

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
Pró Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa, Extensão e Ação
Comunitária (ProPPE)
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)
Nível Mestrado Profissional

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CONTROLE DE
QUALIDADE MICROBIOLÓGICO PARA APLICAÇÃO EM
MICROCERVEJARIAS

MÁRCIO MARTINS DE LIMA

Anápolis – GO
Agosto, 2023

MÁRCIO MARTINS DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CONTROLE DE
QUALIDADE MICROBIOLÓGICO PARA APLICAÇÃO EM
MICROCERVEJARIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Scaliante de
Moura

Anápolis – GO

Junho, 2023

L732

Lima, Márcio Martins de.

Desenvolvimento de um protocolo de controle de qualidade microbiológico
para aplicação em microcervejarias / Márcio Martins de Lima -
Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, 2023.

63p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Scaliante de Moura.

Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências

Farmacêuticas – Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, 2023.

Catálogo na Fonte

Elaborado por Rosilene Monteiro da Silva CRB1/3038



FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO PARA APLICAÇÃO EM MICROCERVEJARIAS”


Márcio Martins de Lima

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas /PPGCF
da Universidade Evangélica de
Goiás/UniEVANGÉLICA como
requisito parcial à obtenção do
grau de MESTRE.


1. **Linha de Pesquisa** : Farmacologia Clínica e Terapêutica, Farmacologia Básica e Experimental, Aspectos fitoquímicos e farmacológicos de produtos naturais e sintéticos.

Aprovado em 04 de agosto de 2023.


Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO SCALIANTE DE MOURA
Data: 07/08/2023 18:11:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Scaliante de Moura
Presidente da Banca

Documento assinado digitalmente
 WESLEY DE ALMEIDA BRITO
Data: 08/08/2023 07:10:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wesley de Almeida Brito
Avaliador Interno

Documento assinado digitalmente
 RAFAEL CHOZE
Data: 07/08/2023 22:24:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rafael Choze
Avaliador Externo

“Ao meu amado Professor Joel Rocha (*in memoriam*), que com exemplo em sala de aula, me moldou, me inspirou e mostrou a importância de acreditar e se dedicar em tudo aquilo que se propõe a fazer, eu sou parte viva do legado que o Senhor deixou. Minha eterna gratidão.”

*“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje.
Mas continue em frente de qualquer jeito.”
Martin Luther King*

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, Ele, que em sua infinita bondade sempre me colocou à frente das oportunidades de conquistas e superações.

Agradeço ao Professor Dr. Rodrigo Scaliante de Moura, que sempre foi muito mais que um orientador nessa pesquisa, não mediu esforços e tempo para que pudéssemos chegar até aqui, obrigado meu amigo.

Aos mestres cervejeiros Tiago, Willian e Daniel, que abriram as portas de sua cervejaria e permitiram as análises e estudos aqui propostos, bem como ao Sr. Juliano Rost, da prozyn biosolutions for life que patrocinou os meios de cultura usados como referência neste trabalho.

Agradeço a empresa Farmácia Naturalis da cidade de Goianésia/GO, especialmente a Nayara, Iorrane e Isadora, que muito contribuíram nesse estudo.

Gratidão a farmacêutica Jessica Martins, da farmácia Natureza em Anápolis/GO, foi primordial sua ajuda na realização desta pesquisa.

Agradeço à instituição de ensino, Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, que possibilitou o aprendizado e ofereceu as ferramentas necessárias para um ensino de qualidade.

Gratidão à FAPEG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás, por ter financiado os custos de mensalidade dessa especialização.

Agradeço a minha família, especialmente meus pais, Sr. Arlindo e Dona Rosa, que desde a primeira infância foram meus maiores incentivadores na educação.

Por fim, agradeço a todos os amigos e colegas, que entenderam as ausências, e nunca deixaram de contribuir e acreditar que esse momento chegaria.

RESUMO

A cerveja é a bebida produzida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro à base de malte de cevada e água potável, acrescida de lúpulo. Para a produção de cervejas são necessários alguns ingredientes específicos e indispensáveis como água, lúpulo, levedura e uma ou mais fontes específicas de carboidratos, sendo o mais utilizado o malte de cevada. O mercado brasileiro de cervejas teve um crescimento considerável nos últimos anos. O número de estabelecimentos produtores de cerveja cadastrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) chegou a 1.549. Os requisitos de controle de qualidade variam de acordo com o tamanho e a escala da operação de fabricação de cerveja. A aplicação de testes microbiológicos permite eliminar o potencial de degradação microbiológica em adição aos procedimentos de higienização e esterilização são procedimentos de esterilização eficazes. O objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo de controle de qualidade microbiológica das linhas de produção cervejeira e do produto finalizado que apresente custo viável para aplicação em microcervejarias. Para tanto, foi realizada uma pesquisa aplicada de abordagem experimental, qualitativa, e a produção de meios de cultura similares a meios de referência afim de identificar a presença de degradantes na cerveja e formação de biofilme em peças de conexão hidráulica. Os resultados obtidos apontam que a concordância geral dos resultados para a análise das cervejas foi de 60% entre os meios SCL-A e o NBB[®]-C e de 100% entre os meios SCL-B e o NBB[®]-C. Este resultado corrobora com a superioridade do meio SCL-B encontrada na avaliação das peças hidráulicas quando comparado aos meios disponíveis comercialmente.

Palavras-chave: cerveja artesanal, qualidade microbiológica de bebidas, deteriorantes de cerveja.

ABSTRACT

Beer is the beverage produced by the alcoholic fermentation of brewing wort made from barley malt and drinking water, plus hops. For the production of beers, some specific and indispensable ingredients are required such as water, hops, yeast and one or more specific sources of carbohydrates, the most used being barley malt. The Brazilian beer market has grown considerably in recent years. The number of beer producing establishments registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) has reached 1,549. Quality control requirements vary according to the size and scale of the brewing operation. The application of microbiological testing allows eliminating the potential for microbiological degradation in addition to sanitization and sterilization procedures are effective sterilization procedures. The objective of this study was to develop a microbiological quality control protocol for brewing production lines and the finished product that is cost-effective for application in microbreweries. To this end, an applied research of experimental approach, qualitative, and the production of culture medium similar to reference medium was carried out in order to identify the presence of degradants in beer and biofilm formation in hydraulic connection parts.. The results obtained indicate that the overall agreement of the results for the analysis of the beers was 60% between the SCL-A medium and the NBB®-C and 100% between the SCL-B medium and the NBB®-C. This result corroborates the superiority of the SCL-B medium found in the evaluation of hydraulic parts when compared to commercially available mediums.

Keywords: craft beer, microbiological quality of beverages, beer spoilage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papiro da *Reinheitsgebot*

Figura 2. Lúpulo e *pellets* de lúpulo

Figura 3. Espigas e flocos de cevada

Figura 4. Leveduras de *Saccharomyces* spp.

Figura 5. Fluxograma generalizado do processo de produção de cerveja artesanal

Figura 6. Conexão de envase

Figura 7. Manifold de envase

Figura 8. Extratora de envase

Figura 9. Análise de deteriorante na amostra controle.

Figura 10. Análise de deteriorante na cerveja do tipo New England IPA.

Figura 11. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Red Ale.

Figura 12. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Imperial em etapa de Fermentação.

Figura 13. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Pilsen em etapa de Maturação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das Escolas Cervejeiras

Tabela 2. Características da água para fabricação de uma cerveja com qualidade

Tabela 3. Ingredientes para composição do meio enriquecedor líquido SCL – B

Tabela 4. Ingredientes para composição do meio enriquecedor líquido SCL – A

Tabela 5. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 1

Tabela 6. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 2

Tabela 7. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 3

Tabela 8. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – controle

Tabela 9. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – 2ª coleta

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

BSTG – *Biersteuergesetz* - Lei de Taxação da Cerveja

C. Albicans - *Candida albicans*

CO₂ - Dióxido de carbono

E. coli - *Escherichia coli*

IPA - Cerveja Índia Pale Ale

L – Litros

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL – Mililitros

NBB[®]-B-Am – *Nutrient Media for Beer-Spoiling Bacteria - Broth* (Meio de cultura referência)

NBB[®]-C – *Nutrient Media for Beer-Spoiling Bacteria – Concentrated broth* (Meio de cultura de referência)

° C – Graus Celsius

O₂ – Oxigênio

SCL-A – Meio de cultura elaborado neste projeto – Scaliante Lima A

SCL-B - Meio de cultura elaborado neste projeto – Scaliante Lima B

v/v – Volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1.	História da cerveja	14
1.2.	Escolas cervejeiras	17
1.3.	Características da cerveja	18
1.4.	Matéria-prima	18
1.4.1.	Água	18
1.4.2.	Lúpulo	20
1.4.3.	Malte	20
1.4.4.	Levedura	22
1.5.	Processo de produção da cerveja	23
1.5.1.	Moagem	24
1.5.2.	Mosturação	24
1.5.3.	Filtração	24
1.5.4.	Fervura	25
1.5.5.	Resfriamento	26
1.5.6.	Fermentação	26
1.5.7.	Maturação	28
1.5.8.	Envase	28
1.6.	Controle de qualidade na produção de cerveja	29
1.6.1.	Contaminantes	30
1.6.2.	Bactérias Gram-positivos deteriorantes de cerveja	30
1.6.3.	Bactérias Gram-negativas deteriorantes de cerveja	31
3.	OBJETIVO	33
3.1.	Objetivo geral	33
3.2.	Objetivos específicos	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1.	Definição do experimento	34
4.2.	Revisão sistemática da literatura	34
4.3.	Seleção da microcervejaria	34
4.4.	Elaboração dos meios de cultura de análise qualitativa	34
4.5.	Local de coleta e identificação dos pontos de coleta	36
4.6.	Coleta de amostras	36
4.7.	Incubação das amostras	39

5. RESULTADOS	40
5.1. Resultados das análises do primeiro dia de coleta.	40
5.1.1. Peças e conexões hidráulicas testadas com SCL-A, SCL-B e meio padrão NBB®-B-Am	40
5.1.2. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais – controle negativo	42
5.1.3. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - New England IPA	42
5.1.4. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - Cerveja Red Ale	43
5.2. Resultados das análises da segunda coleta.	44
5.2.1. Peças e conexões hidráulicas testadas com SCL-A, SCL-B e meio padrão NBB®-B-Am	44
5.2.2. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - Cerveja Imperial e Pilsen em diferentes etapas do processo produtivo.....	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS	51
9. APÊNDICES	56

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 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, define-se cerveja a bebida produzida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro à base de malte de cevada e água potável, acrescida de lúpulo. De acordo com a mesma lei, no artigo 39, diferentes são os tipos de cerveja e podem ser referidos como Pilsen, Export, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzibier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, e ainda outras que ganharam reconhecimento internacional (BRASIL, 2009).

Para a produção de cervejas são necessários alguns ingredientes específicos e indispensáveis como água, lúpulo, levedura e uma ou mais fontes específicas de carboidratos, sendo o mais utilizado o malte de cevada. A junção desse grupo de ingredientes e variação no tipo de malte, levedura e lúpulo são responsáveis pela grande variedade de estilos e cervejas existentes atualmente (SABINO, 2020).

O mercado brasileiro de cervejas teve um crescimento considerável nos últimos anos e continua em desenvolvimento, trazendo inúmeras oportunidades aos que desejam empreender na área. O número de estabelecimentos produtores de cerveja cadastrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) chegou a 1.549, um aumento de 12,0% em relação ao ano anterior, quando havia 1.383 cervejarias cadastradas (BRASIL - MAPA, 2022).

Em meio a evolução tecnológica e a facilidade da sociedade em obter informações, os consumidores se tornam cada vez mais exigentes e inteirados com o que acontece no mundo. Essas expectativas são uma consequência não apenas da exigência de que o alimento e ou bebida devem permanecer seguro, mas também da necessidade de minimizar as alterações indesejadas em suas qualidades sensoriais (MARINS, 2014). Observa-se que nesses casos, um fator extremamente importante é a manutenção da qualidade do produto desde sua saída da indústria ao consumidor final (BORTOLI et al., 2013).

1.1. História da cerveja

Observa-se que, a história da fabricação de cerveja não é apenas um avanço científico e tecnológico, trata-se da história da sociedade. Considera-se que o

homem começou a fermentar as bebidas há aproximadamente 30 mil anos. Estudos indicam que a produção da cerveja se iniciou por volta de 8000 a.C com a cultura do milho, cevada e outros cereais nas regiões da Suméria, Babilônia e Egito (SILVA et al., 2016). Anteriormente, a cerveja era conhecida como “pão líquido” devido ao fato de serem produzidas por padeiros da época, ou “bebida divina” (TOZETTO et al., 2019).

Evidências arqueológicas sugerem que os seres humanos descobriram como produzir álcool há milhares de anos. Desde então, empreendemos uma jornada e tanto. Com o passar dos séculos, nossa relação com a cerveja afetou história, legislação, cultura, ciência e tecnologia. A cerveja mudou e evoluiu conosco. Em sua longa jornada pelas leis de pureza e proibições, o preparo caseiro de bebida resultou na ampla proliferação atual de estilos (HAMPSON, 2016).

Segundo Morado (2017), a cerveja era muito importante no Egito Antigo e sua fabricação era estritamente controlada; a cerveja tinha papel privilegiado e era usada como oferenda aos deuses, conforme menciona Pereira:

Tanto os mesopotâmicos como os egípcios encaravam a cerveja como uma bebida antiga e divina que dava base à sua existência, formava parte de sua identidade cultural e religiosa, e tinha grande importância social. “Fazer uma festa da cerveja” e “sentar na festa da cerveja” eram expressões populares egípcias que significavam “aproveitar um bom momento” ou “festejar”, ao passo que a expressão suméria “derramamento de cerveja” referia-se a uma festa ou banquete de celebração; e as visitas formais do rei às casas de altos funcionários eram registradas como “quando o rei bebeu cerveja na casa de fulano de tal”. Em ambas as culturas, a cerveja era o ingrediente básico sem o qual nenhuma refeição parecia completa. Consumida por todos, ricos e pobres, homens e mulheres, adultos e crianças, desde o topo da pirâmide social até a base, era verdadeiramente a bebida definitiva dessas primeiras grandes civilizações (PEREIRA, 2015).

Na Idade Média, as mulheres assumiram a responsabilidade pela produção caseira da cerveja, que era servida para toda família, inclusive no desjejum. Um dos motivos da popularidade das bebidas alcoólicas era a qualidade incerta do abastecimento de água. Embora as pessoas não entendessem a ciência, havia uma indicação clara de que beber água aumentava a probabilidade de contrair doenças como cólera (BARBOSA, 2018).

Com o passar dos tempos, a Igreja Católica teve um papel muito importante na pesquisa e fabricação da cerveja, o que contribuiu para o desenvolvimento da bebida. Sendo incluída em ritos e várias tradições religiosas, conforme mencionado “a

Santa Brígida que miraculosamente transformou a água do seu banho em cerveja, para que os seus visitantes clericais tivessem algo para beber” (PEREIRA, 2015).

A partir do século XI a produção de cerveja passou a ter características comerciais. Vários mosteiros obtiveram licença para produzir a cerveja comercialmente. Uma das primeiras cervejarias dessa região surgiu em Frankfurt no ano de 1288, e pouco depois surgiram várias outras, principalmente na cidade de Munique (MORADO, 2017). Nesse contexto, a partir do ano de 1516, foi promulgada *Reinheitsgebot* (“Lei da pureza da cerveja” em tradução livre) (figura 1) como lei que garantia a pureza da cerveja para as cervejarias da Baviera (PATTINSON, 2013).

Figura 01: Papiro da *Reinheitsgebot*



Fonte: (BEERCODE, 2021)

A lei da cerveja, mais conhecida como *Reinheitsgebot*, a "Lei da Pureza" é a regulamentação alimentar mais antiga do mundo e ainda hoje existe inalterada em relação ao original (PEREIRA, 2015). Nesse contexto, a lei da pureza não só preserva uma técnica artesanal tradicional, como também menciona que só poderá levar os seguintes ingredientes; cevada, lúpulo e água. Ela foi alterada posteriormente incluindo a levedura (após ela ser descoberta) e o malte de trigo (MACIEJ SERDA et al., 2020).

Atualmente, o *Reinheitsgebot* está incluso em um documento maior chamado de *Biersteuergesetz* (BSTG) ou “Lei de Taxação da Cerveja”, que define

sua composição e como deve ser taxada de acordo com o teor alcoólico (TÓFOLI, 2014).

1.2. Escolas cervejeiras

As escolas de cervejaria eram baseadas na história relacionada a cerveja, trazendo características das regiões, costumes e comportamentos, bem como desenvolvimento de técnicas e processos (MORADO, 2017). Devido a isso, à medida que as cervejarias se consolidavam, pode-se perceber a criação de escolas, dentre elas destacam-se quatro:

- Escola Britânica (Inglaterra, Escócia, Gales, Irlanda e Irlanda do Norte); em destaque essas escolas trouxeram os estilos; *Pale Ale*, *Porter*, *Bitter*, *Scottish Ale*, *Red Ale*, *Stout*.
- Escola Belga (Bélgica e França); criou estilos conhecidos mundialmente, como a *Witbier*, *Saison*, *Belgian Golden Strong Ale*, *Dubbel*, *Tripel*, *Quadrupel*, *Strong Dark Ale* entre muitas outras.
- Escola Germânica (Alemanha e República Tcheca); essa escola trouxe como contribuição a fermentação a frio, trazendo assim mais resistência e estabilidade. Quanto aos estilos, em destaque *Pilsen*, *Weiss* ou *Weizen* e *Helles*. Válido ressaltar que além dos estilos, essa escola também trouxe as Leis e uma das mais famosas festas do mundo cervejeiro, a *Oktoberfest*.
- Escola Norte-Americana (Estados Unidos) criou-se os estilos *American Lager* e *American Pale Ale*.

Observa-se que cada escola traz características singulares à cerveja. Nota-se também com o passar do tempo houve uma flexibilidade para o surgimento de novas escolas sem que as maiores e mais tradicionais perdessem o seu espaço (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo das Escolas Cervejeiras

ESCOLA	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS
Escola Alemã	Principal escola cervejeira, responsável pelo estilo Pilsen e criação de cervejas de trigo.
Escola Belga	Escola cervejeira rica em criatividade e inovação, dubbel, tripel e quadrupel são estilos mais relevantes dessa escola.
Escola Inglesa	Cervejas fortes de alta fermentação, uso de cereais torrados, lúpulos resinosos e terrosos que possibilitam estilos com porter, stout e pale ale.
Escola Americana	Escola que se destaca por fazer releituras de estilos que já existem, e são caracterizadas pela adição de lúpulos que carregam notas cítricas e frutadas.

Fonte: Autoria própria

1.3. Características da cerveja

Segundo o decreto nº 2314 cerveja “é 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”. Para Oliveira (2011) a cerveja pode ser conceituada 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.

De acordo com Giovana Dallacort a cerveja pode ser definida como:

Resultado da fermentação alcoólica preparada de mosto de cereal maltado, como é feita basicamente de água a origem dessa água e a qualidade original influenciam muito na qualidade da cerveja, a escolha da cevada dentre os maltes é devido ao seu alto conteúdo de enzimas naturais, mas outros cereais maltados e não maltados são utilizados como adjuntos no processo de fabricação, inclusive: milho, arroz, trigo e centeio. (DALLACORT, 2013).

1.4. Matéria-prima

1.4.1. Água

A água é uma das principais matérias primas na fabricação da cerveja. Cada cerveja contém mais de 90 % de água. Para cada 1L de cerveja produzida é gasto em média 10 L de água, considerando todas as etapas do processo (TROMMER, 2014).

Para que possa ser utilizada na fabricação, a água obrigatoriamente tem que ser potável. É válido mencionar que a qualidade e as características da água usada para fazer cerveja podem afetar no sabor da cerveja. A quantidade e a composição dos minerais dissolvidos, como cálcio e magnésio, desempenham um papel importante no sabor da cerveja. A água da cerveja deve, portanto, ser limpa, saudável e de composição correta, Em termos gerais, a água para produção de cervejas deve possuir as características listadas na Tabela 2 (ÁVILA et al., 2022).

Tabela 2. Características da água para fabricação de uma cerveja com qualidade

PARÂMETRO	UNIDADE	ESPECIFICAÇÃO
Aparência		Límpida e clara
Sabor		Insípida
Odor		Inodora
pH	Ph	6,5 a 8,0
Turbidez	NTU	Menor que 0,4
Matéria orgânica	mg O ₂ consumidos/L	0 - 0,8
Sólidos dissolvidos totais	mg/L	50 -150
Dureza total	mg CaCO ₃ /L	18 – 79
Sulfatos	mg SO ₄ /L	1 – 30
Cloretos	mg Cl/L	1 – 20
Nitratos	mg NO ₃ /L	Ausência
Nitritos	mg NO ₂ /L	Ausência
Sílica	mg SiO ₂ /L	1 – 15
Cálcio	mg Ca ²⁺ /L	5 – 22
Magnésio	mg Mg ²⁺ /L	1 – 6
Ferro	mg Fe/L	Ausência
Alumínio	mg Al/L	máximo 0,05
CO ₂ livre	mg CO ₂ /L	0,5 – 5

Fonte: Autoria própria

De fato, muito sucesso da cerveja está ligado as características da água. D Junior e colaboradores (2009), relembra o caso da cerveja pilsen fabricada na Tchecoslováquia ganhou popularidade por conta da baixa salinidade da água utilizada em sua fabricação.

1.4.2. Lúpulo

A planta do lúpulo é uma trepadeira perene, cujas flores fêmeas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, fazendo das flores uma importante atuação na fabricação da cerveja. A flor do lúpulo é um cone do tamanho de uma ameixa que se parece com alcachofras em miniatura, industrializado o lúpulo (Figura 2) é comercializado em forma de pellets.

No interior da flor há um aglomerado de pequenos glóbulos amarelos pegajosos, chamados de lupulinas. As lupulinas armazenam ácidos e óleos que dão à cerveja seu amargor e aroma (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009). Nesse contexto, as flores de lúpulo auxiliam na remoção do excesso de proteínas da cerveja não fermentada, são conservantes naturais e favorecem o aumento da cremosidade da espuma na cerveja (TROMMER, 2014).

Figura 2: Lúpulo



Fonte: (ALMEIDA et al., 2023).

1.4.3. Malte

Os grãos da cevada, que antes de ser utilizada como matéria prima na produção de cervejas, precisam passar por uma etapa de conversão de amido em

açúcares fermentativos, que são necessários para que seja possível produzir cervejas através do uso de cevada, essa transformação recebe o nome de malteação (BELTI; DUARTE; GEORG-KRAEMER, 2012).

O malte é o elemento que confere sabor e cor à cerveja. A cevada é o cereal mais utilizado para a fabricação de malte embora, possa ser utilizado o centeio, trigo entre outros. O malte tem origem na germinação de cereais sob condições ambientais controladas e predeterminadas. Representa a fonte de carboidratos, proteínas degradadas, vitaminas e algumas enzimas (TROMMER, 2014).

Para garantir um malte de boa qualidade, é necessário que o cereal (Figura 3) utilizado seja de boa qualidade e que sejam aplicadas as condições de maltagem adequadas. Essa germinação converte o amido do grão em açúcar. É esse açúcar conhecido como maltose que é necessário para o processo de fermentação no qual a levedura converte os açúcares em dióxido de carbono e álcool (DA COSTA, 2022).

Figura 3: Grãos e espigas de cevada



FONTE: (SOMOS TODOS CERVEJEIROS, 2016).

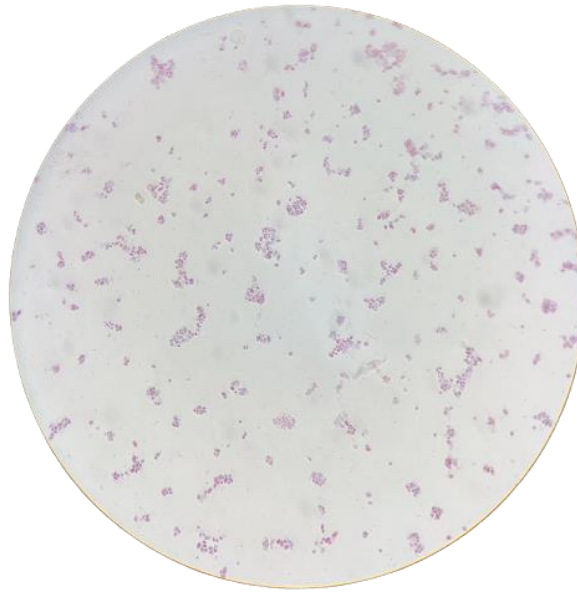
Assim que o grão germina, ele é seco, expondo-o a altas temperaturas. Isso elimina o grão, mas mantém o açúcar natural encontrado dentro do grão. A temperatura a que o grão é exposto determina a cor e o sabor do açúcar, ou malte acabado. Uma temperatura baixa resulta em um malte claro ou louro. Uma alta temperatura resulta em um malte escuro ou caramelo (DA COSTA, 2022).

1.4.4. Levedura

A levedura é um microrganismo unicelular que se reproduz rapidamente por divisão. É adicionado ao processo para converter os açúcares do mosto em álcool e dióxido de carbono por fermentação. Existem três tipos de levedura de cerveja; levedura superior, inferior e selvagem. A espécie *Saccharomyces Cerevisiae* (figura 4) é a mais utilizada na fabricação das duas categorias mais difundidas da indústria de cerveja, sendo as cervejas classificadas com *Ale* e *Lager*, porém cada cervejaria possui sua própria cepa. Embora todas as cepas tenham o mesmo objetivo, que é de transformar açúcar em álcool e gás carbônico, o sabor do produto obtido difere de uma cepa para outra, em função de pequenas diferenças de metabolismo e consequente formação de substâncias capazes de conferir aroma e sabor ao produto, mesmo estando presentes em quantidades muito pequenas (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

As leveduras utilizadas na indústria cervejeira, podem ser divididas em dois grandes grupos, as leveduras utilizadas para produção de cervejas de alta fermentação são as denominadas leveduras do tipo *Ale*, enquanto as leveduras do tipo *Lagers* são processadas na fabricação de cervejas de baixa fermentação. Durante o processo fermentativo é possível observar o depósito dessas leveduras na superfície do mosto cervejeiro se a levedura for do tipo *ale* e no sedimento do mosto cervejeiro se a levedura for do tipo *Lagers* (KARABÍN et al., 2018).

Figura 4: Leveduras de *Saccharomyces* spp.

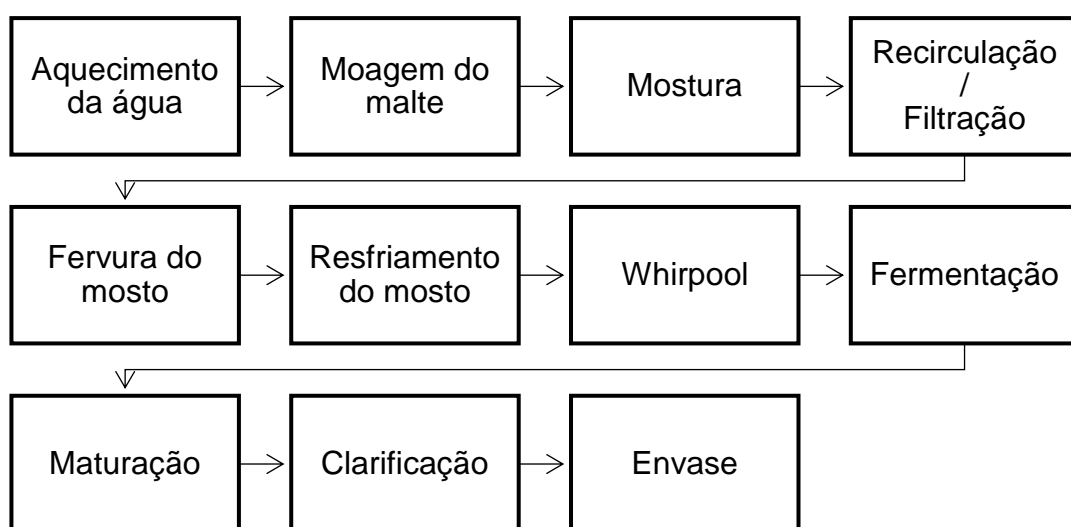


Fonte: Arquivo pessoal.

1.5. Processo de produção da cerveja

O processo de produção de cervejas é dividido em quatro etapas importantes, preparo do mosto conhecido como mostura, a fervura que é a etapa em que o mosto é exposto a alta temperatura, a fermentação que é capaz de transformar o açúcar do malte conhecido como maltose em álcool e pôr fim a maturação, na figura 5 é apresentado um fluxograma generalizado de todo esse processo.

Figura 5: Fluxograma generalizado do processo de produção de cerveja artesanal



Fonte: Arquivo pessoal.

1.5.1. Moagem

O objetivo da moagem é quebrar o grão de malte a fim de expor o amido e facilitar o processo de transformação de amido em açúcares, essa etapa tem ligação direta com a velocidade que se deseja alcançar as transformações físico-químicas que deverão ocorrer na etapa de mostura, a moagem pode ser feita em moinhos de rolos, martelo ou discos (VENTURINI FILHO; EDGARD BLUCHER, 2005).

Podendo ser feito por via úmida ou seca, é primordial zelar pelo tamanho da casca do malte que será moído, por que essa servirá de filtro do mosto durante o processo de recirculação, também durante o processo de moagem é importante acompanhar a granulometria e evitar a formação de grãos de amido muito fino, por que esses podem depositaram ao fundo da panela de mostura formando uma pasta indesejada, bem como, não deixar essa moagem muito grosseira também é necessário, pois se isso acontece, o objetivo de expor o amido para que o mesmo seja transformado em açúcares fermentativos não é alcançado (TOZETTO et al., 2019).

1.5.2. Mosturação

A mosturação é a etapa em que se adiciona o malte moído à água já aquecida a fim de se extrair os açúcares fermentativos do amido, a adição do malte sobre a água aquecida resulta na formação das enzimas alfa e beta amilase que serão responsáveis por transformar o amido em açúcares fermentativos. É importante acompanhar a temperatura da panela de mostura, pois temperaturas superiores a 80° C podem inativar a ação enzimática, além do surgimento de sabores desagradáveis na cerveja quando finalizada (COSTA, 2019).

Ribeiro e colaboradores em (2018), afirma que todo o processo de mostura é dependente da temperatura, do tempo, do pH, da qualidade do malte e do processo de moagem. A mosturação consiste em formar o alicerce ou alimento para que quando adicionada as leveduras encontrem ambiente propício e favorável para desenvolvimento, o mosto também é responsável por garantir as cervejas propriedades sensoriais desejáveis em todo o processo cervejeiro (RIBEIRO et al., 2018; TOSTES, 2015).

1.5.3. Filtração

O processo de filtração tem denominado clarificação, tem por objetivo, separar o mosto cervejeiro em substâncias solúveis e insolúveis que são conhecidas

como o bagaço do malte. Na etapa de filtração faz-se necessário o uso de tecnologia aplicada por uma bomba hidráulica de recirculação, cujo processo se dá pela retirada do líquido cervejeiro da panela de mostura e pelo retorno desse mesmo líquido sobre o bagaço do malte que está nessa mesma panela, esse bagaço de malte funciona como uma membrana filtrante, esse procedimento é feito por alguns minutos, e é cessado quando notado um aspecto límpido no líquido cervejeiro (RIBEIRO et al., 2018).

Após realizada a primeira etapa de filtração, começa a segunda fase, que tem por finalidade, além de clarificar, também irá lavar o bagaço do malte obtido pós mostura e primeira filtração, essa etapa garante a extração total de todos os nutrientes solúveis disponíveis no líquido cervejeiro. Para essa etapa é usado uma água pré-aquecida em torno de 70°, que eleva o rendimento do processo e ainda oportuna a extração completa de todos os açúcares disponíveis no meio líquido, é importante que o mosto cervejeiro desta etapa seja bastante límpido, pois a turvação deste gera na cerveja sabores e odores desagradáveis (VENTURINI FILHO; EDGARD BLUCHER, 2005).

1.5.4. Fervura

A etapa de fervura é caracterizada pela evaporação de água excedente no líquido cervejeiro, pela volatilização de componentes voláteis indesejáveis, pela coagulação de proteínas, pela inativação de enzimas remanescentes, e como característica mais importante esterilizar o mosto cervejeiro e ainda gerar odor, cor e sabor através da adição de lúpulo durante a etapa de fervura (RIBEIRO et al., 2018).

O desenvolvimento da cor da cerveja está diretamente associado a intensidade e tempo de fervura, não é permitido durante o processo de fervura a entrada de ar, pois pode inibir a coagulação das proteínas e ainda gerar dessabores à cerveja que está sendo produzida. A adição do lúpulo que irá gerar odor e sabor a cerveja, bem como o tempo de fervura, dependem do estilo e tipo de cerveja que se deseja produzir, basicamente se adiciona lúpulo no início, meio e fim da fervura e essa adição respectiva tem por objetivo contribuir com a coagulação de proteínas, associar à cerveja o amargor característico dessa bebida e por fim alcançar o aroma desejado para a cerveja (TOSTES, 2015).

Terminado a etapa de fervura, é necessário retirar do mosto cervejeiro as partículas de proteínas coaguladas e os restos de lúpulo coagulado conhecido como *trub*, para a retirada desses dejetos de proteína e lúpulo, usa-se a técnica de *whirlpool*, que nada mais é, que realizar movimentos rotatórios vigorosos sobre o mosto cervejeiro, formando uma espécie de redemoinho e deixar em repouso por alguns minutos a fim de sedimentar as proteínas e *trub* e facilitar o processo de transferência para o fermentador (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2017).

1.5.5. Resfriamento

Realizada a fervura, o mosto cervejeiro deve ter temperatura adequada para a adição da levedura, e essa temperatura segundo Stewart, Russell e Anstruther, (2017) devem estar de acordo com o tipo de cerveja que se deseja produzir, de 8 ° C a 15 ° C para as cervejas de baixa fermentação conhecidas como cervejas *Lagers* e de 18 ° C a 22 ° C para as cervejas do tipo *Ale* que são as cervejas de alta fermentação.

O processo de resfriamento se dá pela aplicação de tecnologia de troca de calor, nas cervejarias artesanais é utilizado um *chiller* de contra fluxo ou *chiller* de placas para realizar a troca de calor, que faz com que o mosto cervejeiro saia de temperaturas elevadas após o processo de fervura e alcance a temperatura ideal de acordo com o tipo de cerveja que se deseja produzir, faz se importante ressaltar que essa etapa deve ser rigorosamente realizada de forma bem rápida a fim de evitar a formação de compostos indesejáveis bem como a contaminação por bactérias e leveduras selvagens (MACIEJ SERDA et al., 2020).

1.5.6. Fermentação

Em seu sentido mais amplo, o termo fermentação, pode ser usado para se referir a qualquer processo no qual um microrganismo facilita a conversão de uma substância em um produto específico. Portanto, a racional exploração da atividade metabólica do microrganismo é a fermentação industrial. Do ponto de vista bioquímico, eles só podem ser categorizados como fermentação aeróbica e anaeróbica (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2017).

A fermentação alcoólica para a fabricação de bebidas, dentre elas a cerveja, e boa parte da matéria prima utilizada como aditivos são originárias da

agricultura, e em sua maioria são cereais, e esses após serem malteados, tornam-se viáveis ao mosto, que será a fonte de alimentação. A matéria prima para produção do álcool na cerveja são as amiláceas, cujo principal substrato é o amido, e esse pode ser sacarificado por via enzimática, gerando assim o malte (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

No final do século XIX, o microrganismo responsável pela transformação de açúcar em álcool foi identificado, e para todas as linhas de produção de cerveja a principal levedura são as do gênero *Saccharomyces*, e o procedimento de fermentação se dá em ambiente anaeróbico, e do ponto vista bioquímico, a fermentação ocorre com único objetivo de gerar reoxidação de NADH formado na via glicolítica. Se à levedura é dado como nutriente uma sacarose, primeiro ocorrerá a hidrólise da sacarose à glicose e frutose e posteriormente a absorção dos monossacarídeos (VENTURINI FILHO; EDGARD BLUCHER, 2005).

A finalidade do processo de fermentação é transformar os açúcares fermentativos produzidos na etapa de mostura em gás carbônico e etanol, o mosto cervejeiro é rico em açúcares especialmente a maltose, e a metabolização desse açúcar pela adição da levedura *Saccharomyces cerevisae* caracteriza o processo denominado fermentação (BERRY; RUSSELL; STEWART, 2012).

Existe no mercado cervejeiro uma infinidade de fermentadores, indo desde baldes fermentadores, fermentadores cônicos construídos com polímero de policloreto de vinila (PVC), fermentador auto refrigerado e tanques fermentadores construídos em aço inoxidável. Independente do fermentador utilizado, a levedura *Saccharomyces cerevisae* é adicionada ao mosto cervejeiro para metabolizar os açúcares e gerar etanol e gás carbônico, o percentual de etanol está associado ao tipo e estilo de cerveja que irá se produzir (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2017).

Assim como na etapa de resfriamento, é possível surgir durante o período de fermentação a formação de compostos indesejáveis como diacetil, dimetil sulfeto (DMS) e acetaldeído que irão gerar entre outras coisas sabores e odores indesejáveis na cerveja (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A formação de diacetil transfere para a cerveja o aroma de manteiga rançosa, esse e outros subprodutos gerados durante o processo de fermentação como ácidos, álcoois superiores, ésteres, ligações de enxofre influenciam diretamente no aroma e sabor da cerveja e só estarão formados

em sua totalidade após a segunda fermentação, conhecida como etapa de maturação (VENTURINI FILHO; EDGARD BLUCHER, 2005).

1.5.7. Maturação

A produção de um produto estável, límpido e de qualidade adequada para o envase são as características esperadas pelo processo de maturação, que tem por objetivo a clarificação, a estabilidade e a gaseificação que é a incorporação do gás carbônico produzido na etapa de fermentação à cerveja (BAMFORTH, 2009).

Na maturação também é possível reduzir o efeito no aroma e sabor de todos os subprodutos gerados na fermentação. Nessa fase, nota-se que a maior parte ou quase totalidade dos açúcares produzidos na mostura já não existem mais, pois já foram metabolizados pela levedura *Saccharomyces cerevisae*, porém os açúcares ainda presente serão metabolizados pela levedura que resultará na carbonatação da bebida, uma vez que o gás carbônico incorpora na cerveja, ocorre também a sedimentação da levedura e resíduos de levedura na parte inferior interna do fermentador, facilitando o processo de retirada desse sedimento que irá ocorrer na etapa de filtração, que nem todas as cervejarias realizam, mas essa etapa tem por objetivo retirar todos os resíduos de leveduras e outros subprodutos, afim de, produzir um cerveja límpida e brilhante (LEWIS; YOUNG, 2012).

1.5.8. Envase

O envase da cerveja produzida em microcervejarias e em grandes cervejarias, pode ser dividido em dois grupos, as embalagens grandes como barris e tanques resfriados, e as embalagens pequenas como latas de alumínio, garrafas de vidro e *growlers* que pode ser confeccionado em material plástico, o polietileno (PET) ou em aço inoxidável também (BAMFORTH, 2016; LEWIS; YOUNG, 2012) .

Todo o processo de envase é realizado em contrapressão, utiliza-se CO₂ para evitar a formação de espuma e eliminar o O₂ contido no interior da embalagem que será utilizada, caso a cerveja tenha contato com o O₂, a cerveja irá apresentar problemas relacionados ao controle de qualidade físico-químico e possíveis contaminações microbiológicas, por isso se faz necessário um cuidado exagerado quanto aos riscos de contaminação, pois uma cerveja contaminada não pode ser colocada à venda e isso irá gerar prejuízos ao fabricante (FERNANDES, 2012).

Identificado como a fase final na cadeia produtiva, a bebida após envasada em latas e garrafas é encaminhada à pasteurização a fim de aumentar o tempo de vida útil da bebida e essa passa a ser denominada cerveja, enquanto a bebida envasada em barril e que não passa pelo processo de pasteurização é denominada chope, importante ressaltar que em algumas cervejarias artesanais, a bebida envasada em garrafas de vidro, pet e *growlers* que não passam pela pasteurização, também são classificadas como chope, no caso chope artesanal (MENEZES, 2019).

1.6. Controle de qualidade na produção de cerveja

Os requisitos de controle de qualidade variam de acordo com o tamanho e a escala da operação de fabricação de cerveja. Uma cervejaria de pequena escala com menos pessoas envolvidas na produção enfrentará desafios diferentes de uma empresa de grande escala. Os bebedores são muito mais exigentes do que há 20 anos, e a consistência na qualidade do aroma, sabor e aparência é crucial para cervejas artesanais (STEWART; RUSSELL; ANSTRUTHER, 2017).

Influenciada pela matéria-prima e pelo processo produtivo, qualquer erro ou interferência neste fluxo irá alterar as características sensoriais do produto e desempenhar um papel significativo na sua má qualidade. A qualidade das matérias-primas é sempre um desafio para o cervejeiro e muitas vezes difícil de compensar durante o processo de produção.

Qualidade consistente não acontece por acaso; em vez disso, deve ser gerenciado de forma eficaz em todos os níveis organizacionais com foco na melhoria contínua e no objetivo de atender às necessidades do cliente. O escopo do controle de qualidade nas cervejarias pode variar significativamente, podendo ser uma coleção de atividades relatadas verbalmente com detalhes minimamente documentados em uma microcervejaria ou um conjunto sofisticado de manuais documentados, procedimentos e interações em atividades produtivas (PAHL; MEYER; BIURRUN, 2016).

Por normas padrão, vários indicadores de qualidade da cerveja são compartilhados por quase todas as cervejarias. A aplicação de testes microbiológicos permite eliminar o potencial de degradação microbiológica em adição aos métodos analíticos, esses testes buscam determinar se a sanitização e os procedimentos de

higienização e esterilização são procedimentos de esterilização eficazes (LUARASI; TROJA; PINGULI, 2016).

1.6.1. Contaminantes

Os estágios de contaminação da cerveja ocorrem principalmente durante as fases de pré e pós-maturação, e alguns contaminantes podem persistir no líquido do cervejeiro até o fervor. Materiais, desde a água às leveduras inoculadas durante o processo de fermentação, são uma fonte significativa de contaminação para bebidas alcoólicas.

Numerosos microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas bem como leveduras selvagens, estão ligados à deterioração da cerveja. As principais bactérias responsáveis pela degradação de bebidas por organismos Gram-positivos são os anaeróbios facultativos *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.*, que produzem ácido láctico. Estes são os que mais atrapalham a produção das cervejarias, pois são os responsáveis por cerca de 70 % da deterioração da produção.

Dois gêneros de bactérias conhecidas como *Megasphaera* e *Pectinatus* pertencem à família *Acidaminococcaceae* e são consideradas as bactérias anaeróbias mais importantes na indústria cervejeira, devido ao fato de que essas bactérias são anaeróbicas e que os avanços na tecnologia de recipientes para bebidas fornecem quase zero por cento de oxigênio, as incidências de contaminação microbiológica com essas bactérias aumentaram visivelmente entre 1980 e a década atual (SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

1.6.2. Bactérias Gram-positivos deteriorantes de cerveja

Utilizados na produção de alimentos e bebidas, eles, no entanto, também podem contribuir para a produção de odores e sabores desagradáveis no mesmo. São bactérias Gram-positivas, catalase negativas que não formam esporos e se reproduzem em condições Gram-positivo, ou microaerófilas. No produto de sua fermentação, eles são classificados como homo ou heterofermentativos. O principal produto da fermentação produzido pelos homofermentativos é o ácido láctico, enquanto heterofermentativos também produzem ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol (BRUNO, 2017).

Importante destacar *Lactobacillus spp* e *Pediococcus spp* entre as bactérias Gram-positivas. O maior grupo de bactérias que produzem ácido láctico é chamado *Lactobacillus* e contém várias espécies diferentes. Essas bactérias podem causar turbidez e sabor desagradável, como acidez e odores característicos na cerveja, um exemplo desse microrganismo é o *Lactobacillus casei*, bactéria que pode produzir uma substância chamada diacetil, que confere um sabor de manteiga desagradável à cerveja. A bactéria *Pediococcus spp* dá à cerveja um sabor e aroma ácidos que são amplificados pela produção de diacetil e podem ser encontrados durante todas as etapas da produção da cerveja (SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

1.6.3. Bactérias Gram-negativas deteriorantes de cerveja

Os principais gêneros deterioradores da cerveja em termos de bactérias Gram-negativas são *Pectinatus spp* e *Megasphaera spp* e a contaminação por esses microrganismos podem resultar em produto turvo e com sabores ruins. *Pectinatus spp* é o bacterianogênero que causa a contaminação microbiológica mais nociva em cervejarias, pois seu crescimento e metabolismo podem resultar em odor fecal, as espécies mais conhecidas são *Pectinatus frisingensis* e *Pectinatus cerevisiaephilus* (RODRÍGUEZ SAAVEDRA; GONZÁLEZ DE LLANO; MORENO ARRIBAS, 2020; RODRÍGUEZ SAAVEDRA et al., 2021; SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

Essas bactérias anaeróbicas Gram-negativas são encontradas com menos frequência como degradadoras de cerveja quando comparado às bactérias produtoras de ácido láctico. *Pectinatus spp* e *Megasphaera spp*, por outro, são reconhecidos como degradadores obrigatórios de cerveja, quando presentes, o que significa que sua presença indica a necessidade de abordar uma situação contaminante (DRAGONE et al., 2007).

2. HIPÓTESE

No cenário cervejeiro atual, nota-se o crescimento e a evolução da produção de cervejas artesanais. Esse fato tem contribuído para o surgimento de novas microcervejarias e, associado a isso, Goiás tem se destacado no mercado nacional de cervejas especiais. Com esse notável desenvolvimento, é imperativo garantir a qualidade das cervejas artesanais produzidas em microcervejarias, de forma a oferecer um produto confiável e seguro. Neste contexto, pretende-se possibilitar medidas de controle de qualidade, que garantam a eficiência microbiológica e as características sensoriais da bebida. Além disso, é importante que este protocolo tenha sua aplicação viável em microcervejarias, portanto, também é importante reduzir o custo financeiro para realização das análises laboratoriais. O presente trabalho visa desenvolver um meio de cultura próprio, que venha a substituir de maneira eficaz os produtos que hoje são disponíveis apenas no comércio internacional, e, portanto, dispendiosos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de controle de qualidade microbiológica das linhas de produção cervejeira e do produto finalizado que apresente custo viável para aplicação em microcervejarias.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar os pontos críticos que contribuem para a má gestão de qualidade microbiológica dentro de uma microcervejaria;
- Desenvolver um meio de cultura líquido com características qualitativas que identifiquem a presença ou não de microrganismos degradantes nas etapas do processo de produção de cerveja artesanal;
- Elaborar um meio de cultura líquido seletivo para microrganismo produtores de biofilme presentes nas máquinas, peças e conexões hidráulicas da microcervejaria;
- Identificar os pontos de coleta de material em uma microcervejaria artesanal, coletar e processar as análises utilizando os meios de cultura desenvolvidos;
- Comparar os resultados obtidos nas análises com os meios de cultura desenvolvidos nesse trabalho com meios de cultura já disponíveis no mercado.
- Elaborar um protocolo completo de análise da qualidade microbiológica específico para aplicação em microcervejarias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Definição do experimento

O trabalho foi dividido em duas metades, sendo que na primeira, foi realizada uma revisão sistemática para conhecer melhor a literatura relacionada ao processo de produção de bebidas alcoólicas artesanais, bem como as atividades de controle de qualidade do cervejeiro. Esta revisão também procurou identificar áreas potenciais para pesquisas futuras e permitiu constatar que o tema é ainda incipiente quando se trata de modelos ou programas de qualidade para pequenas cervejarias, segmento este ao qual as microcervejarias estão inseridas. A seleção da microcervejaria e a implementação das técnicas de análise propostas pelo estudo compuseram a fase dois.

4.2. Revisão sistemática da literatura

O procedimento de busca levou em conta as bases de dados: Periódicos da Capes, Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações SCieLO - Scientific Electronic Library Online, Web of Science, Scopus, que são consideradas os maiores repositórios de documentos acadêmicos. As palavras chaves usadas nos termos de busca são as mesmas que compõem o presente estudo, sendo estas: cerveja artesanal, qualidade microbiológica de bebidas, deteriorantes de cerveja. Foram inclusos artigos publicados em inglês, português ou espanhol, desde 2006 aos dias atuais, além de livros e e-books.

4.3. Seleção da microcervejaria

Os experimentos foram realizados em microcervejaria situada em Anápolis-GO, que conta com produção própria das cervejas servidas no seu restaurante. A produção mensal da microcervejaria é estimada em 30.000 litros dentre 8 estilos diferentes de cervejas, sendo eles Pilsen, Weisbier, Session IPA (Indian Pale Ale), NEIPA (New England Indian Pale Ale), Imperial IPA, Sour, Smoothie Sour e Red Ale.

4.4. Elaboração dos meios de cultura de análise qualitativa

Para elaboração dos meios de cultura, foi necessário o uso de alguns equipamentos e materiais disponíveis nos laboratórios da Universidade Evangélica de

Goiás. Usou-se, provetas, balança analítica, béquer, balão volumétrico, bastão de vidro, pissetas, pipetadores, espátulas, swab descartável, tubo de ensaio e vidro de relógio. Para a composição dos meios de cultura denominados SCL-A e SCL-B propostos nos objetivos deste estudo, foram utilizados os reagentes mencionados nas tabelas 3 e 4, com suas respectivas massas e volumes.

Tabela 3. Ingredientes para composição do meio enriquecedor líquido SCL – B (adaptação do meio NBB® - Concentrate (NBB®-C))

INGREDIENTES	QUANTIDADE
<i>L Cisteína</i>	0,2 g
<i>Dextrose</i>	15 g
<i>Fosfato Dissódico</i>	2,3 g
<i>Ácido Málico</i>	0,5 g
<i>Maltose</i>	15 g
<i>Caseína Digerida</i>	5 g
<i>Polisorbato 80</i>	0,5 mL
<i>Acetato de Potássio</i>	6 g
<i>Extrato de Levedura</i>	7 g
<i>Extrato de Soja</i>	0,8 g
<i>Cloreto de Sódio</i>	0,52 g
<i>Glicose</i>	0,3 g
<i>Vermelho de Metila</i>	0,07 g
<i>Água destilada qsp</i>	1000 mL

Fonte: Autoria própria

Tabela 4. Ingredientes para composição do meio enriquecedor líquido SCL – A (adaptação do meio Wallerstein Nutrient Broth (WLN))

INGREDIENTES	QUANTIDADE
<i>Cloreto de Cálcio</i>	0,125 g
<i>Dextrose</i>	50 g
<i>Cloreto Férrico</i>	0,0025 g
<i>Sulfato de Magnésio</i>	0,125 g
<i>Sulfato de Manganês</i>	0,0025 g
<i>Fosfato Monopotássico</i>	0,55 g
<i>Cloreto de Potássio</i>	0,425 g
<i>Caseína Digerida</i>	5 g
<i>Extrato de Soja</i>	0,8 g
<i>Cloreto de Sódio</i>	0,52 g
<i>Fosfato Dissódico</i>	0,3 g
<i>Glicose</i>	0,3 g
<i>Vermelho de Metila</i>	0,022 g
<i>Água destilada qsp</i>	1000 mL

Fonte: WLN – adaptado - Autoria própria

4.5. Local de coleta e identificação dos pontos de coleta

Foram realizadas três coletas de material, incluindo pontos considerados críticos nas linhas de produção, e amostras de cerveja prontas para envase. Coletaram-se amostras para a análise higiênica em peças e conexões hidráulicas e para saber se havia deterioradores nas amostras de cerveja. Os mesmos critérios de seleção foram aplicados nas três coletas de amostras realizadas.

4.6. Coleta de amostras

A coleção de pontos na demonstração inicial incluiu conexões hidráulicas de tanques e barris de cerveja, e foram testados para os meios de enriquecimento SCL-A e SCL-B e para o padrão de referência NBB®-B-Am usado no processo de controle de higiene. Para essa coleta, fracionaram-se os meios de cultura em tubos de ensaio com capacidade para 10 mL, adicionando-se em cada tubo estéril, 2 mL de do meio de cultura. As amostras foram coletadas com um auxílio do swab estéril nas peças apresentadas nas figuras a seguir, tendo as seguintes denominações:

- conexão de envase – peça 1 (Figura 6);
- manifold de envase – peça 2 (Figura 7) e;
- extratora de envase – peça 3 (Figura 8);

Também foi feito o controle negativo usando soro fisiológico estéril, e um controle positivo foi garantido pelo uso de cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Candida albicans* cultivadas nas mesmas condições das amostras.



Figura 6. Conexão de envase

Fonte. Arquivo pessoal



Figura 7. Manifold de envase

Fonte. Arquivo pessoal



Figura 8. Extratora de envase

Fonte. arquivo pessoal

Para a primeira coleta de amostra de cerveja, adicionou-se 15 mL de meio de enriquecimento SCL-A e SCL-B e do padrão de referência NBB[®]-C, em frasco estéril de 250 mL, coletou-se então cerca de 235 mL de cerveja para cada frasco, completando o seu volume. As cervejas disponíveis para avaliação na data da primeira coleta foram do tipo New England IPA, uma cerveja Red Ale e uma cerveja no estilo IPA. Na data da segunda coleta, as cervejas disponíveis para análise foram todas do tipo Imperial e Pilsen, porém em diferentes etapas do processo produtivo, seguindo a sugestão dos mestres cervejeiros da cervejaria parceira. coletaram-se amostras da cerveja nos tanques em etapa de fermentação e maturação.

4.7. Incubação das amostras

As amostras das conexões hidráulicas nos meios SCL-A e SCL-B, bem como o material de referência NBB[®]-B-Am foram incubados em estufa por três dias à temperatura de 27° C em ambiente aeróbico com o objetivo de identificar falhas qualitativas no processo de higiene da fábrica.

As amostras de cerveja nos meios SCL-A e SCL-B e para o padrão de referência NBB[®]-C, foram incubadas em estufa durante 12 dias a uma temperatura de 27° C num ambiente aeróbico, O objetivo dessa análise foi observar a turbidez do meio e garantir a presença ou não de microrganismos que podem danificar a cerveja. Isso pode ser observado a partir do terceiro dia do processo de incubação.

5. RESULTADOS

A proposta inicial deste estudo foi elaborar um protocolo de qualidade microbiológico para cervejarias artesanais por intermédio da elaboração de um meio de cultura líquido, que obtivesse segurança higiênica e garantisse a qualidade microbiológica das cervejas produzidas em uma cervejaria artesanal. Os resultados apresentados a seguir, são dados retirados e interpretados a partir da primeira coleta.

5.1. Resultados das análises do primeiro dia de coleta.

5.1.1. Peças e conexões hidráulicas testadas com SCL-A, SCL-B e meio padrão NBB®-B-Am

Os resultados das análises com as peças da linha de produção usando os meios elaborados neste estudo foram semelhantes e corroborados pelos resultados obtidos com o meio de cultura comercial usado como referência para essa análise.

Após a coleta e incubação a 27° C por três dias, as amostras foram submetidas e analisadas juntamente com os mestres cervejeiros e o resultado obtido é favorável ao uso do meio elaborado neste estudo, pois ele apresentou características semelhantes quando comparado ao meio de referência. Para a peça um, conexão de envase, obteve-se turvação em todos os tubos e foi notado formação de biofilme no meio SCL-A nas duas análises, na primeira análise negativo para a formação de biofilme e na segunda análise com resultado positivo para a formação de biofilme para os meios SCL-B e NBB®-B-Am respectivamente. Estes resultados estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 1

Meio de Cultura	1ª análise	2ª análise
SCL-A	Positivo	Positivo
SCL-B	Negativo	Positivo
NBB®-B-Am	Negativo	Positivo

Fonte. Autoria própria

Para a peça dois, manifold de envase, obteve-se turvação em todos os tubos e foi notado formação de biofilme no meio SCL-A e SCL-B nas duas análises.

Resultados que foram replicados pelo meio de cultura referência (NBB®-B-Am). Estes resultados estão resumidos na tabela 6.

Tabela 6. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 2

Meio de Cultura	1ª análise	2ª análise
SCL-A	Positivo	Positivo
SCL-B	Positivo	Positivo
NBB®-B-Am	Positivo	Positivo

Fonte. Autoria própria

A análise da peça três e do controle positivo/negativo obtiveram 100% de concordância entre amostras, meio, análise e resultado, portanto, na extratora de envase a peça três, obteve-se turvação em todos os tubos e foi notado formação de biofilme no meio SCL-A, SCL-B e NBB®-B-Am nas duas análises. Para as amostras controle positivo também foi observado a formação de biofilme e a turvação de ambas as amostras e conseqüentemente a não formação de biofilme para o controle negativo em ambos os meios submetidos ao teste. Estes resultados estão resumidos na tabela 7 e 8.

Tabela 7. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – peça 3

Meio de Cultura	1ª análise	2ª análise
SCL-A	Positivo	Positivo
SCL-B	Positivo	Positivo
NBB®-B-Am	Positivo	Positivo

Fonte. Autoria própria

Tabela 8. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – controles

Controle Positivo e Negativo			
Meio de Cultura	<i>E. coli</i>	<i>C. Albicans</i>	Soro Fisiológico
SCL-A	Positivo	Positivo	Negativo
SCL-B	Positivo	Positivo	Negativo
NBB®-B-Am	Positivo	Positivo	Negativo

Fonte. Autoria própria

Isso torna importante observar que o meio de cultura SCL-B reproduz fielmente a análise representada pelo meio de cultura usado como referência NBB®-B-Am. Ressalta-se também que a análise deve ser sempre submetida às mesmas condições de coleta, armazenamento, tempo e temperatura durante o processo de incubação.

5.1.2. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais – controle negativo

A primeira amostra submetida ao processo de análise foi a um controle negativo, utilizando-se solução estéril de soro fisiológica como amostra. Após o período de incubação foi observado que não houve turvação em nenhum meio de cultura, o que elimina a possibilidade de presença de deteriorantes na amostra e corrobora a reprodução de resultados fidedigna dos meios elaborados neste estudo.

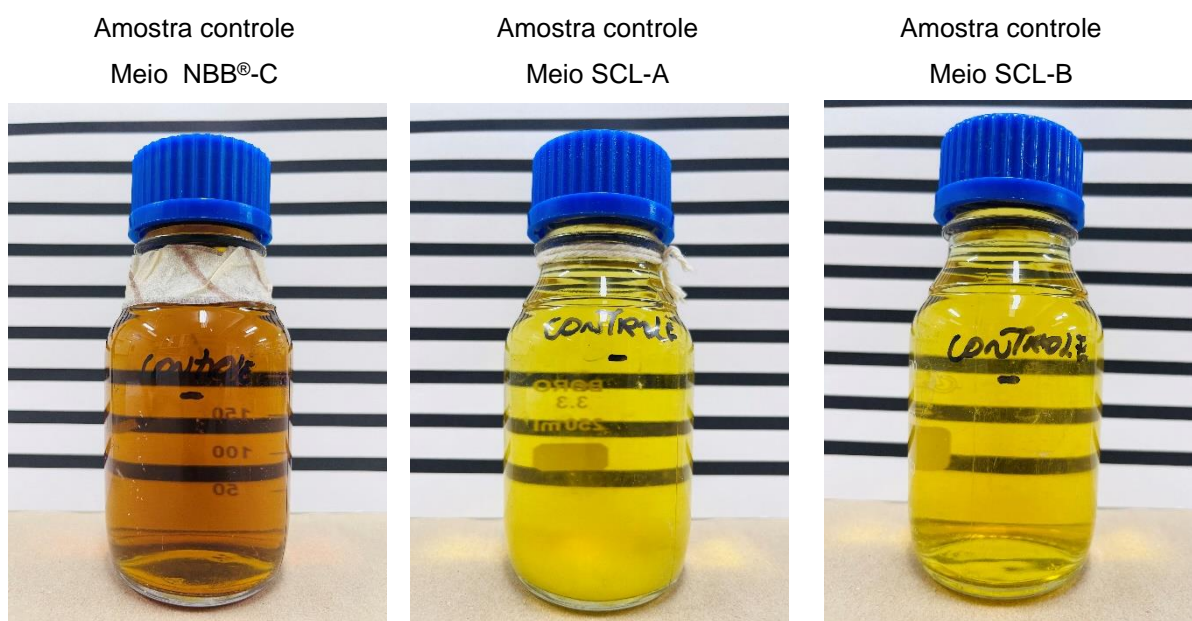


Figura 9. Análise de deteriorante na amostra controle.

Fonte. Arquivo pessoal

5.1.3. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - New England IPA

A segunda amostra examinada usando o método qualitativo sugerido nesta investigação para identificar fatores de deterioração em cervejas artesanais foi uma

cerveja New England IPA, que apresentou turvação nos meios SCL-A, SCL-B e NBB®-C indicando uma possível contaminação microbiológica, também foi possível a observação de um depósito do fundo de garrafa que é característico desse estilo.



Figura 10. Análise de deteriorante na cerveja do tipo New England IPA.

Fonte. Arquivo pessoal

5.1.4. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - Cerveja Red Ale

A terceira amostra analisada através do mesmo procedimento foi a cerveja do estilo Red Ale. Os resultados encontrados nesta análise, se assemelham e corroboram os resultados encontrados para o estilo New England IPA, onde obteve-se turvação nos meios SCL-B e NBB®-C indicando uma possível contaminação por microrganismos com capacidade deteriorante de cervejas e garantindo a repetição e reprodutibilidade do meio elaborado por este estudo em relação ao meio de cultura usado como referência.



Figura 11. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Red Ale.

Fonte. Arquivo pessoal

5.2. Resultados das análises da segunda coleta.

5.2.1. Peças e conexões hidráulicas testadas com SCL-A, SCL-B e meio padrão NBB®-B-Am

As amostras semeadas nos meios SCL-B e meio padrão NBB®-B-Am não apresentaram nenhum crescimento microbiológico, enquanto as amostras colhidas da válvula borboleta e a torneira italiana 2, semeadas no meio SCL-A apresentaram formação de biofilme e turvação de amostra. Estes resultados estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9. Resultado qualitativo para a formação de biofilme – 2ª coleta

Peças			
Meio de Cultura	Válvula Borboleta	Torneira Italiana 1	Torneira Italiana 2
SCL-A	Positivo	Negativo	Positivo
SCL-B	Negativo	Negativo	Negativo
NBB®-B-Am	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte. Autoria própria

5.2.2. Análise qualitativa da formação de deteriorantes em cervejas artesanais - Cerveja Imperial e Pilsen em diferentes etapas do processo produtivo

A proposta foi verificar a turbidez, e essa não foi notada nos frascos com meio de cultura SCL-A, SCL-B e NBB[®]-C que continham amostra de cerveja Imperial que estava em processo fermentação.

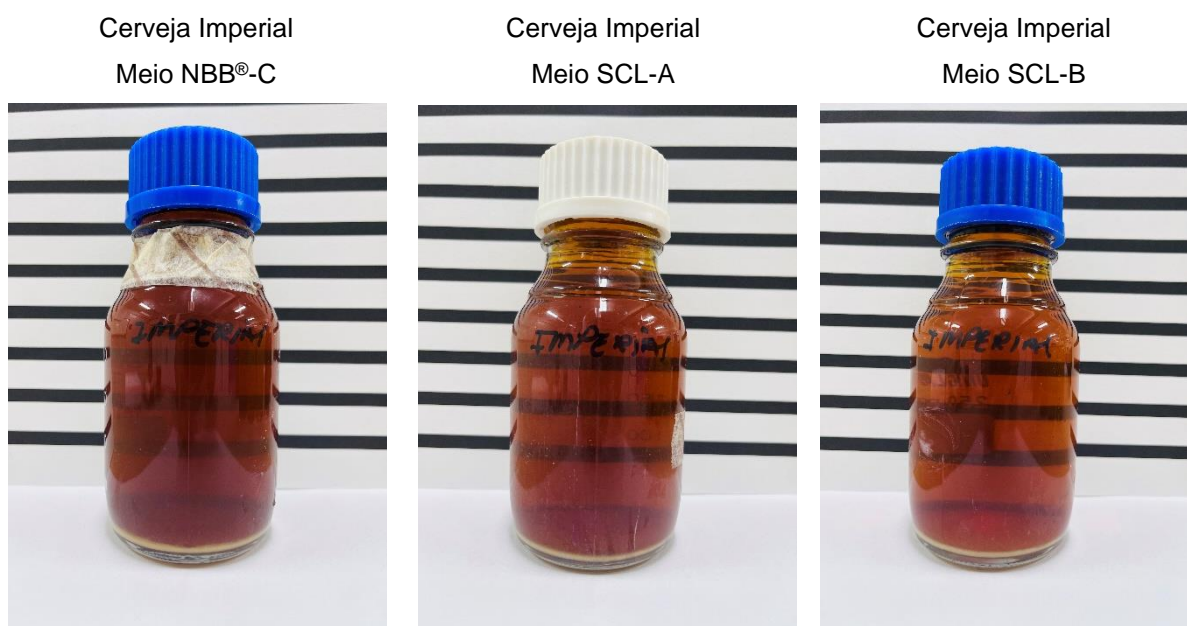


Figura 12. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Imperial em etapa de Fermentação.

Fonte. Arquivo pessoal

Também não se observou crescimento microbiológico e alteração na turbidez de amostras da cerveja pilsen em processo de maturação, inoculada nos meios SCL-B e SCL-A e NBB[®]-C respectivamente.



Figura 13. Análise de deteriorante na cerveja do tipo Pilsen em etapa de Maturação.

Fonte. Arquivo pessoal

6. DISCUSSÃO

Os pontos de monitoramento para a cervejaria artesanal são cruciais para o controle microbiológico do processo, e esses foram escolhidos para abranger desde as fases que antecedem a mostura até as etapas de fermentação ao envase. Também foi feita uma observação qualitativa do crescimento de microrganismos em peças de ligação hidráulica. Os métodos para detecção de microrganismos não são amplamente utilizados, e há pesquisas insuficientes sobre eles. A indústria está constantemente trabalhando para desenvolver métodos rápidos para detecção de bactérias que danificam as cervejas artesanais.

O caldo NBB[®]-B-Am utilizado como referência neste estudo possibilita o monitoramento de deficiências contínuas da produção ao envase por meio da detecção de germes indicadores de biofilme, observando essas condições os meios de cultura propostos nesse estudo SCL-A e SCL-B foram colocados contra a prova do meio referência (DÖHLER, 2001).

Na peça um, denominada conexão de envase, o meio SCL-B teve comportamento semelhante ao meio referência, evidenciado turbidez e crescimento de biofilme na segunda análise, enquanto na primeira análise ambos não apresentaram germes indicadores de biofilme, todavia o meio SCL-A mostrou se positivo para turbidez e formação de biofilme nas duas análises, o que difere do meio referência.

Quando avaliado o manifold de envase, neste trabalho denominado peça dois, nenhum dos meios elaborados neste estudo corroboraram os resultados obtidos por meio do caldo NBB[®]-B-Am. A concordância geral dos resultados para a análise das 3 peças hidráulicas foi de 55% entre os meios SCL-A e o NBB[®]-B-Am e de 88% entre os meios SCL-B e o NBB[®]-B-Am. Para as amostras de controle positivo e negativo, os resultados para todos os meios obtiveram 100 % de concordância.

Nas peças avaliadas na segunda remessa de testes realizadas no dia 11 de maio do presente ano, também não se encontrou germes indicadores de biofilme em nenhuma das amostras semeadas nos meios SCL-B e caldo NBB[®]-B-Am.

A preocupação com os biofilmes formados nas peças de ligação hidráulica é que, se o biofilme se romper, os germes se dispersam no ambiente por meio de aerossóis e acabam ficando isolados nas garrafas. Esses germes incluem bactérias

láticas como *Lactobacillus spp* e *Pediococcus spp* que normalmente são encontradas em 60 a 90% dos problemas relacionados a deterioração da cerveja, e normalmente se depositam em resíduos de substrato em locais inacessíveis à instalação de envase (BIBLIOTECA DE MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS, 2020).

Na avaliação da cerveja em diferentes etapas do processo de produção e também de diferentes estilos de cerveja, observou que os meios SCL-A e SCL-B são compatíveis e reproduzem de maneira fidedigna os resultados obtidos para as mesmas amostras de cerveja inoculadas no meio NBB[®]-C, para esse estilo de cerveja nenhuma alteração na turbidez, sugerindo assim, que não nesta análise a possibilidade de existência de deteriorantes de cerveja, uma vez que esse é observado quando há turbidez na amostra.

Para a cerveja New England IPA, observou sim turvação nas amostras inoculadas nos meios SCL-A, SCL-B e NBB[®]-C, a dificuldade de análise deste estilo de cerveja está relacionado a sua forma de produção elaborada, sem adição de aditivos, e por utilizar técnicas e receitas tradicionais que valorizam as diferenças de cores, sabores e fragrâncias, na cerveja New England IPA nota-se leve a moderado aroma floral que é percebido como um aroma de flores do campo, também tem uma espessura, gerada pelos sedimentos de levedura, que devem ser misturados antes de beber, e esses sedimentos tornam a cerveja turva, dificultando assim a observação no teste qualitativo de turbidez (STRONG et al., 2012).

Os resultados da análise da cerveja estilo Red Ale foram comparados aos encontrados para New England IPA, onde houve alteração na turbidez no meio SCL-B e NBB[®]-C, indicando contaminação por microrganismos com capacidade de degradar bebidas alcoólicas, essa observação garante a repetibilidade e reprodutibilidade do meio SCL-B, quando comparado ao caldo NBB[®]-C.

Para as amostras coletadas e inoculadas na segunda etapa de coleta, o meio SCL-A e SCL-B teve comportamento semelhante ao meio referência quando se analisou a cerveja do estilo Imperial em processo de fermentação, e cerveja do estilo Pilsen, porém na etapa de maturação do processo cervejeiro, quando não se observou nenhuma alteração de turbidez nas amostras inoculadas nos meios elaborados neste estudo, bem como no meio usado como referência. A concordância geral dos resultados para a análise das cervejas foi de 60% entre os meios SCL-A e o NBB[®]-C e de 100% entre os meios SCL-B e o NBB[®]-C. Este resultado corrobora com a

superioridade do meio SCL-B encontrada na avaliação das peças hidráulicas quando comparado aos meios disponíveis comercialmente.

A proposta deste estudo foi criar um protocolo por meio da utilização de meios de cultura líquidos, que com características semelhantes a meios de referências, fossem capazes de identificar de maneira qualitativa a presença de agentes formadores de biofilme em peças de conexão hidráulica, bem como a sugestão da presença ou não de microrganismos deteriorantes em cervejas. O meio NBB[®]-C, produzido e importado pela empresa Döhler é responsável por sugerir a presença de deteriorantes da cerveja em várias etapas do processo produtivo que abrange a cerveja filtrada, a etapa de fermentação, a etapa de maturação, assim como a presença de microrganismos na cerveja do estilo Weissbier, também se nota que todas as bactérias contaminantes de cervejas e germes indicadores de biofilme podem ser encontradas nas peças de conexão hidráulicas e linhas de produção de cerveja quando usado o caldo NBB[®]-B-Am (DRAGONE et al., 2007). Estes meios apresentam usos específicos em cada análise do ambiente da microcervejaria, o que aumenta os custos do protocolo de controle microbiológico.

Baseado nos resultados encontrados no presente, estudo esse pioneiro na temática, foi desenvolvido um protocolo completo de avaliação microbiológica de microcervejarias (Apêndice 1), incluindo a produção meio SCL-B, visto que esse meio apresentou concordância elevada nos resultados obtidos com os caldos usados como referência. O fato de um único meio de cultura ser empregado tanto nas análises das peças de tubos e conexões da linha de produção quanto dos produtos finalizados simplifica o protocolo de controle de qualidade e reduz os custos da avaliação.

7. CONCLUSÕES

Ao concluir este trabalho nota-se a importância de garantir a qualidade ao produto que será entregue ao consumidor final, pois quando se fala de qualidade na microcervejaria, a segurança do produto, a qualificação dos recursos humanos, a higienização do ambiente, são primordiais para que a empresa garanta um produto de qualidade e não tenha prejuízos e nem problemas sérios.

Criar dois meios de cultura na forma de caldo que fossem semelhantes as ações encontradas por caldos de referência, torna esse tipo de análise mais barata e condiciona o proprietário da empresa realizar tais análises com maior frequência, no intuito de sempre fornecer ao cliente um produto de qualidade.

Neste estudo foi possível notar que a higienização do ambiente de produção está diretamente ligada ao surgimento de microrganismos formadores de biofilme e esses com capacidade de contaminação à cerveja, uma vez que os principais microrganismos deteriorantes necessitam de porcentagem baixa ou quase nenhum oxigênio presente para que haja sua reprodução.

Sugere para estudos futuros, a identificação das espécies bacterianas encontradas nos meios que tiverem alteração na turbidez e nas peças de conexão hidráulicas que formarem biofilme, com a identificação desses microrganismos será possível prosseguir com testes, bem como sugerir medidas de eliminação dos espécimes encontrados, bem como garantir um ambiente e uma cerveja livre de deteriorantes.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. C. DE et al. Effect of Hop β -Acids Extract Supplementation on the Volatile Compound Profile of Roasted Chicken Meat. **Processes**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2023.

ÁVILA, R. A. DE et al. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO MINERAL DA ÁGUA NA QUALIDADE DA CERVEJA. **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: O AVANÇO DA CIÊNCIA NO BRASIL**, v. 1, n. 1, p. 121–131, 30 ago. 2022.

BAMFORTH, C. W. Beer : a quality perspective. p. 288, 2009.

BAMFORTH, C. W. **Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=52OdBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=BAMFORTH,+C.+W.+Brewing+materials+and+processes:+A+practical+approach+to+beer+excellence.+Academic+Press,+2016.&ots=t0b3kfM77-&sig=tvgwLdd-UrHJwLeTYu_5MdfIxA#v=onepage&q=BAMFORTH%2C%20C.%20W.%20Brewing%20materials%20and%20processes%3A%20A%20practical%20approach%20to%20beer%20excellence.%20Academic%20Press%2C%202016.&f=false>. Acesso em: 24 jun. 2023.

BARBOSA, L. M. A PRODUÇÃO DE CERVEJA AO LONGO DA HISTÓRIA. **INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO CAMPUS BARRETOS**, 2018.

BEERCODE. **A Lei de Pureza Alemã**. Disponível em: <<https://www.beercode.com.br/post/a-lei-de-pureza-alema>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

BELTI, M. A.; DUARTE, F.; GEORG-KRAEMER, J. E. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação. **Ciência Rural**, v. 42, n. 3, p. 467–473, mar. 2012.

BERRY, D. R.; RUSSELL, I.; STEWART, G. C. **Yeast Biotechnology**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=AobpCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&ots=3Ppwox5-c1&sig=j1gOTWqyoCUy4TsBF1hGiTpS_4o&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 24 jun. 2023.

BIBLIOTECA DE MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS. **PARTE 1 - Deteriorantes de cerveja: Quais são os deteriorantes da cerveja mais preocupantes? | bioMérieux industrial microbiology**. Disponível em: <<https://www.biomerieux-industry.com/pt/food-safety-quality/resources/scientific-library/2020-11-03-part-1-beer-spoilers-what-are-major>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157–172, jun. 2013.

- BORTOLI, F. DOS SANTOS. et al. **Leveduras e produção de cervejas -**. Disponível em: <<http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/77>>. Acesso em: 21 jun. 2023.
- BOULTON, CHRIS.; QUAIN, DAVID. **Brewing Yeast and Fermentation**. [s.l.] Blackwell Science, 2006.
- BRASIL. **Decreto nº 6871**. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- BRASIL - MAPA. ANUÁRIO DA CERVEJA 2021. **Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa)**, 2022.
- BRIGGS, D. E. et al. *Brewing Science and Practice*. eBook-EEEn. 2004.
- BRUNO, L. M. Manual de curadores de germoplasma - micro-organismos: bactérias ácido-láticas. 2017.
- COELHO, P. **Saccharomyces cerevisiae: Usos, e Variantes dessa Levedura**. Disponível em: <<https://www.engquimicasantosp.com.br/2013/09/saccharomyces-cerevisiae.html>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- COSTA, P. S. P. DA. Estudo da fermentação de cervejas Ale e Lager. 5 dez. 2019.
- DA COSTA, A. P. C. DA. Análises físico-químicas de cervejas produzidas a partir de cereal maltado e não maltado em uma unidade industrial de São Luís – MA. 27 jul. 2022.
- DALLACORT, G. **Curso de formação operador cervejeiro – Brassagem**. 1ª ed. [s.l: s.n.].
- DÖHLER. **NBB®-B-Am - Detecção de germes indicadores de biofilme**. Disponível em: <<https://www.doehler.com/pt/nosso-portfolio/solucoes-integradas/solucoes-de-servico/meios-de-cultura-microbiologicos/portfolio-de-produtos-dmdr/nbbr-b-am.html>>. Acesso em: 24 jun. 2023.
- DRAGONE, G. et al. **Produção de cerveja: microrganismos deteriorantes e métodos de detecção**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/261709666_Producao_de_cerveja_microrganismos_deteriorantes_e_metodos_de_deteccao>. Acesso em: 24 jun. 2023a.
- DRAGONE, G. et al. Revisão : produção de cerveja : microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Braz. J. Food Technol**, p. 240–251, 2007b.
- FERNANDES, F. A. P. Melhoria dos indicadores microbiológicos em linhas de enchimento de cerveja em barril. 2012.
- HAMPSON, T. **O Grande Livro da Cerveja**. 1ª ed. [s.l: s.n.].

JOHANNPETER, J. G.; BIER, EDUARDO. **Processo de fabricação da cerveja**<https://br.pinterest.com/pin/542543086358895317/>. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.dadobier.com.br/>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

JUNIOR, A. A. D.; VIEIRA, A. G.; FERREIRA, T. P. Processo de Produção de Cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61–71, 1 jul. 2009.

KARABÍN, M. et al. Enhancing the performance of brewing yeasts. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 3, p. 691–706, 1 maio 2018.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. [s.l: s.n.].

LIMA, U. DE A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. DE. Produção de etanol. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v. 7, n. 1, p. 343–354, 2001.

LUARASI, LINDA.; TROJA, R.; PINGULI, L. **Segurança microbiológica e avaliação da qualidade das matérias-primas utilizadas na produção de cerveja**. Disponível em: <<https://keypublishing.org/jhed/jhed-volumes/jhed-volume-16-fqs-3-linda-luarasi-rozana-troja-luljeta-pinguli-2016-microbiological-safety-and-quality-evaluation-of-the-raw-materials-used-in-beer-production/>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

MACIEJ SERDA et al. Mapeamento das tendências na produção de cerveja artesanal brasileira. <http://hdl.handle.net/11422/12878>, v. 7, n. 1, p. 343–354, 20 jul. 2020.

MARINS, B. R. Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas. p. 288, 2014.

MENEZES, M. C. R. C. DE. Controle de qualidade em uma cervejaria artesanal : análise de contaminantes do processo de fabricação e eficácia do sistema. 28 jan. 2019.

MIZRAHI, M. M.; RIBEIRO, B. D. **MAPEAMENTO DAS TENDÊNCIAS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL BRASILEIRA**. [s.l.] Monografia em Engenharia Química Orientadores, 2020.

MORADO, R. **Larousse da cerveja: A história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. 1ª ed. [s.l: s.n.].

OLIVEIRA, N. A. M. DE. ., Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. 2011.

PAHL, R.; MEYER, B.; BIURRUN, R. Wort and Wort Quality Parameters. **Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence**, p. 113–121, 1 jan. 2016.

PATTINSON, R. **The Reinheitsgebot - what a load of old b*lllocks**. Disponível em: <<https://www.europeanbeerguide.net/reinheit.htm>>. Acesso em: 19 jun. 2023.

PEREIRA, L. F. M. **REINHEITSGEBOT: UMA ANÁLISE HISTÓRICA SOBRE A LEI DE PUREZA DA CERVEJA (1516) E SUA INFLUÊNCIA POLÍTICA E**

LEGISLATIVA NA ALEMANHA E NO ORDENAMENTO JURÍDICO BRASILEIRO.
[s.l: s.n.].

PRIEST, F. G. Gram-positive brewery bacteria. **Brewing Microbiology**, p. 127–161, 1996.

RIBEIRO, B. et al. **E-book - Microbiologia Industrial - Alimentos - Vol. 2 | Grupo GEN.** Disponível em: <<https://www.grupogen.com.br/e-book-microbiologia-industrial-vol-2>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

RODRÍGUEZ SAAVEDRA, M.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; MORENO ARRIBAS, M. V. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. **Food Research International**, v. 138, p. 109762, 1 dez. 2020.

RODRÍGUEZ SAAVEDRA, MAGALY. et al. Pectinatus spp. – Unpleasant and recurrent brewing spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 336, p. 108900, 2 jan. 2021.

SABINO, C. V. DE M. Caracterização físico-química e estudo da atividade antioxidante de cervejas adicionadas de matérias-primas da Amazônia. p. 81 f, 22 jul. 2020.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 105–124, 31 dez. 2003a.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 105–124, 31 dez. 2003b.

SILVA, H. A. et al. Cerveja e sociedade. **Cultura e Sociedade**, v. 4, 2016.

SOMOS TODOS CERVEJEIROS. **G1 - Como nasce o malte que vai para sua cerveja - notícias em Somos todos cervejeiros.** Disponível em: <<https://g1.globo.com/especial-publicitario/somos-todos-cervejeiros/noticia/2016/07/como-nasce-o-malte-que-vai-para-sua-cerveja.html>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

STEWART, G. G. ; RUSSELL, INGE. ; ANSTRUTHER, ANNE. Making spirits in a brewery. **Handbook of Brewing, Third Edition**, p. 755–765, 1 jan. 2017.

STRONG, G. et al. DIRETRIZES DE ESTILO BJCP 2008. **Diretrizes de Estilo para Cerveja do Beer Judge Certification Program (BJCP) Revisão de 2008 das Diretrizes de 2004 Tradução para o Português de 2012.** , 2012.

TÓFOLI, R. J. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS COMERCIAIS E ARTESANAIS. 2014.

TOSTES, L. R. M. INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UMA MICROCERVEJARIA. 2015.

TOZETTO, L. M. et al. Production and physicochemical characterization of craft beer with ginger *Zingiber officinale*. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 962–970, 11 abr. 2019.

TROMMER, M. W. **AVALIAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DA CERVEJA COM ABORDAGEM DE CICLO DE VIDA**. Disponível em: <https://iepapp.unimep.br/biblioteca_digital/visualiza.php?cod=MTE1Nw==>. Acesso em: 21 jun. 2023.

VENTURINI FILHO, W. G.; EDGARD BLUCHER. **Tecnologia De Bebidas - Materia-prima, Processamento, Bfp/appc, Legislação, Mercado**. Disponível em: <<https://www.disal.com.br/produto/1348620-Tecnologia-De-Bebidas-MateriaPrima>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

9. APÊNDICES

PROTOCOLO DE CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

1. TÍTULO

Protocolo de controle de qualidade microbiológico para análise em peças de conexão hidráulica em microcervejaria.

2. PROPÓSITO

Identificação da presença de microrganismos formadores de biofilme em peças de conexão hidráulica em microcervejaria.

3. PRECAUÇÕES

Equipamento de Proteção Individual (EPI) deve ser utilizado durante todo o processo; e, observe as instruções de uso e precauções no rótulo e manuais dos reagentes e equipamentos empregados.

4. CONDIÇÕES DO AMBIENTE / EXIGÊNCIAS

O preparo das soluções e os procedimentos devem ser realizados em Laboratório a temperatura ambiente. Toda vidraria deve estar devidamente limpa.

5. MATERIAIS

Item	Marca	Referência
Meio de cultura SCL-A		
Meio de Cultura SCL-B		
Soro controle positivo		
Soro controle negativo		
Equipamento		
Tubo de ensaio		
Swab descartável		
Estufa		
Pipeta graduada 2 mL		

6. PROCEDIMENTO

Registre todo o procedimento em caderno de laboratório.

- a) Escolher as peças de conexão hidráulica onde serão feitas as análises. Optar por pontos com contato com ar, ou borrachas de difícil acesso para limpeza.
- b) Pipetar 2 mL de meio de cultura SCL-A ou SCL-B em tubos com capacidade de 10mL;
- c) Coletar as amostras nas peças de conexão hidráulica com swab descartável, o movimento de coleta deve ser o mesmo para todas as amostras;
- d) Inserir o swab com a amostra no tubo contendo o meio de cultura e deixar em contato com o meio. Pode ser preciso quebrar a haste do swab para fechar o tubo de ensaio;
- e) Vedar bem a tampa do frasco;
- f) Identificar os frascos com nome da peça de conexão hidráulica e meio utilizado;
- g) Incubar amostra em estufa com temperatura estabelecida em 27° C por 3 dias.
- h) Fazer a análise e registro dos resultados após o período de incubação, observando as instruções para interpretação dos resultados.

Observações:

- Importante realizar a avaliação de controle negativo e positivo em paralelo a todo processo.
- O controle negativo pode ser feito pela incubação de salina estéril
- O controle positivo pode ser feito pelo cultivo de cepas viáveis de *E. coli* ou *C. albicans*.

7. INTERPRETAÇÃO

Amostras de esfregaços das linhas de produção cervejeira que apresentarem mudança de cor do indicador de pH do vermelho para o amarelo após o período de incubação deverão ser identificadas como amostras com presença de possíveis microrganismos produtores de ácido acético ou formadores de biofilme. Os resultados podem ser expressos em % de amostras positivas dentre as testadas.

PROTOCOLO DE CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

1. TÍTULO

Protocolo de controle de qualidade microbiológico para análise de produto.

2. PROPÓSITO

Identificação da presença de microrganismos deteriorantes em cervejas artesanais.

3. PRECAUÇÕES

Equipamento de Proteção Individual (EPI) deve ser utilizado durante todo o processo; e, observe as instruções de uso e precauções no rótulo e manuais dos reagentes e equipamentos empregados.

4. CONDIÇÕES DO AMBIENTE / EXIGÊNCIAS

O preparo das soluções e os procedimentos devem ser realizados em Laboratório a temperatura ambiente. Toda vidraria deve estar devidamente limpa.

5. MATERIAIS

Item	Marca	Referência
Meio de cultura SCL-A		
Meio de Cultura SCL-B		
Soro controle positivo		
Soro controle negativo		
Equipamento		
Frasco para laboratório 250 mL		
Estufa		
Proveta 500 mL		
Pipeta graduada 25 mL		

6. PROCEDIMENTO

Registre todo o procedimento em caderno de laboratório.

- a) Pipetar 15 mL de meio de cultura SCL-A ou SCL-B para frasco de laboratório com capacidade de 250 mL que possua tampa de rosca ou do tipo rolha;
- b) Realizar a autoclavagem do meio de cultura em frasco de coleta;
- c) Adicionar aproximadamente 235 mL de amostra de amostra do produto a ser testado no frasco contido o meio de cultura.
- d) Em caso de amostras de cerveja com turvação própria, realizar a diluição da amostra na proporção de 1:4 antes da testagem com água estéril.
- e) Vedar bem a tampa do frasco;
- f) Identificar os frascos com nome e meio utilizado;
- g) Incubar amostra em estufa com temperatura estabelecida em 27° C por 12 dias.
- h) Fazer a análise e registro dos resultados diariamente a partir do 7º dia de incubação conforme as instruções de interpretação dos resultados;

Observações:

- Importante realizar a avaliação de controle negativo e positivo em paralelo a todo processo.
- O controle negativo pode ser feito pela incubação de salina estéril
- O controle positivo pode ser feito pelo cultivo de cepas viáveis de *E. coli* ou *C. albicans*.

7. INTERPRETAÇÃO

Amostras de cervejas que apresentarem coloração turva após o período de incubação, deverão ser identificadas com amostras com presença de possíveis microrganismos deteriorantes de cervejas.

PROTOCOLO DE CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

1. TÍTULO

Produção do meio SCL-A.

2. PROPÓSITO

Produção do meio de cultura SCL-A usado para pesquisa de agentes deteriorantes de cervejas artesanais

3. PRECAUÇÕES

Equipamento de Proteção Individual (EPI) deve ser utilizado durante todo o processo; e, observe as instruções de uso e precauções no rótulo e manuais dos reagentes e equipamentos empregados.

4. CONDIÇÕES DO AMBIENTE / EXIGÊNCIAS

O preparo das soluções e os procedimentos devem ser realizados em Laboratório a temperatura ambiente. Toda vidraria deve estar devidamente limpa. Deve-se utilizar balança de precisão para pesagem de todo material.

5. MATERIAIS

INGREDIENTES	QUANTIDADE
<i>Cloreto de Cálcio</i>	0,125 g
<i>Dextrose</i>	50 g
<i>Cloreto Férrico</i>	0,0025 g
<i>Sulfato de Magnésio</i>	0,125 g
<i>Sulfato de Manganês</i>	0,0025 g
<i>Fosfato Monopotássico</i>	0,55 g
<i>Cloreto de Potássio</i>	0,425 g
<i>Caseína Digerida</i>	5 g
<i>Extrato de Soja</i>	0,8 g
<i>Cloreto de Sódio</i>	0,52 g
<i>Fosfato Dissódico</i>	0,3 g
<i>Glicose</i>	0,3 g
<i>Vermelho de Metila</i>	0,022 g
<i>Água destilada qsp</i>	1000 mL

6. PROCEDIMENTO

Registre todo o procedimento em caderno de laboratório.

- a) Pesar cuidadosamente todos os materiais sólidos e reservar em frasco dedicado;
- b) Juntar todos os materiais sólidos em frasco âmbar com auxílio de funil e espátula;
- c) Acrescentar os materiais líquidos já separados em suas quantidades corretas;
 - a. Alternativamente, o material pode ser armazenado apenas com as preparações sólidas, desde que identificado adequadamente, inclusive com as instruções adequadas para ressuspensão.
- d) Identificar o frasco com nome do meio de cultura, data de preparo e responsável.
- e) Armazenar a 8° C (geladeira) por no máximo 30 dias.

Observações:

- Não se aplica.

PROTOCOLO DE CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO

1. TÍTULO

Produção do meio SCL-B.

2. PROPÓSITO

Produção do meio de cultura SCL-B usado para pesquisa de agentes deteriorantes de cervejas artesanais

3. PRECAUÇÕES

Equipamento de Proteção Individual (EPI) deve ser utilizado durante todo o processo; e, observe as instruções de uso e precauções no rótulo e manuais dos reagentes e equipamentos empregados.

4. CONDIÇÕES DO AMBIENTE / EXIGÊNCIAS

O preparo das soluções e os procedimentos devem ser realizados em Laboratório a temperatura ambiente. Toda vidraria deve estar devidamente limpa. Deve-se utilizar balança de precisão para pesagem de todo material.

5. MATERIAIS

INGREDIENTES	QUANTIDADE
<i>L Cisteína</i>	0,2 g
<i>Dextrose</i>	15 g
<i>Fosfato Dissódico</i>	2,3 g
<i>Ácido Málico</i>	0,5 g
<i>Maltose</i>	15 g
<i>Caseína Digerida</i>	5 g
<i>Polisorbato 80</i>	0,5 mL
<i>Acetato de Potássio</i>	6 g
<i>Extrato de Levedura</i>	7 g
<i>Extrato de Soja</i>	0,8 g
<i>Cloreto de Sódio</i>	0,52 g
<i>Glicose</i>	0,3 g
<i>Vermelho de Metila</i>	0,07 g
<i>Água destilada qsp</i>	1000 mL

6. PROCEDIMENTO

Registre todo o procedimento em caderno de laboratório.

- a) Pesar cuidadosamente todos os materiais sólidos e reservar em frasco dedicado;
- b) Juntar todos os materiais sólidos em frasco âmbar com auxílio de funil e espátula;
- c) Acrescentar os materiais líquidos já separados em suas quantidades corretas;
 - a. Alternativamente, o material pode ser armazenado apenas com as preparações sólidas, desde que identificado adequadamente, inclusive com as instruções adequadas para ressuspensão.
- d) Identificar o frasco com nome do meio de cultura, data de preparo e responsável.
- e) Armazenar a 8° C (geladeira) por no máximo 30 dias.

Observações:

- Não se aplica.