em grande desenvolvimento, criando assim novos espaços para investimentos e conseqüentemente melhorias na situação econômica do país (MAIA, 2017). A grande expansão de cervejarias artesanais no Brasil, fez com que o consumo dessas cervejas fizesse parte da cultura do país, o que está levando cada vez mais a sua valorização. A fabricação de cerveja apesar de possuir diversas modificações ao longo do tempo, é muito importante para cultura e história de diversos povos, sendo passada através de gerações, vinculada a modificações que só melhoram a qualidade do produto (MAIA, 2017).

### *3.3 Matéria-Prima*

A cerveja é definida como uma bebida carbonada, cujo teor alcoólico varia de 3 a 8% (v/v), produzida a partir de malte de cevada, lúpulo, água de boa qualidade e fermento. Outros tipos de matérias primas (adjuntos) podem ser utilizados em sua fabricação, tais como, arroz, milho e trigo (OLIVEIRA, 2011). É considerada uma bebida versátil, no qual, se permite várias possibilidades de variação, conforme quantidade de matéria-prima utilizados, sua proporção, grau de maltagem do cereal, temperatura, tipo de fermentação, duração de todas as etapas,

formas de armazenamento e envase da bebida (MORADO, 2009). A escolha inadequada da matéria-prima poderá implicar em inúmeras complicações, tais como mosto turvo e dificuldades na clarificação e sacarificação, queda de rendimento na brassagem, problemas com paladar e espuma da cerveja, turbidez na cerveja e queda de rendimento nos ciclos de filtração (MONTEIRO, 2001).

### **3.3.1. Água**

A água representa a maior parte da composição da cerveja, em torno de 90%, e exerce grande influência sobre a qualidade da bebida (TSOCHOPE, 2001). Sua relevância faz com que seja um dos fatores decisivos na escolha do local para a instalação de uma cervejaria. Uma água que precisa de muitas correções da qualidade requer um tratamento mais minucioso, o que irá resultar em um aumento no custo do produto final. Então é necessário que a fábrica esteja instalada próxima a uma fonte abundante de água de boa qualidade (VENTURINI, 2000).

A água apropriada para a produção de cerveja deve seguir padrões de potabilidade, ser transparente, inodora e isenta de qualquer sabor estranho ou matéria orgânica. A presença dos sais dissolvidos pode influenciar no processo fermentativo e, conseqüentemente, na qualidade da cerveja, logo, suas quantidades devem estar bem definidas (POMBEIRO, 2008). Quanto a sua dureza, a água com elevado teor de sulfato de cálcio (dureza permanente) está associada a cervejas amargas e para a cerveja Pilsen necessita de água mole para a sua produção, isto é, pobre em cálcio e magnésio (VENTURINI, 2000).

Um fator importante na análise da água é o controle de seu pH, o qual quando alcalino favorecerá a formação de substâncias indesejáveis no processo. Geralmente, o valor ideal de pH da água a ser utilizada para produção da cerveja está na faixa entre 6,5 e 7, ou seja, em pH próximo do neutro. Com isso, tem-se uma maior facilidade da atividade enzimática e conseqüentemente um aumento no rendimento da maltose e no teor alcoólico (OLIVEIRA, 2011).

### **3.3.2. Malte**

O grão de cevada, um dos mais importantes ingredientes para a produção de cerveja, vem a ser o quinto cereal de interesse econômico em escala mundial, de uso quase exclusivo da indústria cervejeira. Antes de ser utilizada como insumo para a elaboração da cerveja, a cevada necessita passar por um processo de conversão do amido presente no seu endosperma em

açúcares fermentescíveis; necessários para a produção da bebida. Essa transformação enzimática é chamada de malteação, sendo dividido em três etapas básicas: a maceração ou embebição, a germinação e a secagem ou clivagem. Em maltarias os grãos do cereal germinam sobre condições ambientais controladas e dirigidas a fim de se produzir enzimas utilizadas na conversão das matérias primas em mosto cervejeiro (BELETI et al, 2012).

A contribuição da cevada para o sabor da cerveja é amplamente desenvolvida através do processo de maltagem, bem como a sua contribuição a composição química da cerveja. Como ingrediente, o malte fornece sacarídeos, proteínas, nitrogênio aminado (FAN) e enzimas que facilitam as reações de fermentação na fabricação de cerveja, e o conteúdo dessas características é usado para descrever a qualidade do malte como ingrediente. Estas características de qualidade do malte podem influenciar o sabor, como excesso de sacarídeos que não são completamente fermentados, resultando em uma cerveja com característica doce (BAMFORTH, 1993; BOKULICH & BAMFORTH, 2013; FOX, 2010).

### **3.3.3. Lúpulo**

O aroma e o sabor amargo da cerveja é um atributo importante que os consumidores esperam desfrutar durante o consumo (HOUGH, et. alca, 1982; OLADOKUN, 2017), e para dar essa característica cervejeiros convencionalmente adicionam lúpulo (*Humulus lupulus L.*) da formulação (KEUKELEIRE, 2000; OLADOKUN, 2017). O lúpulo é considerado a terceira matéria-prima na fabricação da cerveja, sendo necessários de 40 a 300 gramas de lúpulo para produzir 100 litros de cerveja. Este insumo não modifica o corpo e o teor alcoólico da cerveja, sendo inseridos para conferir aroma e sabor, contribuindo também para a estabilidade da espuma. Cada tipo de lúpulo possui a sua combinação diante do aroma e sabor, no qual permite que o cervejeiro determine a que mais convém ao seu paladar ou exigência do mercado (MORADO, 2009)

São três os grupos de compostos do lúpulo de maior importância para a produção de cerveja: as resinas, os polifenóis e os óleos essenciais. O sabor amargo que o lúpulo proporciona à cerveja é proveniente da isomerização dos alfa-ácidos presentes no lúpulo. Essa isomerização, no processo tradicional de produção de cervejas, ocorre no momento da fervura do mosto. As moléculas de alfa-ácido são pouco solúveis em uma solução aquosa como o mosto e, desta forma, transferem pouco amargor à solução. A forma isomerizada é bastante solúvel no mosto e amarga. Os beta-ácidos não conferem um amargor desejável à cerveja e, quando isomerizados, promovem um amargor desagradável. As resinas do lúpulo são importantes na composição do

lúpulo, devido a contribuir com a preservação da qualidade da cerveja pronta, na medida em que a protegem contra oxidação. Os óleos essenciais são voláteis e sua intensidade na cerveja está diretamente relacionada com a dosagem e o momento em que é realizada, normalmente ao final da fervura ou na fase de filtração da cerveja já maturada (NOGUEIRA, 2010).

### **3.3.4. Levedura**

A levedura é um micro-organismo responsável pela conversão dos os açúcares presentes no mosto em etanol, acrescentando a bebida novas dimensões relacionadas a sabores e textura (JACKSON, 2010). Geralmente as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* são as mais utilizadas como cultura starter na produção das duas categorias mais difusas da indústria cerveja, as cervejas *Ale* e *Lager*, sendo *Saccharomyces pastorianus* o sinônimo de *S. carlsbergensis*, uma levedura parcial, que foi gerada em um cruzamento de fusão interespecífico entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus* ( AQUILANI et al., 2015; CAPECE, 2018 ).

As cepas de levedura podem ser tradicionalmente divididas em dois grupos: as de alta fermentação que são utilizadas para a produção de cervejas tipo *Ale*, e as de baixa fermentação, utilizadas para a produção de *Lagers*. Originalmente, essas cepas foram classificadas com base em suas propriedades de floculação, tendo em vista que durante a fermentação, as leveduras de alta fermentação tendem a subir para a superfície do mosto fermentado, sendo o seu nome derivado deste fato. Da mesma forma, a levedura de baixa fermentação tende a ficar localizada na parte inferior do tanque (KUNZE, 1999; KARABIN, 2018).

Quanto à temperatura de crescimento celular, cepas *Ale* podem crescer a 37°C, enquanto as cepas *Lager* não apresentam crescimento em temperatura maior que 34°C. Durante a produção, as cervejas tipo *Lager* são fermentadas na faixa de temperatura de 7 – 15°C, as quais floculam no final da fermentação primária com 7 a 10 dias, onde são coletadas na base do fermentador. Já as cervejas tipo *Ale* são fermentadas com temperaturas entre 18 e 22°C, sendo o final da fermentação entre 3 e 5 dias, ocorrendo o arraste das células dissolvidas nas bolhas de CO<sub>2</sub> para a superfície do tanque, onde poderão ser coletadas (RIBEIRO et al, 2018)

## **3.4 Processamento**

### **3.4.1. Moagem**

A etapa de moagem do malte consiste na desintegração do grão por esmagamento, para que ocorra o rompimento da casca expondo desta forma o endosperma, fração interna do grão, levando a desintegração total do endosperma promovendo uma melhor ação enzimática. Esta fase tem influência diretamente na velocidade das reações físico-químicas, no rendimento, clarificação e na qualidade do produto final. Durante este processo, é necessário atenção quanto a granulometria final do grão, evitando a formação de finos para que não ocorra a produção excessiva de pasta dentro da solução (VENTURINI, 2010). Além disto a moagem também facilita a dissolução do malte na água e prepara a camada filtrante do mosto (MONTEIRO, 2001).

O processo de moagem pode ser feito a seco ou úmida, o importante é que a moagem não seja muito severa para não prejudicar a fase de filtração do mosto, pois as cascas constituirão o elemento filtrante do processo, no entanto, a moagem se muito grosseira, não atingirá o seu objetivo, que é de facilitar a hidrólise do amido pela maior superfície de contato do substrato amiláceo com as enzimas do malte (OETTERER et. al, 2006). Após a quebra, o malte moído é levado para o tanque de mosturação onde será misturado com água e submetido ao cozimento (MONTEIRO, 2001).

#### **3.4.2. Mosturação**

A mosturação compreende a adição do malte moído à água já aquecida. Nesta operação são solubilizadas as substâncias solúveis em água, e as insolúveis são solubilizadas com a auxílio de enzimas, promovendo uma gomificação e hidrólise do amido à açúcares fermentescíveis (RIBEIRO et al, 2018). Neste sentido deve-se considerar que todo processo enzimático depende da temperatura, do tempo, do grau de acidez e concentração do meio, da qualidade do malte e constituição do produto da moagem (ALMEIDA E SILVA, 2005). A mosturação também é responsável por extrair nutrientes, minerais e proteínas presentes nos grãos. Como resultado, o mosto possui as características nutricionais necessárias para que as leveduras atuem de forma adequada, produzindo álcool e outros componentes responsáveis pelo sabor característico da cerveja (TOSTES, 2015).

Ao longo do tempo foram desenvolvidos vários tipos de mosturação, que podem ser divididos em métodos de infusão e decocção. A escolha do programa de tempo/temperatura a ser aplicado durante a atuação enzimática dependerá da composição e do estilo de cerveja que será produzido, estando diretamente relacionado com a quantidade desejada de açúcares

fermentescíveis e também de substâncias proteicas responsáveis pelo “corpo” da cerveja e consistência da espuma (VENTURINI, 2010)

As principais enzimas do malte são as amilases responsáveis pela quebra do amido em moléculas menores, sendo estes açúcares, os nutrientes da levedura no processo fermentativo, as proteases que tem por função quebrar as proteínas, substâncias importantes no processo de fabricação da cerveja, uma vez que, são os principais componentes atrelados a estabilidade da espuma, a qual constitui um requisito sensorial dos consumidores, e as glucanases que tem a função de quebrar moléculas de glucanos que conferem a rigidez do amido (MONTEIRO, 2001; NIU et al., 2018). A atividade enzimática está diretamente relacionada com a temperatura e pH do meio. A temperatura de ativação da enzima está na faixa de 52-54°C e, posteriormente a temperatura é elevada para 65°C, temperatura ótima para a atividade das amilases presentes no malte (REINOLD, 1997).

No final da mosturação o índice de sacarificação é verificado com um teste com solução de iodo a 0,02N. Confirmada a hidrólise do amido, pela ausência da cor roxo-azulada, característica da reação do iodo com o amido, em temperatura ambiente, a solução é aquecida até aproximadamente 76°C, com o objetivo de inativar as enzimas do mosto para estabilizar o resultado desejado, impedindo que estas enzimas continuem atuando durante a filtração do mosto. Finalizada a mosturação, o mosto é enviado para a etapa de clarificação, para que ocorra a separação da parte insolúvel da massa (RIBEIRO et al., 2018).

### **3.4.3. Filtração**

Também conhecida como etapa de clarificação, a filtração tem como principal objetivo separar as substâncias solubilizadas na mosturação daquelas remanescentes insolúveis no chamado bagaço de malte. Durante este processo, o mosto segue para a etapa de repouso, neste intervalo de tempo as cascas do malte decantam no interior da tina do filtro, formando uma camada filtrante. A filtração possui duas etapas: na primeira etapa é retirado o mosto primário líquido que atravessa o leito filtrante; já na segunda etapa o resíduo sólido é lavado com água para a recuperação do extrato retido na torta de filtro após separação do mosto primário (SCHMIDELL et al., 2001; TOSTES, 2015). Esta água secundária deve estar a 75°C visando aumentar a extração de açúcar e, conseqüentemente, elevar o rendimento do processo (ALMEIDA E SILVA, 2015).

O mosto oriundo desta etapa deve ser o mais límpido possível, pois a turvação excessiva é vista como um aspecto negativo, acarretando assim, maior perda de mosto, atrapalhando o andamento da fermentação/maturação, além de afetar a qualidade, estabilidade do paladar e

perda de amargor da cerveja. Deve-se evitar também a incorporação de ar no mosto quente, pois a aeração exagerada conduz a coloração mais alta, prejuízo à qualidade do paladar e à estabilidade físico-química (MONTEIRO, 2001).

#### **3.4.4. Fervura**

Este processo tem o objetivo de inativar as enzimas ainda remanescentes, esterilizar o mosto, concentrar o mosto no grau desejado, extrair as substâncias essenciais do lúpulo, precipitar as proteínas indesejáveis e, finalmente, transformar o aspecto e paladar do mosto (RIBEIRO et al., 2018) ou seja, proporcionar estabilidade biológica, bioquímica e coloidal do mosto. Durante a fervura a flora microbiana resistente ao processo de mosturação e filtragem é eliminada. O pH ácido (menor que 5,5) e as substâncias extraídas do lúpulo durante essa fase contribuem para o saneamento do mosto (RIBEIRO et al., 2018).

A alfa-amilase, que após a mosturação e filtragem poderia apresentar ainda alguma atividade, é então inativada. As proteínas e taninos são coaguladas e eliminados do mosto na forma de *trub*, um resíduo mucilaginoso semelhante ao lodo. O desenvolvimento da cor é relacionado com a intensidade da fervura. A cor está ligada com à caramelização de açúcares, à formação de melanoidinas e à oxidação de taninos (RIBEIRO et al., 2018).

Nessa etapa não é permitida a entrada de ar, pois a presença de oxigênio no mosto inibe a coagulação da proteína, assim como os taninos se oxidam a formas mais precipitáveis na presença do ar (MONTEIRO, 2011).

O tempo de fervura depende do tipo de cerveja a ser fabricada. A média é entre uma hora e meia a duas horas (RESENDE, 2014). De acordo com o tempo em que o lúpulo é adicionado ao mosto, desenvolve-se aroma e sabor característicos. Lúpulos adicionados nos quinze minutos iniciais da fervura contribuem para a coagulação de proteínas. O amargor característico da cerveja é desenvolvido pela adição do lúpulo após os trinta minutos de fervura. Já o aroma característico da cerveja é alcançado pela adição de lúpulo ao final da ebulição (SCHMIDELL et al., 2001; TOSTES, 2015). Inicialmente o lúpulo é adicionado em concentrações que variam de 0,4 a 1,4g/L em relação ao volume inicial da fervura (VENTURINI FILHO, 2010). O mosto é mantido em fervura até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, durante 60-90 min, permitindo a evaporação máxima de até 10% do volume inicial (RIBEIRO et al., 2018).

### 3.4.5. Resfriamento

Após a fervura, o mosto é resfriado para uma adequada inoculação da levedura. A temperatura de resfriamento está diretamente relacionada com o tipo de levedura que será utilizada (RIBEIRO et al., 2018). Esta fase é um dos pontos em que é possível o estabelecimento de infecções por bactérias e penetração de leveduras selvagens. Além disto, durante esta etapa, é feito o uso da força centrípeta através da rotação forçada do meio, precipitam-se os complexos de proteínas, resinas e taninos (*trub*), os quais sedimentam no fundo do tanque e devem ser separados do mosto límpido. A separação do *trub* e do bagaço de lúpulo é feita normalmente em tanques de decantação, chamados de *whirlpool*, onde cerca de 40% das substâncias amargas, são eliminadas juntamente com o *trub* (SCHMIDELL et al., 2001; TOSTES, 2015). O resfriamento deve ser o mais rápido possível para evitar a contaminação por micro-organismos e a formação de compostos indesejáveis como o DMS (Dimetil Sulfeto) (AQUARONE et al., 2001).

### 3.4.6. Fermentação

O processo fermentativo consiste na transformação dos açúcares fermentescíveis em gás carbônico e etanol, pela ação da levedura cervejeira adicionada sob condições anaeróbicas (ALMEIDA E SILVA, 2005). Todos os carboidratos fermentescíveis, principalmente a glicose, a maltose e a maltotriose, são metabolizados pela levedura, resultando na produção de etanol e gás carbônico (RIBEIRO et al., 2018).

No decorrer da fermentação, há uma diminuição do pH de 5,2 para 3,8, que é favorável para a fisiologia da levedura. A concentração final de etanol na cerveja depende, principalmente, da concentração de açúcares fermentescíveis no mosto (RIBEIRO et al., 2018). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem habilidade de se ajustar metabolicamente em presença ou ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio uma porção do açúcar é transformada em biomassa, gás carbônico e água e enquanto que na ausência de oxigênio a maior parte é convertida em etanol e gás carbônico, a que se dá o nome de fermentação alcoólica. O processo de aerobiose é energeticamente mais eficiente e tem a finalidade de promover o crescimento e o reviramento do fermento. O processo anaeróbio tem a função de promover a transformação do mosto em cerveja, pela conversão do açúcar em etanol e gás carbônico (LIMA et al., 2001).

A etapa de fermentação pode ser dividida nas fases de adaptação e fase de atenuação. O período de adaptação dura até 36 horas e é responsável pela adaptação da levedura às condições apresentadas pelo mosto. As leveduras analisam o estoque de nutrientes disponíveis para que possam produzir as enzimas necessárias para a adaptação. Durante este período, o oxigênio contido no mosto é consumido para que a reprodução nesta fase seja mais eficiente. Já a fase de atenuação dura uma média de 2 a 10 dias. É nesta etapa que a fermentação em si é iniciada. A levedura passa a metabolizar de forma anaeróbia e, assim, começa a transformar os açúcares fermentáveis em álcool e liberar CO<sub>2</sub>. A taxa de atenuação do mosto é máxima nesta fase (a densidade tende a cair em 2/3 a 3/4 do valor inicial) (PALMER, 2006; PAPAZIAN, 2014; TOSTES, 2015).

Além do etanol e do dióxido de carbono, são formados alguns subprodutos do metabolismo das leveduras, como ácidos, álcoois alifáticos superiores, ésteres, diacetil, acetoína, ligações de enxofre, entre outros (VENTURINI, 2005; REINOLD, 1997). O diacetil exerce uma função importante na formação e eliminação de aromas, sendo que em concentrações elevadas ocorre a produção de um aroma de manteiga rançosa. Sua produção pode decorrer da baixa hidrólise das proteínas, não fornecendo compostos nitrogenados suficientes para o crescimento das leveduras. No final da fermentação o diacetil é assimilado pela levedura (RIBEIRO et al., 2018). Além do diacetil, muitos componentes do mosto podem ser absorvidos pela levedura durante a fermentação. Todos os compostos envolvidos na assimilação, a formação de produtos e subprodutos, são influentes no sabor e no aroma da cerveja, sendo alguns desejáveis, e outros indesejáveis. Entretanto, estes subprodutos da fermentação só vão estar totalmente formados quando a maturação acabar, pois na maturação ocorre uma segunda fermentação (VENTURINI, 2005; REINOLD, 1997).

### **3.4.7. Maturação**

A maturação tem por objetivos refinar o sabor da cerveja pela redução do teor de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico, carbonatar parcialmente o produto, evitar a ocorrência de oxidações que possam comprometer sensorialmente a bebida e clarificar o líquido através da deposição do fermento e outros materiais em suspensão (SLEIMAN, 2002).

Durante esta fase, a maior parte dos açúcares fermentáveis já foi consumido e muitas das leveduras se encontram adormecidas. No entanto, esta fase é essencial para que os sabores e aromas da cerveja se equilibrem. Algumas funções da levedura ainda são executadas. A fermentação de açúcares maiores e, portanto, mais difíceis de serem consumidos acontece nesta

etapa, assim como a reabsorção de subprodutos oriundos da fermentação na fase de atenuação (PALMER, 2006; PAPAIZIAN, 2014; TOSTES, 2015).

O gás carbônico produzido durante a fermentação do extrato restante provoca a carbonatação, o repouso à baixa temperatura provoca a precipitação dos resíduos de leveduras que ainda permanecem na cerveja, maturação do sabor pelas transformações que ocorrem na concentração de ácido sulfídrico, de acetaldeído e de diacetil, os quais são minimizados durante o processo. Na maturação são formados ésteres dando origem ao aroma e sabor que caracterizam a cerveja, entre esses ésteres, predominam o acetato de etila em média 21,4 mg/L e o acetato de amila com 2,6 mg/L (ALMEIDA E SILVA, 2005).

#### **3.4.8. Envase**

Depois de maturada a cerveja é direcionada para o envase que pode ser realizado em garrafas ou barris. O enchimento é feito em contra-pressão com CO<sub>2</sub> de modo a evitar a formação de espuma e expulsar o O<sub>2</sub> contido na embalagem, que pode deteriorar a cerveja em termos físico-químicos (oxidação) ou microbiológicos (FERNANDES, 2012). Nesse processo deve-se ter grande cuidado com possíveis fontes de contaminação, perda de gás e contato da cerveja com oxigênio, pois podem comprometer a qualidade do produto. O envase é a fase final do processo de produção, sendo composto por diversas operações relacionadas ao enchimento das embalagens primárias (cujos mais comuns atualmente são as garrafas de vidro, latas de alumínio e barris), pode-se dizer que a bebida envasada em garrafas de vidro e latas de alumínio são enviadas à pasteurização, sendo então denominada cerveja. A bebida envasada em barril não passa por este processo, sendo denominado de chope, um produto de menor vida de prateleira, devido a ausência deste processo (MARTINS, 2014).

#### **3.5 Controle de qualidade**

A qualidade de um produto está diretamente relacionada ao grau de excelência de um alimento e inclui todas as características ou atributos que influem na sua aceitabilidade pelo cliente ou consumidor. Assim, cabe à indústria alimentar procurar entender esses atributos de qualidade de forma a ir ao encontro das expectativas do cliente ou consumidor, lançando no mercado um produto em conformidade com esses requisitos. Para isso é necessário planejamento e controle efetivo de forma a proporcionar uma melhoria contínua durante todo o processo produtivo eliminando todo o tipo de perdas de qualidade para que possa oferecer um

produto com a mais alta qualidade. O conceito de qualidade não deve ser, por isso, algo opcional numa indústria alimentar, nem deve ser exclusivo das grandes empresas. Deverá ser uma parte integrante e fundamental na estrutura de uma organização, garantindo a proteção e satisfação dos seus consumidores e o seu sucesso competitivo e sobrevivência no mercado (FERNANDES, 2012).

A cerveja pode conter contaminantes microbianos originários a partir de diversas fontes. Contaminantes primários provêm das matérias primas e dos recipientes, e contaminantes secundários são introduzidos a cerveja durante o engarrafamento, o armazenamento ou preenchimento de barris. Cerca de metade dos problemas documentados podem ser atribuídos a contaminações secundárias, porém, as consequências das contaminações primárias podem ser mais catastróficas com a perda potencial da bebida (RIBEIRO et al., 2018). Outro parâmetro importante para garantir a qualidade é que seja mantido durante o processo um rigoroso controle da fermentação, ficando atento a todos os fatores internos e externos anteriormente citados e também à fisiologia da levedura (SHURE, 2001).

### **3.5.1. Coleta e Viabilidade celular**

Durante a fermentação, a base cônica dos fermentadores cria uma coluna concentrada de gás ascendente em direção ao centro do tanque resultando no transporte das células de levedura através do corpo do mosto fermentado. Sistemas de resfriamento embutidos na parede do tanque fazem com que o líquido da coluna central suba para ser mais frio do que o líquido no centro. Isso altera a densidade do mosto e fornece uma região de turbulência reduzida. Levedura que foi transportada dentro da coluna central é então capaz de decantar retornar para a base do vaso. Finalmente, à medida que a fermentação ativa chega ao fim, a produção de CO<sub>2</sub> torna-se bastante reduzida e, combinada com o resfriamento do vaso, a levedura floculante se acumula no cone do vaso. Após essa decantação, a levedura pode ser separada do mosto fermentado. As leveduras de *Ale* são geralmente mais floculantes do que as cepas *Lager* e, desta forma, no final da fermentação, são levadas para a superfície do líquido fermentado, onde serão coletadas e mantidas (LIVENS, 2016).

A coleta é geralmente realizada usando uma sucção-a-vácuo sistema, no entanto, no formato mais simples, isso pode ser obtido usando um "pára-quedas". Este é um funil de metal ligado a um tubo que sai através de uma porta selada sob o tanque de fermentação. O pára-quedas permitirá que a levedura seja transferida, por gravidade, para um recipiente de coleta higienizado situado abaixo do fermentador (LIVENS, 2016).

A coleta seletiva é um conceito importante na fabricação de cerveja e permite a coleta da levedura ideal em termos de capacidade fermentativa. Levedura tipo *Ale* é tradicionalmente de maior qualidade em relação ao desempenho da fermentação do que aquela coletada de fermentações *Lager*. Nas principais fermentações, a primeira "cabeça" de levedura visível geralmente ocorre rapidamente e consistirá em grande parte em quantidades significativas de sólidos de mosto ou *trub*, bem como em leveduras que são danificadas ou atípicas em termos de características antecipadas de fermentação. Esta cultura de levedura inicial é removida e descartada e uma segunda "cabeça" será formada posteriormente. Isto irá conter uma concentração muito maior de células de levedura mais saudáveis e consideravelmente menos material *trub* e será coletada para lançar em fermentações subsequentes. Em alguns casos, uma terceira coleta final também pode ocorrer. Contudo, o formato 'aberto' dos fermentadores tradicionais de *Ale* permite a coleta mais fácil de levedura para repasse em série; no entanto, também permite um maior risco de contaminação microbiológica, particularmente no início da fermentação, não apenas no mosto fresco ou recém-moído, mas também na levedura cultivada. Além disso, há um aumento da probabilidade de exposição de levedura para oxigênio, que, se mantida durante a coleta, pode resultar em levedura que permanece ativa durante o armazenamento e, portanto, leva a uma capacidade fermentativa reduzida no repique (LIVENS, 2016).

A reutilização da levedura só pode ser realizada se as leveduras estiverem viáveis e metabolicamente ativas. Consequentemente, quanto maior o número de leveduras viáveis e fisiologicamente competentes na biomassa, maior será a taxa de produção de álcool ou de atenuação. Assim, os ensaios de viabilidade são absolutamente essenciais para avaliar a qualidade das leveduras (SHURE, 2011).

### **3.5.2. Contaminantes**

Apesar dos micro-organismos serem úteis em alguns alimentos quando são responsáveis por transformações desejáveis a partir do seu crescimento, uma boa parte destes podem trazer modificações indesejáveis, como os processos de deterioração. O potencial dos micro-organismos deteriorantes dos alimentos está relacionado com sua capacidade de produzir metabólitos que estão associados à degradação do produto, o que levará à rejeição por parte dos consumidores. Em geral, muitos micro-organismos em um alimento são capazes de produzir metabólitos indesejáveis quando crescem acima de um certo nível (GRAM et al., 2002).

A cerveja é considerada uma bebida microbiologicamente estável devido a uma série de fatores, entre eles a presença de compostos de lúpulo amargo (aproximadamente 17–55 ppm de *iso- $\alpha$ -ácidos*) que são tóxicos, concentrações elevadas de etanol (variando de 0,5% a 10%, p/p), altos teores de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5% p/p), baixo pH (3,8–4,7), baixo nível de oxigênio (<0,1 ppm) e baixo teor de nutrientes (como carboidratos e aminoácidos), responsáveis pela inibição do crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas (LIU, 2016; LIU, 2017; YIN, 2018). Porém, apesar dessas características desfavoráveis ao crescimento, leveduras selvagens, bactérias ácido lácticas (*Pediococcus* e *Lactobacillus*), bactérias ácido acéticas, são predominantes no ambiente cervejeiro e podem causar problemas de deterioração durante os estágios iniciais ou posteriores do processamento, podendo causar um aumento da turbidez e alterações sensoriais desagradáveis da bebida, afetando negativamente não só a qualidade do produto final, mas também comprometendo a aceitação do consumidor (SAKAMOTO, 2003; MUNFORD, 2017).

São vários os micro-organismos deteriorantes da cerveja, entre os quais se destacam as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas incluem bactérias ácido lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, e são reconhecidas como as bactérias mais perigosas para cervejarias, uma vez que esses micro-organismos são responsáveis por aproximadamente 70% dos incidentes microbianos de deterioração da cerveja (BACK, 1994; SAKAMOTO, 2003). Os lactobacilos cervejeiros são heterofermentativos e homofermentativos, produzindo ácido láctico e acético, dióxido de carbono, etanol e glicerol como produtos finais e diacetil produzido por algumas espécies. Os pediococos são homofermentativos e possuem seis espécies identificadas, mas a espécie predominante encontrada na cerveja é a *Pediococcus damnosus*, sendo sua infecção caracterizada pela formação de ácido láctico e diacetil (VENTURINI, 2010). As bactérias Gram-negativas mais significativas são as bactérias ácido acéticas, como as do gênero *Zymomonas* e certos membros de *Enterobacteriaceae*, por exemplo *Rahnella* e *Hafnia*, *Acidaminococcaceae*, *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas* e *Zymophilus* (HILL, 2009).

### **3.5.2.1. Bactérias ácido lácticas**

As bactérias ácido lácticas (BAL) são micro-organismos gram-positivos, catalase-negativa e imóveis. Elas são microaerófilas, com capacidade ainda de realizar a fermentação em anaerobiose, bem como em aerobiose, mas de uma forma mais lenta. Uma grande porcentagem das espécies, incluindo *L. brevis*, *L. lindneri* e *P. damnosus*, apresenta tolerância a

níveis elevados de ácidos orgânicos e aos constituintes antimicrobianos do lúpulo, fazendo que com que elas apresentem crescimento não só no mosto, mas como também nas fases de fermentação e maturação e cerveja acabada (JESPERSEN AND JAKOBSEN, 1996; SAKAMOTO,2003; FERNANDES, 2012).

Quanto aos efeitos deteriorantes na cerveja, sabe-se que as bactérias ácido lácticas causam turbidez, acidez e odores desagradáveis devido à formação de vários produtos metabólicos. O odor desagradável mais importante associado com as bactérias ácido lácticas é a característica doce, manteigosa ou de mel, fornecida pelo diacetil (2,3-butanodiona) e/ou pela dicetona vicinal relacionada (2,3-pentanodiona). (BRIGGS et al., 2004; HOUGH et al., 1982). Algumas estirpes, nomeadamente *P. damnosus*, tem a capacidade de tornar a cerveja viscosa, devido a produção de um composto gelatinoso, formado por um heteropolímero complexo contendo unidades de glicose, manose e ácidos nucleicos. A *L. brevis* pode também causar super atenuação na cerveja devido à capacidade de fermentar dextrinas e amido (JESPERSEN AND JAKOBSEN, 1996; SAKAMOTO,2003; FERNANDES,2012).

O desenvolvimento das bactérias lácticas ocorrer por ocorrem duas vias principais de fermentação de hexoses, a homofermentação e a heterofermentação, as quais diferem na maneira de clivagem da cadeia de 6 carbonos, gerando diferentes produtos finais. A homofermentação, característica dos *Pediococcus* e de alguns *Lactobacillus*, envolve a clivagem da frutose-1,6-difosfato pela enzima aldolase, formando duas triose-fosfato, que são convertidas em lactato via piruvato. Na heterofermentação, praticada pelos *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus*, ocorre a oxidação da glicose-6-fosfato formando gluconato-6-fosfato, que é descarboxilado a xilulose-5-fosfato. Este composto é posteriormente clivado por uma fosfocetolase rendendo triose-fosfato e acetil-fosfato. A triose-fosfato é convertida a lactato via piruvato, enquanto que o acetil-fosfato pode ser precursor tanto do etanol quanto do acetato, dependendo do potencial de oxidação – redução do sistema. Portanto, a partir da glicose são formadas quantidades equimolares de CO<sub>2</sub>, lactato e etanol ou acetato (DRAGONE, et. al. 2007)

### **3.5.2.2. Bactérias ácido acéticas**

As bactérias ácido acéticas (AAB) são micro-organismos Gram-negativos, bactérias estritamente aeróbicas que oxidam principalmente o etanol em ácido acético. Elas são catalase positivas e oxidase negativas. O pH ideal para o crescimento de AAB é de 5 a 6,5, enquanto eles podem crescer com valores de pH mais baixos entre 3 e 4. O seu crescimento é altamente

dependente da disponibilidade de oxigênio molecular. No entanto, sob condições encontradas durante a produção de cerveja, como por exemplo, fermentação alcoólica ou maturação, podem ser utilizados aceitadores de elétrons terminais alternativos, tais como quinonas. Conseqüentemente, as bactérias ácido acéticas podem sobreviver sob condições quase completamente anaeróbicas que estão geralmente presentes durante a produção de vinho, como também cerveja. Sob essas condições, as bactérias também podem exibir crescimento limitado (GULLAMÓN,2011).

Além da produção de acetato, as bactérias ácido acéticas produzem outras substâncias como ácidos orgânicos, celulose, surfactantes e pigmentos, e exibe propriedades fisiológicas e fenotípicas interessantes, incluindo produção de biomateriais e fixação de nitrogênio (RASPOR, 2008; CHOUAIA, 2014; TRČEK, 2015; KIM, 2018). Também são bem conhecidas pela capacidade de oxidar rapidamente e incompletamente substratos de carbono, especialmente açúcares e álcoois (GIUDICI et al., 2006). A indústria cervejeira também tem dado grande atenção às bactérias Gram-negativas aeróbias, principalmente às bactérias ácido acéticas *Gluconobacter* e *Acetobacter*, as quais são capazes de converter etanol em ácido acético, resultando conseqüentemente em um desagradável odor de vinagre (JESPERSEN e JAKOBSEN, 1996; SAKAMOTO e KONINGS, 2003; DRAGONE et al, 2007). Elas são resistentes aos compostos amargos do lúpulo, ácidos e etanol, e podem contaminar a cerveja com a presença de ar no espaço vazio (*headspace*) de garrafas e latas, como resultado de envasamento imperfeito (SAKAMOTO e KONINGS; 2003; DRAGONE et al, 2007; FERNANDES, 2012).

### **3.5.3. Limpeza e Sanitização**

Um dos requisitos para o sucesso da fermentação, a etapa responsável pelo álcool e o equilíbrio entre os diferentes sabores da cerveja, é fornecer um ambiente favorável para que as leveduras possam metabolizar. No entanto, este mesmo ambiente se mostra favorável a outros micro-organismos que geram características indesejáveis, por este motivo é necessário garantir que as populações destes micro-organismos sejam dizimadas ou minimizadas e, assim, não oferecer riscos ou competição ao crescimento das leveduras. Idealmente, esta etapa seria realizada pela esterilização, mas, dada as dificuldades de implementação deste processo, isso é alcançado por meio da limpeza e sanitização (PALMER, 2006; PAPAIZIAN, 2014; TOSTES, 2015).

Entende-se por limpeza a remoção de resíduos dos equipamentos. Esta remoção pode ser por ação física, química ou térmica. Em uma cervejaria, existem quatro pilares para que a limpeza ocorra de forma eficiente: o tempo, o tipo de ação mecânica adotada, a concentração química adotada e a temperatura. O cervejeiro pode controlar a interação entre estes quatro pilares, por exemplo, se a concentração da substância química for elevada, com alta temperatura e ação mecânica, o tempo de limpeza pode ser reduzido (OCKERT, 2006).

De modo geral, o mecanismo para controle e eliminação de micro-organismos aderentes às superfícies requer uma limpeza prévia com ação química de um detergente, com o objetivo de desagregar ou desprender todo o tipo de sujidade agarrada às superfícies, que posteriormente é arrastado pela água de enxague. Apesar de com a limpeza não se pretender a destruição dos micro-organismos, verifica-se que na eliminação de sujidade, na fase de enxague, ocorre uma importante redução do número de microrganismos que eventualmente estejam presentes (BAPTISTA, 2003; FERNANDES, 2012).

Assim, se a limpeza for realizada de forma rigorosa, obtém-se também uma diminuição parcial do nível de contaminação inicial, porém esta redução não significa que os micro-organismos foram destruídos, mas apenas deslocados do local original para outro, uma vez que os detergentes não têm ação microbiológica. Devido a este fator, esta primeira etapa de higienização, segue-se frequentemente um tratamento complementar com um agente desinfetante e /ou agente esterilizante de modo a eliminar ou reduzir a população de micro-organismos viáveis eventualmente presentes nas superfícies e evitar o seu crescimento durante o tempo de produção. A ação desinfetante, realizada na indústria cervejeira através do uso de agentes químicos (ex. ácido peracético, peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro) visa a eliminação de todos os micro-organismos com exceção dos esporos bacterianos. Com a esterilização, por outro lado, consegue-se a destruição ou eliminação completa de todas as formas de vida microbianas, incluindo a eliminação dos esporos (KALIL AND COSTA, 1994; FERNANDES, 2012).

### ***3.5.3.1. Agentes de químicos***

A escolha do produto de limpeza deve ter em consideração o tipo de sujidade assim como a natureza das superfícies a limpar e o método de limpeza mais adequado. Levando em consideração a composição da cerveja normalmente são utilizadas as limpezas alcalina e ácida. A limpeza alcalina é direcionada para o tratamento de sujidades de carácter orgânico, removendo os resíduos proteicos e gordurosos das superfícies, além de ter propriedades

germicidas. É realizada por detergentes alcalinos desengordurantes, sendo a soda cáustica o mais utilizado. A limpeza ácida é utilizada para o tratamento de sujidades de carácter inorgânico, sendo realizada por detergentes ácidos (ex. acético, nítrico, clorídrico, sulfúrico) (BAPTISTA, 2003).

### **3.5.3.2. CIP (*Cleaning In Place, Limpeza no local*)**

Independentemente das atividades de limpeza manual que sejam realizadas no decurso da produção e limpeza, no final de cada ciclo de produção deve-se proceder a uma limpeza e desinfecção sistemática dos equipamentos, circuitos e instalações, de forma a eliminar ou, pelo menos, reduzir para níveis aceitáveis a quantidade de contaminantes microbiológicos potencialmente presentes (BAPTISTA, 2003; FERNANDES, 2012)

O sistema *Clean in Place* (CIP) é um método de higienização das máquinas e dos equipamentos de processamento (tanques, trocadores de calor, etc.), usadas nas indústrias de alimentos e bebidas. Tem como diferenciais de uma manutenção tradicional o fato de ser realizado com as máquinas e equipamentos fechados, não sendo necessário o desmonte das partes e das peças desses. Essa limpeza é desempenhada em etapas, sendo que em cada etapa é circulado um tipo de produto químico através das tubulações a uma temperatura adequada. A eficiência do sistema CIP depende do perfeito funcionamento entre os itens que o compõe, como instalações sem pontos mortos, com soldas sanitárias e projeto de linha adequado, de modo que permita a drenagem completa do fluido, turbulência adequada para promover correta ação mecânica, tempo de ação e concentração dos agentes de limpeza, temperatura, além de pessoal treinado para realização do procedimento (FORNI, 2007).

Sem a correta remoção de sujidades, os equipamentos da cervejaria principalmente suas fendas podem sofrer corrosão. Além disso, a cerveja é um produto alimentício e como tal deve ser produzida seguindo as boas práticas de fabricação (OCKERT, 2006).

### **3.5.4. Procedimentos Operacionais Padrões.**

Para que se tenha um padrão de elaboração nos processos de produção de alimentos o Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura e Abastecimento e Agência Nacional de Vigilância Sanitária elaboraram legislações com as exigências, que é um conjunto de diretrizes e regulamentos determinados pelas autoridades, para que os produtores de alimentos pudessem seguir e manter essa qualidade nos processos e saúde dos consumidores (SOUZA, 2012). No

Brasil, a Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, estabelece os requisitos gerais sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. A RDC 275, de 21 de outubro de 2002, é ato normativo complementar à Portaria nº326, introduz o controle contínuo de BPF e os Procedimentos Operacionais Padrões (POP).

O POP tem o objetivo de padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução de tarefas fundamentais, para o funcionamento correto do processo. Um POP elaborado de forma coerente garante ao usuário que a qualquer momento que ele se dirija ao estabelecimento, as ações tomadas para garantir a qualidade sejam as mesmas, de um turno para outro, de um dia para outro. Ou seja, aumenta-se a previsibilidade de seus resultados, minimizando as variações causadas por imperícia e adaptações aleatórias, independente de falta, ausência parcial ou férias de um funcionário. Os procedimentos operacionais padronizados – POPs – surgem como uma exigência da vigilância sanitária, através da RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002, como um instrumento que contribui para a garantia das condições higiênico-sanitárias necessárias ao processamento e industrialização dos alimentos (BRASIL, 2002).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA e SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo; Edgard Blücher, Cap. 15, p. 347-382, 2005.

ALMEIDA, F. S.; SILVA, C. A. A.; LIMA, S. M.; SUAREZ, Y. R.; ANDRADE, L. H. C. Uso da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para monitorar os açúcares no processo de esmagamento de cerveja. **Química Alimentar**, v. 14, p. 112-118, 2018

AQUARONE, E.; LIMA, U.A; BORZANI, W. - BIOTECNOLOGIA Alimentos e bebidas produzidos por fermentação Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo, v. 5, 1983.

AQUILANI, B. ; LAURETI, T. ; POPONI, S. ; SECONDI, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**, v. 41, p. 214-224, 2015

ARAÚJO, F.B.; SILVA, P.H.A.; MINIM, V.P.R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.121-128, 2003.

BACK, W. Secondary contaminations in the filling área. **Brauwelt International**, v. 4, p. 326-333,1994.

BAMFORTH, C. W., & BARCLAY, A. H. P. Malting technology and the uses of malt. In A. W. MacGregor, & R. S. Bhatta (Eds.). **Barley: Chemistry and Technology Am. Assoc. Cereal Chem.** (St. Paul, MN. DUBOIS),1993

BAPTISTA, P. Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar. **Forvisão, Consultadoria em formação integrada**, v.1, 2003.

BELETI, M. A.; DUARTE, F.; KRHEMER, J. E. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)  $\beta$ -glucanases e degradação de  $\beta$ -glucanos durante a malteação. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 467-473, 2012.

BELTRAMELLI, M. Cervejas, brejas e birras: um guia completo para desmistificar a bebida mais popular do mundo. 1ª ed. São Paulo: Leya, 2012

BOKULICH, N. A., & BAMFORTH, C. W.. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, p. 157–172, 2013

BRASIL, 2009. DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei n o 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

BRASIL, 2013. PROJETO DE LEI Nº 5.191/13. Projeto de lei que dispõe sobre a produção de cerveja artesanal.

BRASIL, 2015, DECRETO Nº 8.442, DE 29 DE ABRIL DE 2015. Regulamenta os art. 14 a art. 36 da Lei nº 13.097, de 19 de janeiro de 2015, que tratam da incidência do Imposto sobre Produtos Industrializados - IPI, da Contribuição para o PIS/Pasep e da Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social - Cofins, no mercado interno e na importação.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas

práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Brasília, Diário Oficial da União, 1º de ago. 1997.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing: Science and Practice. **Boca Raton: CRC Press**, p. 606-649, 2004

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; SIESTO, G.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy valueadded. **International Journal of Food Microbiology**. v.284, p. 22-30,2018

CASTILHO, M. A. ; MAYMONE, A.; OLIVEIRA, L. Y. Q. Cervejaria artesanal: modelo de fábrica diferenciado com ênfase no baixo impacto ambiental a ser implantado no município de Campo Grande, MS. Multitemas, Campo Grande, MS, v. 21, n. 50, p. 303-326, 2016.

CHOUAIA, B.; GAIARSA, S.; CROTTI, E.; COMANDATORE, F.; DEGLI ESPOST, M.; RICCI, I.; ALMA, A.; FAVIA, F.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D. Acetic acid bacteria genomes reveal functional traits for adaptation to life in insect guts. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, p. 912-920, 2014

DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, vol.23, n.1, pp.108-112, 2000

DRAGONE, G. ALMEIDA e SILVA, J.B. In: VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia**, São Paulo: Edgard Blücher, v.1, 2010.

DRAGONE, G. *et al.* Revisão: Produção de Cerveja: Microrganismos Deteriorantes e Métodos de Detecção. **Brazilian Journal of Food Technology**, Preprint Serie, n. 298, 2007.

EYRES, G., MARRIOTT, P., LEUS, M., & LYSAGHT, B. Characterisation of impact aroma compounds in hop essential oils. In Flavour Science: Proceedings of the XIV Weurman Flavor Research Symposium; Taylor, A. J.; Mottram, D. S., Eds.;Context Products Ltd.: Packington, UK; p 19-2, 2015

FERNANDES, F. A. P. Melhoria dos indicadores microbiológicos em linhas de enchimento de cerveja em barril. Dissertação de mestrado (Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciência e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

FORNI, R. Projeto Mecânico de um Sistema de Higienização CIP (Cleaning in Place). 2007. 114 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Mecânica, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

- FOX, G. P. Chemical Composition in Barley Grains and Malt Quality. **Queensland Grains Research Laboratory**, p. 63–98., 2010
- GARBIN, Ramon Figueira. Turismo cervejeiro: a cerveja artesanal brasileira, 2017.
- GIUDICI, P.; GULLO, M.; SOLIERI, L.; DEVERO, L.; LANDI, S.; PULVIRENTI, A.; RAINIERI, S. Gli aceti del mondo. Diabasis (Ed.), Le fermentazioni dell'aceto balsamico tradizionale, Reggio Emilia, p. 7-13, Italy, 2006.
- GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M. et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 79 – 97, 2002.
- HILL, A. E. Microbiological stability of beer. Beer, p. 163-183, 2009.
- HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer. 2 ed. London: Chapman e Hall, p. 389-914, 1982.
- HOUGH, J.; S, BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. Beer Flavour and Beer Quality Malting and Brewing Science. **Hopped Wort and Beer**, v.2, p. 839-883, Boston, MA: Springer US, 1982
- HÚNGARO, H.M.; PEÑA, W.E.L.; .SILVA N.B.M; CARVALHO, R.V.; ALVARENGA; A.S; .SANT'ANA, V.O. Food Microbiology. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, p. 213-231, 2014
- JACKSON, M.. Cerveja. Traduzido por Marina Slade Oliveira. 2ª edição- Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 2010.
- JESPERSEN, L., JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal Food Microbiology**, v. 33, p. 139-155, 1996
- JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 139-155, 1996.
- Kalil, E. M., Costa, A. J. F. Desinfecção e esterilização. **Acta Ortop**, v.2, p. 1-4, 1994.
- KARABÍN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology Advances**. v. 36, n. 3, p. 691-706, 2018.
- KIM, K. H.; CHO, G. Y.; CHUN, B. H.; WECKX, S.; MOON, J. Y.; YEO, S.; OKJEON, C. *Acetobacter oryzifermentans* sp. nov., isolated from Korean traditional vinegar and reclassification of the type strains of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (Henneberg

- 1898) and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus* (Frateur 1950) as *Acetobacter ascendens* sp. nov., comb. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 324-332, 2018
- LIMA, U. de A; BASSO, LC; AMORIM, HV. Produção de Etanol. In: Almeida Lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. Biotecnologia Industrial (Processos Fermentativos e Enzimáticos), v.3, p. 01-43. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.
- LIU, J.; DENG, Y.; PETERS, B. M.; LI, L.; LI, B. *et al.* Transcriptomic analysis on the formation of the viable putative non-culturable state of beer-spoilage *Lactobacillus acetotolerans*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 36753, 2016.
- LIU, J.; LI, L.; LI, B.*et al.* Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 257-261, 2010
- LIVENS, S. Beer: Fermentation. Reference Module in Food Science, **Encyclopedia of Food and Health**, p. 339-344, 2016
- MAIA, T. S.; BELO, R. F. C. Análises físico- químicas de cerveja artesanal elaborada com graviola e análise sensorial de cervejas com adição de frutas e frutadas comercializadas. Revista Brasileira de Ciências da Vida, [S.l.], v. 5, n. 5, 2017.
- MONTEIRO, A. Curso Operador Cervejeiro. Companhia Brasileira de Bebidas. Goiânia, 2001.
- MORADO, R. Larousse da Cerveja. Larousse do Brasil. 1ed São Paulo, 2009
- MUNFORD, A. R. G.; ALVARENGA, V. O; SILVA, L.P. ; CRUCCELLO, A. ; CAMPAGNOLLO, F. B. ; CHAVES, R. D. ; OTEIZA, J. M. ; SANT'ANA, A. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. *Food Control*, v. 81, p. 126-136, 2017
- NOGUEIRA, A. D. Lúpulo: A Essência da Cerveja. Revista Engarrafador Moderno. São Paulo: Ed. Aden. 22-29, 2010.
- OCKERT, K. MBAA Practical Handbook for the Specialty Brewer,.Brewing Engineering and Plant Operations. [S.l.]: St. Paul, Minn.: **Master Brewers Association of the Americas**, v.3, 2006.
- OETTERER et. al. Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Manole, 2006, p. 51-98.

- OLADOKUN, O., JAMES, S., COWLEY, T., DEHRMANN, F., SMART, K., HORT, J., & COOK, D. Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. **Food Chemistry**, 230, 215–224, 2017.
- OLIVEIRA, M. A. O. Produção de cerveja de baixo teor alcoólico utilizando leveduras imobilizadas em biopolímero. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju, 2011.
- OLIVEIRA, N. A. M. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. 2011. 45f. Monografia (Pós-graduação em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 2011
- OLIVER, G. A mesa do Mestre- Cervejeiro. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2012
- PALMER, J. J. How to brew. Boulder. **Brewers Publications**. Colorado, EUA. 2006.
- PAPAZIAN, C. The Homebrewer’s Companion. **Harper Collins Publishers Inc**, v. 2, New York, NY, EUA. 2014.
- POMBEIRO, M. J. O Mundo da Cerveja. SCC – Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, 2008
- RASPOR, P.; GORANOVIC, C. Biotechnological applications of acetic acid Critical. **Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 101-124, 2008
- REINOLD, M. R. Manual Prático de Cervejaria. 1.ed. São Paulo, p. 213, 1997
- RESENDE, A.G. Comunicação pessoal, Grupo Schincariol, 2004.
- RIBEIRO, B. D., DO NASCIMENTO, R. P., PEREIRA, K. S., & COELHO, M. A. Z. (2018). Microbiologia Industrial: Alimentos (Vol. 2). Elsevier, Brasil.
- SAKAMOTO, K., KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**., v. 89, p. 105-124, 2003
- SCHMIDELL, W. et al. (2001) Biotecnologia industrial. v. 3, São Paulo, Brasil.
- SHURE, T. Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras. Trabalho de Conclusão de Curso (Biotecnologia)- Uniiversidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- SILVA, H. A.; LEITE, M. A.; PAULA, A. R. V. Cerveja e Sociedade. Contextos da Alimentação. **Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, n. 2 , v. 4, 2016

SLEIMAN, Ms. Produção de cerveja com extrato de malte nas formas de xarope e pó.:análise físico-química, sensorial e energética. 2002. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Unesp, Botucatu, 2002.

SOUZA, Mariana de Albuquerque. Boas Práticas para Padarias e Confeitarias 2012. Monografia. Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

SUZIGAN, W. (2000) Indústria Brasileira: Origem e Desenvolvimento. São Paulo: Hucitec, Ed . Unicamp,.

SUZUKI, K. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteri. **Journal of the Institute of Brewing.**, v. 117, p. 131-15, 2011.

TOSTES, L. R. M. Instrumentação e controle do processo de produção de uma microcervejaria. Projeto de Graduação de Curso (Engenharia de Controle e Automação) - Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015

TRČEK, J.; BARJA, F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal Food Microbiology**, v. 196, p. 137-144, 2015

TSOCHPE, E. C., Microcervejarias e Cervejarias: A História, a Arte e a Tecnologia. São Paulo. Ed. Aden, p. 223, 2001.

VIDGREN, V.; MULTANEN, J.; ROUHONEN, L.; et al. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *Yeast Research*, v. 10, p. 402–411, 2010

VIOTTI, E. O mundo da cerveja: A Cerveja Lager. São Paulo: Folha de São Paulo, 2012.

YIN, H.; DONG, J.; YU, J.; LI, Y.; DENG, Y. A novel *horA* genetic mediated RCA detection of beer spoilage lactobacillus. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 311-314, 2018.

## CAPÍTULO II

### CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL

Maria Carolina Rafael Carneiro de Menezes, Marcos Fellipe Silva, Tatiana Souza Porto

MENEZES, M. R. C ;SILVA, M. F; PORTO, T. S.

Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns; Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns – PE.

#### RESUMO

A qualidade da cerveja pode ser comprometida por vários fatores durante o seu processo de fabricação, sejam eles inerentes ao próprio processo ou microbiológicos, como a presença de micro-organismos contaminantes. A cerveja apresenta condições desfavoráveis para o crescimento de micro-organismos, porém alguns deteriorantes da cerveja ainda conseguem se multiplicar levando a alterações tais como aumento da turbidez e desagradáveis mudanças sensoriais, as quais afetam negativamente a qualidade do produto final. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi realizar controle dos micro-organismos contaminantes do processamento de cerveja artesanal e avaliar a eficácia do sistema de *cleaning in place* dos principais pontos críticos. Os meios utilizados para análises se mostraram eficientes, porém com baixa seletividade apresentando o crescimento de leveduras, sendo necessário a utilização de antibióticos. Quanto ao processo de CIP, não foi detectado o crescimento de micro-organismos após a sanitização do fermentador, porém, tal comportamento não se repetiu no barril, apresentando crescimento de bactérias ácido lácticas mesmo após a limpeza, tornando-se, assim, necessárias mudanças nos parâmetros da CIP. Estas mudanças foram descritas em um POP, com todos os detalhes para a execução correta e de forma eficiente. Este estudo é uma importante ferramenta para controle microbiológico em cervejaria, sendo relevante tendo em vista a carência de dados para cervejas artesanais no Brasil atualmente.

**Palavras-chave:** Controle de qualidade, contaminantes de cerveja, cerveja artesanal, POPs.

## 1. INTRODUÇÃO

Em resposta ao aumento da demanda do consumidor por produtos diferenciados e de alta qualidade, hoje em dia, há um aumento mundial na popularidade de cervejas artesanais, uma nova geração de produtos obtidos em pequenas cervejarias que estão focados na produção de cervejas com estilos diferenciados quando comparado a cervejas tradicionais. Cerveja artesanal é geralmente não filtrada, não pasteurizada e sem nitrogênio ou pressão de dióxido de carbono. Os produtores enfatizam sabor típico e característico de suas cervejas, devido à adição de frutas, ervas, e especiarias que podem transformar cerveja comum em cerveja de especialidade, ao longo com outros aromas e substratos fermentáveis (AQUILANI et al., 2015).

A cerveja é caracterizada como uma bebida de singular estabilidade microbiológica devido a diversos fatores que contribuem para que a cerveja seja um meio desfavorável para a multiplicação de vários micro-organismos, como a sua concentração de etanol varia entre 0,5 até 10%, seu pH normalmente ácido com valores entre 3,8 e 4,7, sendo este o valor mínimo que a maioria das bactérias pode tolerar para crescer. Além disso, a alta concentração de CO<sub>2</sub> e o baixo conteúdo de oxigênio faz com que a cerveja seja um meio próximo ao anaeróbio. Apesar dessas características desfavoráveis, alguns micro-organismos deteriorantes da cerveja ainda conseguem se multiplicar nessas condições e a presença destes pode causar alterações indesejáveis, tais como aumento da turbidez e desagradáveis mudanças sensoriais, as quais afetam negativamente a qualidade do produto final (SUZUKI et al., 2006; SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Durante a produção da cerveja é necessária uma grande atenção quanto a higiene no processo. Falhas na limpeza e sanitização podem resultar em contaminação e deterioração da cerveja, e qualquer resíduo ou micro-organismo não desejado pode gerar desvios de sabor que impossibilitam a consistência dos resultados independente da rigorosidade das etapas do processo. O desleixo neste aspecto pode até mesmo tornar o produto final intragável (PALMER, 2006; TOSTES, 2015). Os micro-organismos contaminantes da indústria cervejeira podem ser definidos como qualquer organismo que não foi propositadamente introduzido e que é apto a sobreviver e proliferar no meio (mosto, cerveja após filtração ou produto acabado) (HUGHES AND BAXTER, 2001).

Do ponto de vista microbiológico, a produção de cerveja pode ser dividida em: pré-caldeira e pós-caldeira. Algumas contaminações são toleradas até o material ser levado à fervura. Após a fervura o risco de contaminação é alto e o material deve ser tratado com muita

cautela (BAMFORTH, 2003). A adição da cultura fermentadora deve ser rápida para minimizar o risco de infecções que podem ocorrer no mosto que não foi inoculado. Essa cultura deve ser de alto grau de pureza, pois apesar da cerveja ser um substrato relativamente pobre, alguns micro-organismos conseguem se desenvolver (BRIGGS, 2004).

Dentre os principais requisitos percebidos pelo consumidor para uma cerveja de qualidade encontram-se sobretudo aqueles relacionados com as suas propriedades organolépticas. No entanto, tais requisitos podem ser afetados negativamente por contaminações microbiológicas, o que pode comprometer seriamente a imagem da cerveja ou da Empresa que a produz junto do mercado (FERNANDES, 2012). Um exemplo de contaminante são as bactérias, sendo as que mais trazem problemas para as microcervejarias são as bactérias do gênero *Lactobacillus*, bem como as bactérias do gênero *Pediococcus*, que podem produzir diversos aromas indesejados nas cervejas (SUHRE, 2014; CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006). A presença destes micro-organismos tende resultar na comercialização de cervejas que, ao longo do tempo, podem apresentar os típicos sinais de contaminação microbiana, neste caso, as cervejas ficam turvas, ácidas e com odores desagradáveis. O odor desagradável mais importante relacionado à contaminação por bactérias dos gêneros *Lactobacillus e Pediococcus* é o de manteiga, fornecido pelo diacetil (2,3-butanodiona). Por isso, há um crescente interesse em pesquisar métodos novos de detecção de contaminantes que sejam mais rápidos e específicos (SUHRE, 2014; SAKAMOTO et al., 2001).

A alta qualidade dos métodos utilizados em laboratório é requisito exigido para a inovação tecnológica dos resultados gerados por empresas e instituições de pesquisa. O reconhecimento desses resultados depende da qualidade em que foi gerado e da estrutura organizacional que proporcionou a origem da pesquisa. É nesse âmbito que os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) se enquadram, pois visam à padronização de métodos por meio de procedimentos descritos em toda a sua amplitude de aplicação, sejam eles técnicos ou organizacionais (SILVA, 1994; DANTAS, 2013). A falta de padronização dos procedimentos, inexistência de normas e rotinas, e a não utilização de metodologia padrão podem indicar desorganização do serviço devido às diferentes formas de conduta profissional. Por isso, os padrões são definidos visando o estabelecimento das diretrizes para o controle e melhoria contínua da qualidade. Os cuidados padronizados são diretrizes detalhadas que representam o atendimento previsível, indicado para situações pontuais o que irão impulsionar as organizações para o desenvolvimento da melhoria de seus processos e resultados (SILVA, 2002; DANTAS, 2013).

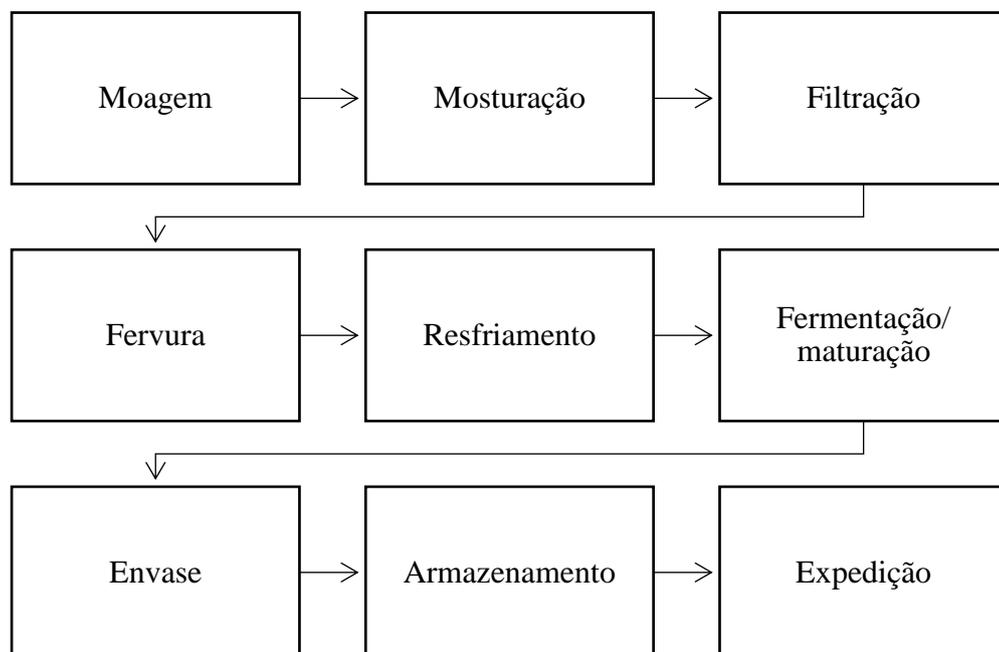
Deste modo o presente trabalho teve como objetivo padronizar e aplicar métodos microbiológicos para analisar os micro-organismos contaminantes do processamento de cerveja artesanal e avaliar a eficácia do sistema de *cleaning in place* dos principais pontos críticos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Fluxograma do processo

Durante a produção de cerveja as maiores possibilidades de contaminação estão relacionadas com os procedimentos executados. Para controle, é preciso definir os pontos críticos do mapa de processo e aplicar as boas práticas de fabricação. Para um melhor entendimento destes processos apresenta-se na Figura 1 o fluxograma geral do processo de fabricação.

**Figura 1:** Fluxograma processo de fabricação da cerveja artesanal.



A produção da cerveja inicia-se com a pesagem e moagem do malte. Após esta etapa, o malte é enviado para o tanque de mostura onde é misturado à água e submetido ao aquecimento. A mostura obtida é bombeada para o tanque de clarificação onde ocorre a separação da casca da mistura. Após a filtração, o mosto retorna ao tanque de fervura, onde é adicionado o lúpulo. A mistura é fervida por volta de 1 hora com temperaturas de aproximadamente 80 °C.

Terminada a fervura, a mosto fervido é resfriado no mesmo tanque, até alcançar 28°C. Depois de resfriado, o mosto segue para o tanque de fermentação. Após a fermentação, é realizada a maturação no mesmo tanque. Depois de maturada, a cerveja está pronta e permanecerá armazenada no fermentador, e seguirá para o envase a depender da demanda de mercado.

## **2.2. Determinação dos pontos de coleta**

Foram recolhidas amostras representativas dos principais pontos a serem avaliados e que exercem importância sobre a qualidade microbiológica da cerveja, o fermentador e os barris utilizados no armazenamento do produto. Todas as amostras foram coletadas antes e após a etapa de CIP (*clean in place*), para que fosse avaliada a sua eficácia. A amostra oriunda do fermentador foi obtida a partir da adição de 500 mL de água estéril no interior do tanque, através da entrada superior do equipamento. Este procedimento foi realizado de forma que toda água adicionada entrasse em contato com a superfície interna. Posteriormente, o líquido foi recuperado através da válvula inferior do tanque e armazenado em um frasco de borosilicato estéril. A coleta no barril ocorreu de forma semelhante ao fermentador, sendo adicionados 250 mL de água estéril pela válvula de entrada, procedendo à sua agitação e rolamento no chão em todas as direções, para um maior contato da água com as paredes do barril. O líquido foi recuperado em seguida em um frasco de borosilicato estéril invertendo-se o barril.

## **2.3. Cleaning in place dos pontos avaliados**

A CIP dos barris e do fermentador ocorreram de forma semelhante. Inicialmente foi executado um enxágue com água para retirada das sujidades mais grosseiras, como os resíduos de lúpulo e levedura. Na segunda etapa ocorreu a higienização com a utilização de um detergente alcalino clorado, e após o enxágue do detergente, foi utilizado um sanitizante alcalino e em seguida realizado o enxague com água novamente. Por fim, foi feito um último enxágue com solução de água com ácido peracético. A única diferença entre a CIP dos equipamentos avaliados foi devido a temperatura do sanitizante alcalino, que para o fermentador foi aplicado em uma faixa de aproximadamente 60°C, enquanto que no barril o procedimento de limpeza foi realizado a temperatura ambiente.

## **2.3.4. Análises microbiológicas**

#### ***2.4.1. Filtração por membrana***

Todas as amostras descritas anteriormente foram filtradas assepticamente através de um sistema de filtração acoplado a bomba vácuo. A membrana estéril utilizada foi de ésteres mistos de celulose (S-Pak TM Membrane Filter, Millipore Corporation) com porosidade 0,45 µm para concentração dos eventuais micro-organismos presentes. Após filtração as membranas foram transferidas assepticamente para uma placa de Petri e colocadas sobre um meio de cultura específico, conforme o tipo de micro-organismo a avaliar. As análises foram realizadas em duplicata e a contagem foi realizada através do número significativo de UFC/mL de amostra.

#### ***2.4.2. Detecção de Bactérias Ácido Lácticas (Meio Raka-Ray)***

Para a detecção de bactérias ácido lácticas (BAL), as membranas foram colocadas em placas com meio Raka-Ray Agar N.º 3 (Difco – cat. N.º. 218671) preparado com água ultrapura com 0,001% de polisorbato 80 para uma maior absorção dos nutrientes contidos no meio pelas bactérias, e incubadas em condições de anaerobiose, em jarra anaeróbica com gerador de anaerobiose da marca Probac, durante 5 dias a 26°C ± 1° C. Após a incubação foi realizada a contagem das colônias. Também foi realizado um teste confirmativo com o método de coloração de Gram.

#### ***2.4.3. Detecção de Bactérias Ácido Acéticas (Meio AAM)***

Para a detecção de bactérias ácido acéticas (AAB) as membranas foram colocadas em placas com meio ágar de isolamento, conforme a metodologia descrita por descrito por Yamada et al. (2000). O meio de isolamento continha 2,0 % de D-glicose, 0,8% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 0,5% de etanol, 0,3 % de CaCO<sub>3</sub> e 1,5% de ágar. Após incubação, que foi em ambiente aeróbico (Jarra de anaerobiose), durante 3 dias a 30°C ± 1°C as colônias foram avaliadas.

#### ***2.4.4. Detecção de bactérias produtoras de ácido (Meio Teckback)***

Para a detecção de bactérias produtoras de ácido (BAL e AAB), as membranas foram colocadas em placas com meio Teckback do Kit de controle microbiológico em cervejaria da marca Levteck, e incubadas em condições de anaerobiose durante 5 dias a 28°C ± 1°C. De acordo com as instruções do fabricante, o meio modifica sua coloração de cinza para amarelo

na presença de bactérias produtoras de ácido, e qualquer unidade formadora de colônia identificada, pode ser considerada um contaminante.

#### ***2.4.5. Coloração de Gram***

Foi adicionado uma gota de água destilada em uma lâmina, posteriormente com uma alça bacteriológica flambada, foi coletada uma pequena quantidade da colônia a ser analisada e homogeneizou-se a colônia com a água destilada. Após o esfregaço, foi realizada a fixação por calor, passando a parte de trás da lâmina logo acima do fogo, por 4 ou 5 vezes ou até que todo o esfregaço ficasse seco, dando intervalos de alguns segundos para não ocorrer alteração da morfologia celular. Em seguida o esfregaço foi coberto com violeta de genciana por 1 minuto. Posteriormente, retirou-se o excesso e foi adicionado Lugol por 1 minuto. Em seguida, lavou-se com água destilada e foi adicionado álcool-acetona por 30 segundos até que todo o excesso de violeta de genciana fosse eliminado e logo após foi lavado com água corrente. Na última etapa cobriu-se o esfregaço com Fucsina por 30 segundos e o excesso foi retirado com água destilada. Por fim, a parte posterior da lâmina foi seca, retirando as manchas de corante que dificultam a visualização ao microscópio. Após as lâminas estarem secas, foi realizada a observação com microscópio da marca Zeiss, com lente objetiva de 400x, utilizando óleo de imersão.

#### ***2.4.6. Elaboração do Procedimento Operacional Padronizado***

Foi revisado o POP existente na cervejaria e elaborado um novo POP para a CIP dos equipamentos avaliados, a partir dos resultados obtidos das análises microbiológicas, aplicando ações corretivas e de melhoria para que a etapa de higiene fosse realizada de melhor forma, evitando possíveis problemas ou contaminação devido a operação realizada de forma errada durante este processo.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### ***3.1. Pontos de monitoramento***

Os pontos de monitoramento da cervejaria artesanal escolhidos foram as etapas após a fervura correspondente a as etapas de fermentação e envase, tendo em vista que estes são importantes pontos críticos do controle microbiológico do processo.

Durante a produção de cerveja algumas contaminações são toleradas até o material ser levado à fervura. Após a fervura, o risco de contaminação é alto e o material deve ser tratado com muita cautela (BAMFORTH, 2003). No decorrer deste processo, o mosto permanece em temperaturas entre 75 a 85°C por um período de aproximadamente 70 minutos (RIBEIRO et al., 2018). Temperaturas elevadas possuem efeitos destrutivos sobre os micro-organismos. O calor desnatura as proteínas e inativa as enzimas necessárias ao metabolismo microbiano, destruindo desta forma parte ou todos os micro-organismos. Entretanto, o calor não possui efeito residual, isto é, depois de terminada a sua ação, pode ocorrer a “recontaminação” do produto, em etapas como a fermentação e o envase (LOPES, 2007).

Na cervejaria onde foi realizado o estudo, depois de fermentada e maturada, a cerveja permaneceu no fermentador, e foi envasada em barris ou garrafas de acordo com a demanda de mercado. As garrafas utilizadas não são reutilizáveis, ou seja, o risco de contaminação por micro-organismos deteriorantes da cerveja é baixo. Já os barris, são retornáveis e regressam à fábrica com elevado nível de resíduos e sujidades no interior.

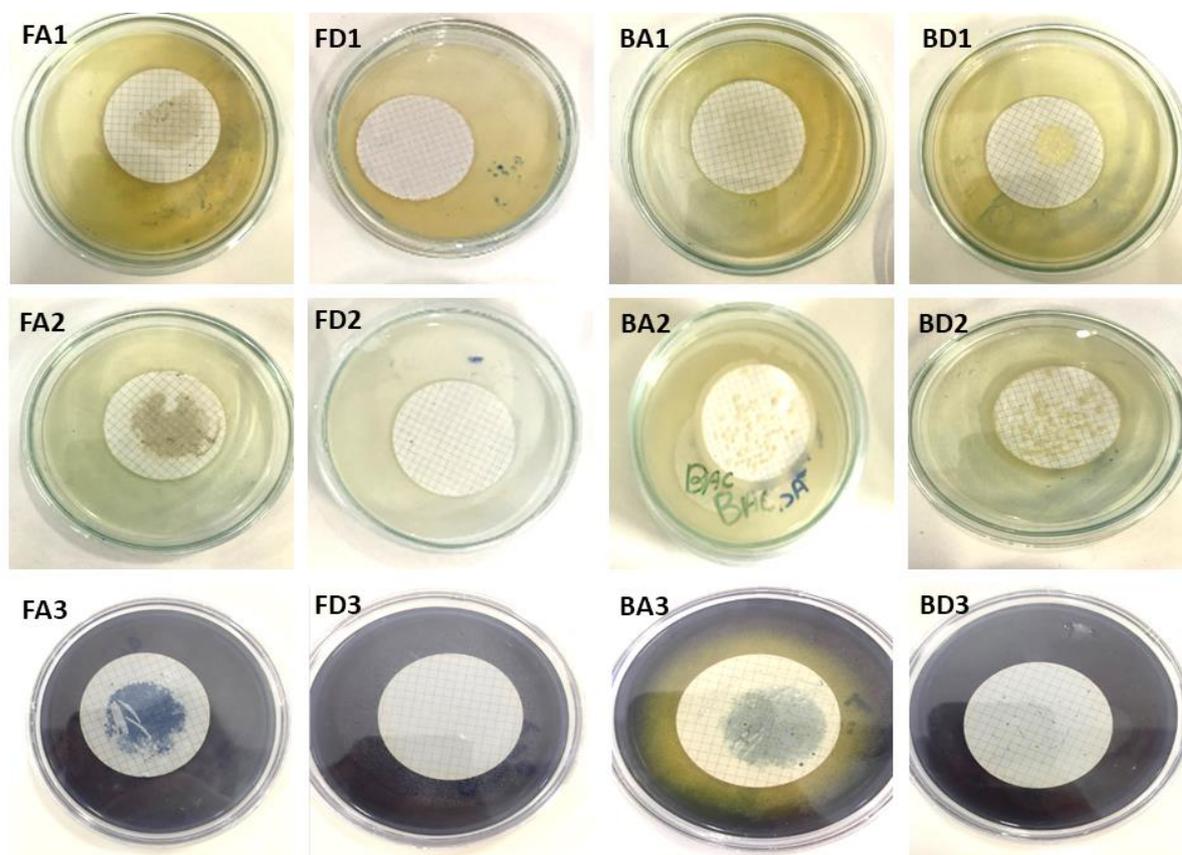
Um fator de relevância quanto a higiene interna são as dimensões dos barris, que ocasionam maior acumulação de restos de cerveja e em comparação às garrafas, apresentam maiores problemas de garantia da qualidade microbiológica (FERNANDES, 2012). Tendo em vista estes fatores, os pontos de coleta determinados foram o fermentador e barris antes e após a etapa de CIP, para uma verificação da garantia da qualidade dos procedimentos de limpeza e desinfecção destes equipamentos.

#### ***3.2. Detecção de bactérias lácticas e ácido acéticas deteriorantes da cerveja e eficácia da CIP***

A Figura 2 mostra a presença de contaminantes nos ensaios envolvendo as amostras antes da CIP para todos os pontos coletados (FA1, FA2, BA1, BA2 e BA3). Após a CIP, o fermentador não apresentou nenhum crescimento (FD1, FD2 e FD3), o que justifica a ausências

destas amostras nas figuras. Enquanto que, para as amostras coletadas no barril, os resultados mostraram a presença de contaminantes (BD1, BD2 e BD3).

**Figura 2.** Crescimento microbiano após os dias de incubação correspondente para cada meio de cultura utilizado. Os números 1,2 e 3 representam respectivamente os meios Raka-Ray para a detecção *Bactérias ácido lácticas*, meio AAM para a detecção de *bactérias acéticas*, e o meio Teckback para a detecção de *bactérias ácido lácticas* e *acéticas*. As siglas FA e BA representam respectivamente fermentador e barril antes da CIP, e as siglas FD e BD representam respectivamente fermentador e barril depois da CIP.



Devido à falta de inserção de antifúngicos durante a análise das placas, constatou-se que as amostras FA1, FA2, BA1, BA2 e BA3 (Figura 2) apresentaram o crescimento de colônias com aspectos morfológicos semelhantes a leveduras, como cor, textura e brilho. Colônias destes micro-organismos são pastosas ou cremosas, com aspecto brilhante, e facilmente diferenciadas das bactérias em virtude de suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas, como

a capacidade de brotamento. Sua forma é muito variável, indo desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas (REED, 2012).

As amostras do barril após a CIP demonstraram a presença bactérias ácido lácticas. O meio Raka-Ray se mostrou eficiente quanto ao seu propósito, porém com baixa seletividade devido a presença de leveduras nas amostras FA1 e BA1 (Figura 2). Para aumentar a seletividade do meio, o fabricante indicou o uso dos antibióticos cicloheximida e 2-feniletanol.

Quanto a presença de bactérias acéticas (AAB), não foi possível observar o seu crescimento nas amostras inoculadas no meio AAM (FA2, BA2 e BD2). Este tipo de bactéria apresenta característica Gram-negativa, sendo que nos ensaios só foi possível visualizar bactérias Gram-positivas (BAL) e leveduras conforme a (Figura 2).

Para a microscopia das amostras inoculadas no meio TeckBeck, todos os ensaios apresentaram BAL (FA3, BA3 e BD3), e a amostra BA3 apresentou crescimento de leveduras, confirmando a falta de seletividade. Outro fator observado foi a modificação de coloração, apenas a amostra BA3 apresentou esta mudança, porém, todas as placas apresentaram a presença de BAL, evidenciando que o meio não é confiável quanto a alteração da cor na presença de ácido, sendo necessário a realização do estudo da microscopia e perfil bioquímico das amostras para a confirmação dos micro-organismos presentes.

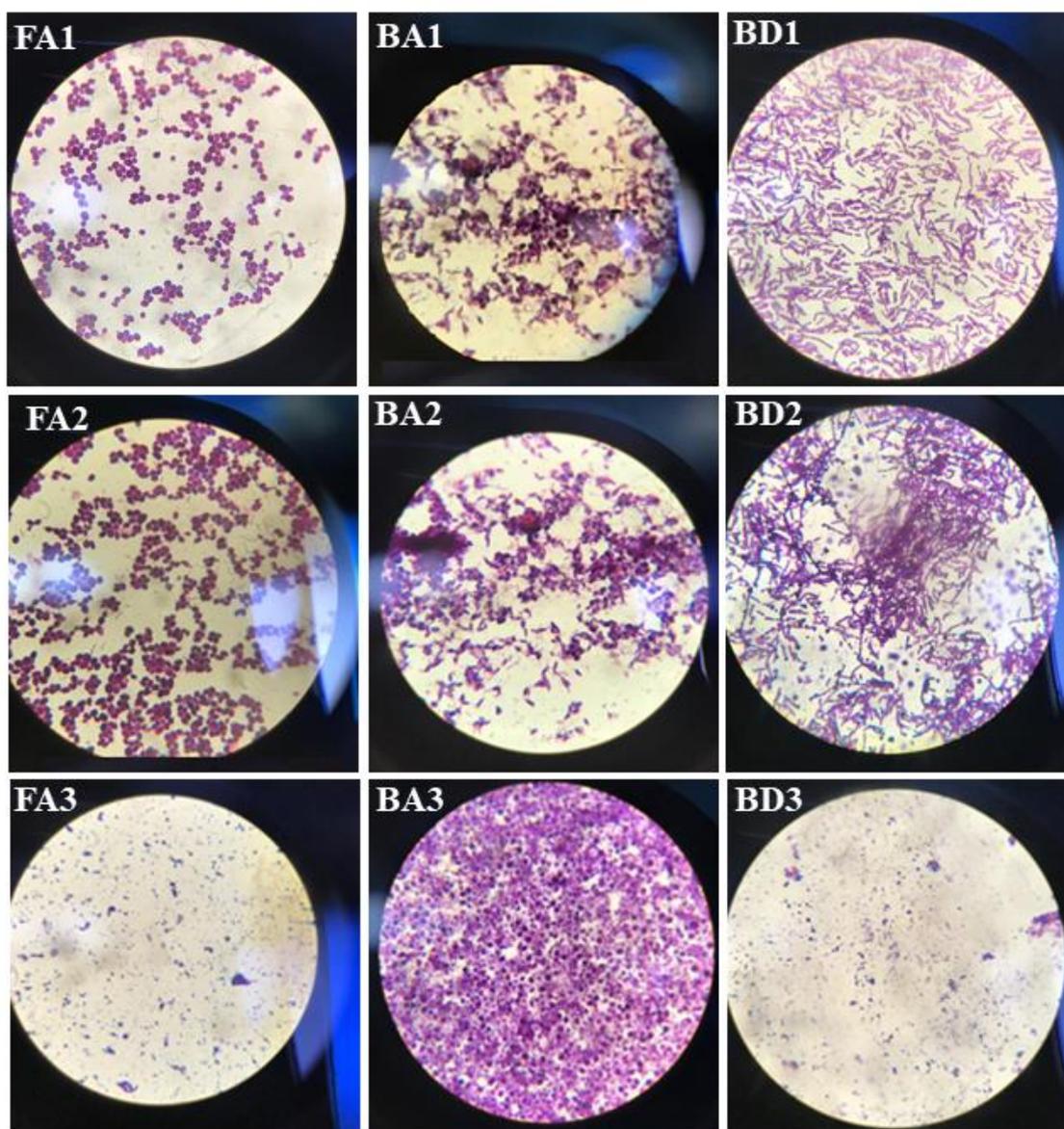
Em seu estudo, Lisdiyanti et al. (2003) utilizaram um meio de enriquecimento contendo cicloheximida (CHX) para inibir o crescimento de leveduras nos ensaios com o meio AAM. Spitaels (2015) também suplementou o meio AAM com cicloheximida, e de acordo com seus resultados não foi detectada a presença de bactérias acéticas. Também conhecida como actidiona, a CHX é um antibiótico e antifúngico isolado de *Streptomyces griseus*, e também um inibidor da síntese de macromoléculas como proteínas. Além disto, a cicloheximida afeta os mecanismos de morte celular (apoptóticos) em eucariotos (LAWANA et. al, 2014). Porém, seu elevado custo torna difícil a sua utilização em análises diárias realizadas na indústria, sendo necessário a pesquisa de alternativas economicamente viáveis.

Os métodos para detecção de micro-organismos não são muito difundidos e o estudo sobre eles é deficiente. A indústria vem em constante desenvolvimento de métodos rápidos para detecção dos micro-organismos deteriorantes da cerveja, como métodos incluem técnicas de bioluminescência, técnicas de filtro, imunoenálises, uso de turbidimetria automatizada, medidas de impedância ou condutância, citometria de fluxo, como também diversos métodos incluindo tecnologias de DNA, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridação do DNA (PRIEST, 2006; DRAGONE, 2007). Porém, essas metodologias possuem falta de sensibilidade e especificidade, além de custos elevados com equipamentos, reagentes e

de pessoal qualificado, fazendo com que não sejam adotados pela indústria (HUHTAMELLA et al., 2007; DRAGONE, 2007).

O estudo da morfologia das células e do teste de coloração de Gram através da microscopia óptica, pode ser visualizado na Figura 3.

**Figura 3.** Microscopia óptica para cada amostra com crescimento de micro-organismos. Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente os meios Raka-Ray para a detecção *Bactérias ácido lácticas*, meio AAM para a detecção de *bactérias acéticas*, e o meio levteck para a detecção de *bactérias ácido lácticas* e *acéticas*. As siglas FA e BA representam respectivamente fermentador e barril antes da CIP, e a BD representam respectivamente fermentador e barril depois da CIP.



Após a CIP, tanto para o fermentador (FD1, FD2 e FD3) quanto para o barril (BD1, BD2 e BD3), não houve detecção de leveduras, assim, para este contaminante o CIP de ambos equipamentos se mostrou efetivo. Porém esta eficácia não se repetiu para as bactérias. Foi possível identificar a presença de BAL (Gram-positivas) nas placas com amostras após a CIP do barril. Assim, indicando que o processo CIP no barril não apresentou desempenho esperado, devendo-se provavelmente ao sanitizante alcalino que é aplicado a temperatura ambiente. Uma vez que, temperaturas elevadas durante o processo, principalmente nas etapas que envolvem álcalis, auxiliam na destruição dos micro-organismos, bem como, melhoram o processo de limpeza como um todo, garantindo uma maior remoção de sujidades da tubulação (LOPES, 2007; YANG et al., 2019).

Diante do exposto, foi possível observar que as bactérias são mais resistentes ao processo de CIP, sendo necessário temperaturas mais elevadas para sua destruição. Durante a CIP, os tipos de micro-organismos devem ser levados em conta antes de aplicar um desinfetante ou desinfetante. Bactérias Gram-negativas, exemplo, são mais difíceis de destruir do que as bactérias Gram-positivas, devido à presença da membrana externa, que atua como uma "barreira" aos sanitizantes e desinfetantes. Estes compostos também variam em sua eficácia contra leveduras e fungos, sendo as leveduras mais sensíveis a desinfecção. Outro fator relevante é a resistência fenotípica de alguns micro-organismos a limpeza profunda e desinfecção. Esta fração de células sobreviventes diminui à medida que a concentração de desinfetante aumenta, mas é maior para comunidades antigas estabelecidas, chamadas de "micro-organismos persistentes". Essas células tornam-se persistentes quando sua taxa de crescimento excede a destruição pela limpeza e desinfecção, e a melhor maneira de evitar sua presença é impedir o crescimento bacteriano, pois isso poderia promover o surgimento de células mais resistentes (ROVIRA, 2016).

A presença de bactérias ácido lácticas na cerveja, em termos de efeitos deteriorantes, pode causar desde turvação, elevada acidez (devido à produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos) e *off-flavours*. O *flavour* desagradável mais importante produzido é a característica doce amanteigada devida à produção de diacetil por algumas estirpes além de poder causar uma textura viscosa na cerveja (JESPERSEN AND JAKOBSEN, 1996; SAKAMOTO AND KONINGS, 2003; FERNANDES, 2012).

A incidência desse tipo de contaminante na cerveja pode ser explicada pelo comportamento da *Saccharomyces cerevisiae*, que em ambientes ricos em nitrogênio ajusta seu metabolismo secretando um pool de metabólitos, especialmente aminoácidos, e assim permite

a sobrevivência de *Lactobacillus* (PONOMAROVA et. al, 2017). Por este motivo, foi possível visualizar o crescimento dos dois micro-organismos nas placas.

### **3.3. Elaboração do POP**

De acordo com as análises microbiológicas realizadas, a CIP aplicada no fermentador apresentou resultados satisfatórios, enquanto a que para o barril, este procedimento não estava sendo realizado de forma eficaz. Os processos de fabricação exigem procedimentos eficientes de limpeza, sanitização e esterilização para garantir a segurança do produto. Tais procedimentos são parte integrante de todas as etapas do processo e devem ser validados para sua eficácia. Produtos químicos de limpeza e sanitização precisam ser eficazes na remoção de contaminantes e devem apresentar uma cinética de eliminação robusta para micro-organismos (GRONBERG, 2018).

Foram elaborados os POPs para a higienização do fermentador e barris, levando do em consideração os resultados microbiológicos obtidos neste estudo, e utilizando o procedimento de sanitização do fermentador como parâmetro.

Como foi verificado, após a CIP não foi possível identificar a presença de BAL nas amostras do fermentador devido a temperatura utilizada no sanitizante alcalino clorado (60°C) logo, padronizou-se este valor para a CIP do barril. Além disto, o tempo de ação do alcalino estabelecido foi de cerca de 20 minutos a uma temperatura de 60°C. O binômio tempo/temperatura é um fator importante na inativação de micro-organismos, temperaturas de 60°C/20min devem resultar na inativação das células vegetativas das bactérias (SAKAMOTO e KONINGS, 2003; SUZUKI et al., 2006; SPITAEELS et al., 2015; MUNFORD, et. al., 2017).

O POP foi elaborado de modo a ser facilmente reproduzido, descrevendo claramente passo a passo, com detalhes suficientes, para que o usuário com pouca experiência possa utilizar com sucesso o procedimento quando não supervisionado. Foi estruturado com os objetivos do procedimento; os resultados esperados; campos de aplicação; equipamentos necessários para execução; responsáveis pela execução e pelo controle monitoramento e verificação); procedimentos de monitorização e verificação, ação corretiva, registro e planilhas de controle (Anexo I).

#### 4. CONCLUSÕES

O controle microbiológico bem como as metodologias empregadas para detecção de contaminantes foram eficientes para pesquisa de bactérias ácido lácticas, porém apresentaram baixa seletividade devido a presença de leveduras, sendo necessário a utilização de um antibiótico. O meio Teckback não é confiável quanto a mudança de coloração, pois as amostras contaminadas com bactérias lácticas não modificaram a cor, apresentando um resultado em desconformidade. Para todos os meios foi necessário o estudo da morfologia e teste de coloração de Gram para a confirmação dos micro-organismos presentes, logo, não é possível fazer uma interpretação direta com o meio, sendo necessário um teste confirmativo. Quanto a CIP, pode-se destacar que o foi eficaz nas condições aplicadas ao fermentador, assim, não sendo detectada a presença de micro-organismos nas amostras após a higienização. Porém, tal comportamento não se repetiu no barril, apresentando crescimento de bactérias mesmo após a limpeza, tornando-se, assim, necessárias mudanças nos parâmetros da CIP, afim de promover a superação de tal problema. Destaca-se ainda a qualidade do processamento da cerveja artesanal realizada em micro-cervejarias, garantindo assim a segurança microbiológica do produto para o consumidor.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMFORTH, C. W., & BARCLAY, A. H. P. Malting technology and the uses of malt. In A. W. MacGregor, & R. S. Bhatta (Eds.). **Barley: Chemistry and Technology Am. Assoc. Cereal Chem.** (St. Paul, MN. DUBOIS),1993

GRÖNBERG, A.; HJORTH, R. A. Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes. **Biopharmaceutical Processing**, p. 675-699.

LAWANA, M.C.; KORRAPATI, C.K.; Cycloheximide . Reference Module in Biomedical Sciences. **Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)**, p. 1103-1105, 2014.

LISDIYANTI , P.; KATSURA, K. et. Al, Diversity of Acetic Acid Bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. **Microbiol. Cult. Coll.** Dec, n.2, v.19, p. 91-99, 2003

MUNFORD, A. R. G.; ALVARENGA, V. O.; SILVA, L.P.; CRUCCELLO, A.; CAMPAGNOLLO, F. B. ; CHAVES, R. D. ; OTEIZA, J. M. ; SANT'ANA, A. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. *Food Control*, v. 81, p. 126-136, 2017

PEREIRA, G.V.M.; ALVAREZ, J.P.; NETO, D. P. C.; SOCCOL, TANOBE, V.O.A. H. SocolGreat intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *LWT Food Sci. Technol*, v. 83, p. 290-297, 2017

PONOMAROVA, O. ; GABRIELLI, N. ; Sévin, D. C., et.al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Sistens*, v.5, p. 345-357, 2017

PRIEST, F. G. Gram-positive brewery bacteria. *Brewing Microbiology*, , p. 127-161, Londres, 2008,

REED, G. Yeast technology, **AVI Publishing Co**, Westport, 2012

ROVIRA, J. Sanitização. Módulo de Referência em Ciência de Alimentos. **Enciclopédia de Alimentos e Saúde**, p. 706-713, 2016

SAKAMOTO, K., KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*., v. 89, p. 105-124, 2003

SPITAELS, F. et. al. .The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of one traditionally produced and reveals a central microbiota for the fermentation of lambic beer. *Food Microbiology*, v. 49, p. 23 - 32 ,2015

SUZUKI, K. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteri. *Journal of the Institute of Brewing*., v. 117, p. 131-15, 2011

## ANEXO 1

MANUAL DE ORGANIZAÇÃO INSTRUÇÃO DE PROCEDIMENTO - IP		
PROCESSO	DATA	VERSAO
Procedimento Operacional Padrão - POP	-	01

## Saneamento das Linhas e Barris (CIP)

Objetivo: Realizar o saneamento CIP das linhas e barris.				
Material Necessário: Solução alcalina ou alcalina clorada, solução de sanitizante ácido e Equipamentos de proteção individual (óculos de proteção, luvas, protetor auricular, touca protetora e sapato fechado)				
Campo de aplicação: Área de produção (Fermentador, Tanque de Mostura, Tanque de Clarificação e Barris).				
Referências: IT 01 – Preparo de Solução Alcalina Clorada a 5,0% IT 02 – Preparo de Solução Alcalina (Pluron Clorcip) a 2,0%; IT 03 – Preparo de solução Sanitizante (Ácido Peracético 0,2%).				
Descrição: 1. Enxaguar com água durante 10 minutos; 2. Realizar a limpeza mecânica com o detergente alcalino clorado 3. Enxaguar com água durante 10 minutos 3. Circular solução alcalina clorado a 60°C durante 20 minutos; 4. Enxaguar com água durante 5 minutos; 4. Realizar teste de presença de soda com fenolftaleína caso houver presença deste enxaguar novamente; 5. Circular sanitizante ácido (ácido peracético 0,2%) durante 15 minutos; 6. Se não houver produção de imediato, deixar a linha imersa com o sanitizante ácido até a próxima produção;				
Monitorização:				
O quê	Como	Quem	Quando	Ação corretiva
Saneamento	Análise microbiológica	Melhorar saneamento Controle de Qualidade	A cada saneamento	Melhorar saneamento
Verificação:				
O quê	Como	Quem	Quando	
Planilhas de registro	Visual	Controle de qualidade	A cada produção	
Tipos de registro: Planilhas de registro de saneamento das linhas de envase; (anexo 3); Localização: Pastas do controle de qualidade; Tempo de retenção: Indeterminado; Disposição: Descarte.				
Observações:				

MANUAL DE ORGANIZAÇÃO INSTRUÇÃO DE PROCEDIMENTO - IP		
PROCESSO	DATA	VERSAO
Procedimento Operacional Padrão - POP	-	01

### **DAS INSTRUÇÕES DE TRABALHO – IT:**

A Instrução de Trabalho – IT - são instruções específicas de operação (preparo, manipulação e requisitos), de modo simplificado realizados rotineiramente ou não na empresa. Uma instrução de trabalho descreve passo a passo à execução de uma tarefa.

Pode ser ilustrado para melhor entendimento.

#### **IT 01 : PREPARO DE 10L DE SOLUÇÃO DE ALCALINO CLORADO 5% PARA LIMPEZA MECÂNICA DOS TANQUES**

- Medir em um béquer plástico 9,5 litros de água;
- Colocar a água em um balde plástico;
- Medir em um béquer 500mL da solução de alcalino clorado;
- Transferir a solução alcalina para o balde plástico com água.

#### **IT 02 – PREPARO DE SOLUÇÃO ALCALINO CLORADO 2,0%**

- Medir em um balde 1,0 litro de alcalino clorado;
- Adicionar o Alcalino em 500 litros de água.

#### **IT 03 – PREPARO DE SOLUÇÃO SANITIZANTE ÁCIDO – ÁCIDO PERACÉTICO 2,0%**

- Medir em um balde 100 mL de ácido peracético;
- Adicionar o ácido peracético em 500 litros de água.