



FACULDADE DE VETERINÁRIA

DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Secção de Tecnologia de Alimentos

Curso de Licenciatura em Ciência e Tecnologia de Alimentos

TRABALHO DE CULMINAÇÃO DO CURSO

Relatório de estágio na empresa Cervejas de Moçambique

Estudo de caso: Ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção da cerveja

Estudante:

Palma Francisco Gemicene

Supervisor: Prof.Doutor Borges Chambal

Co-supervisores: Lic. Agnaldo Manhiça

Lic. António Manuel (CDM)

Maputo, Maio de 2024

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Palma Francisco Gemicene, declaro por minha honra, que o presente trabalho foi elaborado por mim resultante de um estágio pré-profissional realizado na empresa Cervejas de Moçambique, complementado com os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, nas consultas bibliográficas e experiências laboratoriais.

(Palma Francisco Gemicene)

AGRADECIMENTOS

Uma nova etapa se aproxima e sinto-me na obrigação de reconhecer o apoio que me foi concedido e que contribuiu para a minha formação. Por isso expresso os meus agradecimentos:

- ❖ À Deus, Pai Todo-Poderoso pelo dom da vida, pela sua protecção e pelo seu infinito amor;
- ❖ Aos meus Pais, Francisco Gemicene e Fátima Jalal, pelo apoio, por sempre acreditarem em mim e darem tudo deles para a realização dos meus sonhos;
- ❖ Ao meu irmão, Schoeman Gemicene, pela compreensão e força que me foi transmitida durante este trajecto;
- ❖ À CDM, por ter aceite a realização do estágio;
- ❖ Aos meus supervisores, Prof. Doutor Borges Chambal e Lic. Agnaldo Manhiça, por me terem recebido, pela constante ajuda e orientação durante o período de desenvolvimento deste trabalho;
- ❖ Ao supervisor da fábrica Lic. António Manuel, à equipe do Laboratório de Microbiologia e aos colaboradores do *Brewing*, pelo acompanhamento, força e companheirismo dado durante o período de estágio, que foi fundamental para a realização deste trabalho;
- ❖ Às minhas amigas e colegas de turma “ELITE” (Benvinda Manjate, Fauzia Macandza, Evlizy Namburete, Inocência Mucavele e Menalda Inguane), que ao longo desse percurso estiveram sempre dispostas a apoiar umas às outras, por forma a enfrentarmos juntas todos os obstáculos dessa longa jornada;
- ❖ À minha amiga Aissa Baraza, pelo seu incansável apoio e pelos conselhos dados neste percurso;
- ❖ À todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigado.

Palma Gemicene.

LISTA DE ABREVIATURAS

CDM	Cervejas de Moçambique
WLN	<i>Wallerstein Laboratory Nutrient</i>
YM + CuSO₄	<i>Yeast and Mould com adição de Sulfato de cobre</i>
LNHAA	Laboratório Nacional de Água e Alimentos
FIFO	<i>First In First Out</i>
FEFO	<i>First Expired First Out</i>
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
EBC	<i>European Brewery convention</i>
BBT	<i>Bright Beer Tank</i>
EPI	Equipamento de Protecção Individual
OE	<i>Original Extract</i>
AE	<i>Apparent Extract</i>
DO	<i>Dissolved Oxygen</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura I : Matéria-prima básica para fabricação da cerveja	11
Figura II : Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de produção de cerveja.....	13
Figura III : Esquema ilustrativo da fermentação alcoólica.....	15
Figura IV : Análise da levedura de cultura.....	24
Figura V : Elevado desenvolvimento da levedura no mosto em fermentação.....	25
Figura VI : Resultados após as diluições seriadas do mosto em fermentação	26
Figura VII : Ocorrência de leveduras selvagens no meio YM+CuSO ₄	31
Figura VIII : Características microscópicas das colónias.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela I : Tipo de cerveja quanto ao extracto primitivo.....	10
Tabela II : Intervalos de temperatura e pH ideais para a actuação das enzimas	14
Tabela III : Demonstração do plano de amostragem	21
Tabela IV : Ilustração dos aspectos macroscópicos	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico I : Representação da contagem de levedura selvagem na cerveja filtrada	27
Gráfico II : Representação da contagem de levedura selvagem na cerveja antes da pasteurização	28

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJECTIVOS	4
Parte I – RELATÓRIO DO ESTÁGIO NA EMPRESA CERVEJAS DE MOÇAMBIQUE.....	5
3. Descrição e avaliação das actividades desenvolvidas.....	5
PARTE II – ESTUDO DE CASO: “Ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção da cerveja”	9
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4.1. Efeitos da cerveja no organismo humano	9
4.2. Classificação das cervejas	9
4.3. Matérias-primas para a produção da cerveja	10
4.4. Processo de produção de cerveja	13
4.5. Contaminantes microbiológicos da cerveja	17
4.6. Impacto da levedura selvagem na estabilidade da cerveja.....	19
4.7. Controlo microbiológico das leveduras selvagens	20
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.1. Local de estudo	21
5.2. Técnica de amostragem	21
5.3. Análises microbiológicas: procedimentos laboratoriais	21
5.4. Análise e apresentação dos dados.....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÕES	36
8. RECOMENDAÇÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO

O presente relatório descreve as actividades do estágio formativo e pré-profissional, realizado na empresa Cervejas de Moçambique no período de 01 de Novembro de 2022 à 26 de Julho de 2023. Durante o período de estágio foi possível participar e acompanhar as actividades rotineiras nos departamentos de *Brewing* (fabricação da cerveja), nomeadamente, brassagem, fermentação e filtração e no departamento de Qualidade, para a colheita de amostras e realização de análises microbiológicas. O estágio culminou com o desenvolvimento de um estudo de caso relacionado à ocorrência de leveduras selvagens durante o processo produtivo da cerveja. Foram realizadas análises microbiológicas em 16 amostras: 4 da levedura de cultivo, 4 do mosto em fermentação, 4 de cerveja filtrada e 4 da cerveja antes da pasteurização. As análises foram baseadas no método interno da empresa para o isolamento e identificação de leveduras selvagens, através de meios selectivos e diferenciais. Foram observadas as características macro e microscópicas, das colónias suspeitas de leveduras selvagens. Como resultado, detectou-se presença de leveduras selvagens em 26,9% das amostras, sendo a cerveja filtrada e cerveja enchida antes da pasteurização as etapas críticas. Nas restantes etapas não foi detectada a ocorrência de leveduras selvagens, tendo sido obtidos resultados satisfatórios. Macroscopicamente, notou-se características sugestivas à presença de colónias rugosas estando as mesmas associadas com problemas de higienização na indústria, ocasionando queda no rendimento fermentativo. Microscopicamente detectou-se a semelhança das características observadas com a presença da *Brettanomyces spp* que possui a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo e crescer em produtos em armazenamento. O trabalho permitiu concluir que há contaminação do processo de produção por leveduras selvagens. Esta situação demonstra que os procedimentos usados não são suficientes para garantir o padrão de qualidade. Constatou-se também que a presença de levedura selvagem do género *Saccharomyces*, que apresenta semelhanças a levedura de cultivo e do género não-*Saccharomyces*.

Palavras-chave: Leveduras selvagens, cerveja, análises microbiológicas.

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida globalmente, representando 78,2% do consumo mundial das bebidas alcoólicas e é também uma das mais antigas da humanidade. A sua produção tem acompanhado a evolução humana desde a sua origem até aos dias de hoje, tendo uma grande importância económica, cultural e histórica (Garofalo *et al.*, 2015).

De acordo com Tschope (2001), mundialmente a primeira cerveja foi produzida pelos sumérios, que era um povo que vivia na Mesopotâmia (Médio Oriente), há 5500 anos a.C. Recentemente, arqueólogos britânicos descobriram uma fábrica de 3500 anos a.C., localizada em Amarna nas margens do rio Nilo. Nessa fábrica, produzia-se a bebida misturando água, pão semi-cozido, malte de cevada e suco de tâmaras, sendo fermentada em fogo de madeira de acácia.

À nível nacional, a produção da cerveja iniciou em 1932, com a produção da Laurentina Clara, por um imigrante grego chamado Cretikos. Anos depois, em 1995, nasce a empresa Cervejas de Moçambique (CDM), resultante da privatização de Cerveja MacMahon e Manica. Actualmente, a CDM é subsidiária da Ab-Inbev (líder mundial no negócio de cervejas e refrigerantes), possuindo ao longo do território nacional, quatro (4) fábricas localizadas, nomeadamente, na Cidade de Maputo, Marracuene, Beira e Nampula empregando mais de 1000 colaboradores (CDM, 2023).

As principais actividades desenvolvidas pela CDM, consistem na produção de marcas renomadas como a 2M, Laurentina, Manica e também a importação e comercialização de marcas globais como a Corona, Stella Artois e Budweiser. As marcas da CDM são apreciadas por consumidores além-fronteiras, como é o caso da África do Sul, Portugal e no Reino Unido, que são países para onde se exportam a 2M e a Laurentina (CDM, 2023).

A CDM impacta em diversos sectores como o económico, ambiental e também o social. Ela tem desempenhado um papel importante na evolução económica nacional, tendo sido galardoada em Março de 2022, na província de Inhambane, como a melhor contribuinte fiscal do ano 2022 na categoria de imposto sobre valor acrescentado (IVA), sendo que este contributo foi indispensável para a redução do défice orçamental (A Nossa Voz, 2023).

Para além da contribuição para a evolução económica, a CDM apoia diversas iniciativas de responsabilidade social, estando empenhada em construir um futuro onde todos possam ter acesso à água potável. Nesse âmbito, a empresa firmou uma parceria com o *World Wildlife Fund* (WWF) para a realização de actividades de limpeza e conservação da biodiversidade no rio Umbeluzi, tendo já sido removidos mais de 1.428m³ de resíduos, numa extensão de mais de 10km do rio Umbeluzi (A nossa voz, 2023).

Durante a produção cervejeira, existem várias etapas cujo objectivo é garantir a qualidade da cerveja acabada. O processo da fermentação constitui a principal etapa do processo de produção de cerveja e sua eficiência depende das operações que ocorrem na brassagem, como por exemplo, a moagem, a empastagem e a ebulição. O processo fermentativo é o ponto central da produção de qualquer bebida alcoólica, incluindo as cervejas e possui o objectivo principal de converter os açúcares em etanol e dióxido de carbono, por acção das leveduras em condições anaeróbicas (Naves *et al.*, 2010).

As leveduras utilizadas actualmente, nos processos fermentativos, foram seleccionadas pelo homem, por centenas de anos. Por longos períodos de tempo, a selecção foi sem o conhecimento da sua existência, originando as linhagens conhecidas actualmente, como é o caso das duas espécies mais utilizadas nos processos de produção da cerveja que são do género *Saccharomyces*: a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces uvarum*. Elas constituem o grupo mais importante de microorganismos explorados comercialmente, pelo facto de possuírem alta capacidade fermentativa. A bioquímica da fermentação alcoólica, é largamente conhecida, mas os mecanismos de controle do processo para que se obtenha a eficiência máxima carecem ainda de estudos, pois na indústria a levedura convive com populações de microorganismos contaminantes, como é o caso de bactérias e leveduras selvagens (Hornsey, 2003).

No processo fermentativo, a presença de leveduras é importante, exceptuando-se as que são consideradas contaminantes, que têm trazido problemas ao processo fermentativo tanto na produção de vinhos como na fabricação de cervejas, sendo consideradas como leveduras selvagens. A levedura selvagem é qualquer levedura que difere da levedura de cultivo e é considerada um grande problema para a indústria de fermentação alcoólica. Estas podem ser introduzidas ao processo de fermentação, através do substrato, água utilizada no processo, ar e pelos problemas que podem surgir durante a higienização (Ceccato-antonini, 2010).

Segundo Carvalho (2007), as leveduras que não foram seleccionadas pelo cervejeiro são consideradas como leveduras contaminantes no processo produtivo. A sua presença acarreta sérios problemas para o processo, levando à deterioração do produto final e provocando o aparecimento de sabores e aromas que descaracterizam totalmente a cerveja produzida. E para que haja a formação de aromas na cerveja e também haja a garantia da sua estabilidade é necessário que a levedura de cultivo seja pura, ou seja, que a mesma esteja livre de microorganismos contaminantes como é o caso de leveduras selvagens e também de bactérias.

O presente relatório resulta do estágio pré-profissional do curso de licenciatura em Ciência e Tecnologia de Alimentos, leccionado na Faculdade de veterinária da Universidade Eduardo Mondlane. Reconhecendo o contributo da CDM no desenvolvimento da indústria cervejeira nacional, realizou-se um estágio pré-profissional na unidade fabril da cidade de Maputo, com o

objectivo de consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos durante a formação, desenvolver competências e habilidades práticas e familiarizar a autora com o processo de produção de cerveja.

A cerveja é mundialmente consumida por milhares de pessoas e o seu consumo moderado possui benefícios à saúde, porém apesar da cerveja ser considerada uma bebida microbiologicamente estável, devido ao processo de pasteurização, ela não está isenta de riscos de contaminação associados às etapas de produção. Por forma, a contribuir para a resolução de um problema em concreto e que poderá ser útil para a melhoria da qualidade da cerveja, surgiu a necessidade de estudar profundamente a ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção da cerveja.

2. OBJECTIVOS

2.1. Geral:

- Desenvolver um estudo de caso relacionado com a ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção da cerveja.

2.2. Específicos:

- Participar nas diferentes etapas do processo cervejeiro;
- Identificar as etapas críticas de ocorrência de leveduras selvagens;
- Isolar e identificar macro e microscopicamente potenciais colónias suspeitas de leveduras selvagens.

3. Descrição e avaliação das actividades desenvolvidas

O estágio pré-profissional foi realizado por um período de 9 meses (de Novembro de 2022 à Julho de 2023) na CDM, concretamente na unidade fabril sita na Cidade de Maputo, Rua do Jardim - 1329.

A unidade fabril compreende os departamentos de *Brewing* (fabricação), *Packaging* (enchimento), Qualidade, Serviços técnicos e Logística.

O estágio formativo e pré-profissional, decorreu especificamente no departamento de *Brewing* (fabricação), tendo recebido induções para a familiarização com o processo produtivo e integrada à equipa de produção cervejeira. Foi desenhado um plano de estágio, contendo a descrição das actividades que deveriam ser desenvolvidas ao longo do estágio e os respectivos prazos para o início e o término.

As áreas de trabalho e as respectivas actividades acompanhadas, encontram-se detalhadamente descritas nos subcapítulos a seguir apresentados:

3.1. Recepção e limpeza do malte

Durante o acompanhamento do processo de recepção e limpeza das matérias-primas, notou-se que os procedimentos utilizados para esta actividade, garantem que a mesma seja desempenhada com segurança e que haja desde o início o controle das matérias-primas. Os procedimentos que são desempenhados por parte do operador permitem que o mesmo identifique anomalias e comunique aos superiores sobre a existência de não conformidades com a matéria-prima, fazendo uma inspecção por forma a avaliar e comparar os dados do certificado com os descritos nas embalagens, como por exemplo, o prazo de validade.

No processo de armazenamento da matéria-prima, deve-se seguir as estratégias FEFO (*First Expired First Out*) e FIFO (*First In First Out*) e de acordo com Gameiro (2021), devem existir registos de todas as entradas e saídas do armazém, a verificação da data de validade e a higienização do armazém, com frequência necessária. Estes princípios são importantes para a gestão da segurança alimentar e permitem a rotação dos stocks. Entretanto, em algum momento houve falha no seguimento de FEFO, pois constatou-se a existência da enzima *Bettaferm* cujo prazo de validade estava expirado há mais de um ano. Notificou-se ao líder de turno, tendo sido levantada uma acção para a verificar-se no armazém a conformidade das matérias-primas, não tendo sido encontrada outra enzima inconforme e a mesma foi descartada.

Quanto à recepção e armazenamento do malte, notou-se que a empresa faz o uso de silos herméticos, sendo estes, de acordo com Aguirre *et al.* (2000) baseados na redução do oxigénio disponível no armazenamento à níveis limitantes para os organismos vivos associados, facilitando o controlo das condições de humidade e temperatura no interior e havendo o controlo de pragas de grãos armazenados. A existência de pontos com elevada humidade durante o armazenamento, pode ter consequências como a ocorrência de alterações bioquímicas nos grãos, o aumento da actividade metabólica, maior desenvolvimento de fungos e também a ocorrência de perdas de malte e da qualidade do mesmo.

3.2. Processos de tratamento de água

As actividades na planta de tratamento de água, consistiram no acompanhamento do processo de tratamento da água utilizada pela empresa como a água de processo, que é a água utilizada para a produção da cerveja e a água de serviço, que é utilizada para as outras actividades, não entrando em contacto com o produto. Fez-se também a determinação dos parâmetros para a caracterização da água, representando as características físicas, químicas e biológicas da água e são indicadores de qualidade.

Fez-se a colheita de amostras e posterior análise dos seus parâmetros onde realizou-se a análise de pH, condutividade e turbidez. Para além dos parâmetros determinados, existem outros que a unidade é responsável por determiná-los durante as diferentes etapas do processo de tratamento, por forma a garantir que as áreas possuam água para a realização das suas actividades. Os outros parâmetros controlados pela unidade são alcalinidade, cloretos, sólidos dissolvidos totais, dureza, teor de sílica, dióxido de cloro, fosfatos, sulfitos e ferro.

Avaliou-se positivamente a execução das actividades acima referidas, pois os desvios dos parâmetros considerados podem causar consequências como formação de incrustações nas tubulações, turbidez no produto final e conferir sabores e odores desagradáveis. Sendo assim, o controlo e o tratamento da água é necessário para que se obtenha um mosto e, por conseguinte, uma cerveja de elevada qualidade (Bamforth, 2001).

3.3. Brassagem

Na brassagem, ocorrem as operações de moagem, empastagem, filtração, ebulição e arrefecimento do mosto. Além destas operações são realizados os controlos de qualidade de modo a garantir que o mosto que está a ser produzido esteja dentro dos parâmetros de qualidade. Antes de efectuar as actividades, era feito por cada turno por meio de uma planilha, o controlo do uso do EPI completo por parte dos operadores.

Após a verificação, acedeu-se a área, fez-se o acompanhamento da produção do mosto e realizou-se as análises de controlo dos parâmetros de qualidade, incluindo o pH da pasta (mistura de malte e água), realização do teste de sacarificação e leitura de extracto.

As actividades realizadas foram avaliadas positivamente, entretanto existem alguns pontos que podem ser melhorados. Na CDM Maputo, faz-se a moagem húmida, com o uso de moinho de rolos. Na pesquisa realizada por Dennis *et al.* (2004), evidenciam as vantagens do uso da moagem húmida, como a eliminação do risco de incêndio e conservação da palha intacta, para auxiliar o processo de filtração. A palha seca é friável, ou seja, se desintegra com muita facilidade e provoca elevada resistência à filtração.

O sucesso das operações subsequentes é garantido através etapa de moagem do malte que possui o objectivo de expor o endosperma amiláceo e permitir que haja a desintegração completa do endosperma, porém conservando a palha, como referido anteriormente, de forma a que todos os seus constituintes estejam acessíveis à actuação enzimática, formando o mosto fermentescível (Dragone, 2010).

Durante as actividades desenvolvidas, constatou-se a presença de pombos deixando o local dos silos e sala dos maltes com um péssimo aspecto visual e de higiene, devido aos dejetos que ficam espalhados no chão. A limpeza desta área é intensificada, de modo a fazer face ao problema enfrentado, porém de acordo com Lima *et al.* (2015) citado por Silva *et al.* (2019, p.80), a existência de pombos nas unidades fabris faz com que haja o acúmulo de fezes e penas, o que pode comprometer o funcionamento de diversos equipamentos e favorece riscos de ocorrência de contaminações de fontes de água e alimentos. Posto isto, foi realizado o levantamento dos locais que possuíam entradas para pombos para proceder-se o fechamento.

3.4. Fermentação e filtração

Nestas áreas, fez-se o acompanhamento das actividades gerais de controlo de processo e a determinação dos parâmetros de qualidade. Para a fermentação, por forma a obter-se uma cerveja de qualidade desejada, realizou-se o controle da cuba de fermentação. E este processo consistia no controlo da temperatura de fermentação e a determinação dos parâmetros de qualidade do extracto (OE e AE), pH, álcool, cor, viabilidade da levedura (percentagem de leveduras activas e inactivas). E também fez-se a análise dos parâmetros de qualidade da levedura que seria reutilizada no processo como viabilidade e consistência.

Após o processo de fermentação, dá-se o processo de maturação que consiste em deixar a cerveja em descanso nos tanques e a guarda, para promover a separação da levedura da cerveja e também permite a ocorrência de algumas reacções químicas que auxiliam no processo de estabilização do

produto final. De acordo com Matos (2011), este processo ocorre na mesma cuba, devido ao uso de tanques cilindro-cônicos, como constatado na empresa.

Para a filtração, o acompanhamento realizado foi similar ao do processo de fermentação. Iniciou-se com o acompanhamento do processo de filtração da cerveja maturada. À medida que a cerveja foi filtrada e enviada ao BBT (*Bright Beer Tank*), fez-se o controlo dos parâmetros de qualidade desejados no produto final por forma a garantir a qualidade da mesma até a sua entrega ao sector de enchimento. Os parâmetros controlados foram DO (Dissolved Oxygen), coloração, turvação, pH, OE, AE, temperatura, álcool e CO₂.

Durante as actividades desenvolvidas na fermentação e filtração, fez-se uma avaliação positiva das mesmas, pois verificou-se que os procedimentos seguidos pelos colaboradores são os procedimentos descritos pela empresa, que podem ser encontrados nas bases de dados que a empresa dispõe com acesso aos seus colaboradores para actualizações, pois os mesmos possuem o senso de donos e transmitem a informação que detêm do processo de forma sábia, clara e objectiva.

No decurso do estágio, não foi possível participar em acções de formações. A formação dos colaboradores constitui um pilar básico na garantia da segurança, pois através destas formações são partilhadas ferramentas que são úteis para fazer face às diversas situações que podem ocorrer durante o processo de produção, e também na garantia de qualidade dos alimentos.

PARTE II – ESTUDO DE CASO: “Ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção da cerveja”

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Define-se cerveja como sendo uma bebida obtida através da fermentação alcoólica, por acção da levedura, do mosto, produzido a partir de malte de cevada, água de boa qualidade e com adição de lúpulo. Para a sua produção, podem também ser adicionados adjuntos tais como, arroz, milho e trigo (Oliveira, 2009).

De acordo com Monteiro (2001), existem actualmente diversos tipos de cerveja com aromas e sabores diversificados, sendo estas características dadas pela diversidade de grãos, a quantidade de insumos utilizados e as boas práticas de fabricação utilizadas durante o processo. Sendo assim, a escolha inadequada da matéria-prima pode acarretar em complicações, tais como a existência de mosto turvo, dificuldades na clarificação e sacarificação, problemas com gosto e espuma da cerveja, turbidez e queda de rendimento nos ciclos de filtração.

4.1. Efeitos da cerveja no organismo humano

Segundo Siqueira (2007), apesar do consumo de cerveja ser muito associado aos danos à saúde, causados pelo consumo excessivo, ela possui os seguintes benefícios sobre o organismo humano:

- Faz bem para a visão;
- Reduz os níveis de stress (consumo moderado);
- É rica em substâncias vegetais secundárias;
- Protege contra o endurecimento das artérias (consumo moderado);
- Protege o coração (consumo moderado);
- Evita a depleção dos níveis de ácido fólico;
- Reduz os níveis de colesterol.

Por forma a que sua ação benéfica seja manifestada, a cerveja deve ser consumida moderadamente, pois o consumo excessivo da cerveja pode acarretar certos efeitos negativos como a neutralização dos efeitos protectores cardiovasculares, adquiridos através da ingestão moderada, ocasionar doenças hepáticas e também aumentar a pressão arterial (Teixeira, 1993).

4.2. Classificação das cervejas

De acordo com Dennis (2004), as cervejas podem as cervejas são classificadas de acordo com diversos critérios, incluindo os indicados a seguir:

i. Quanto ao tipo de fermentação:

- a) **Alta fermentação (Ale)** – obtida pela acção da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, à temperaturas mais altas (em torno de 17-25° C). A levedura utilizada tende a ficar em suspensão no tanque durante o processo fermentativo.
- b) **Baixa fermentação (Lager)** – obtida pela acção da levedura *Saccharomyces uvarum*, à temperaturas mais baixas (em torno de 9-15° C). A levedura utilizada tende a depositar-se no fundo da cuba durante ou após o processo fermentativo.

ii. Quanto ao extracto primitivo

A presente classificação leva em consideração a proporção do extracto primitivo, que é a quantidade de substâncias dissolvidas no mosto, como pode-se observar na tabela abaixo:

Tabela I : Tipo de cerveja quanto ao extracto primitivo

Cerveja Fraca	≥ 7% e < 11%
Cerveja Normal ou Comum	≥ 11% e < 12,5%
Cerveja Extra	≥ 12,5% e < 14%
Cerveja Forte	≥ 14%

iii. Quanto à cor

A cor da cerveja está essencialmente relacionada com a coloração dos maltes utilizados na sua fabricação, podendo ser:

- a) **Cerveja clara** - cor correspondente a menos de 20 unidades EBC;
- b) **Cerveja escura** - cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC.

iv. Quanto ao teor alcoólico

- a) **Cerveja sem álcool**, quando o teor alcoólico for menor que 0,5% do seu volume, sendo que neste caso não é obrigatório a declaração no rótulo do conteúdo alcoólico;
- b) **Cerveja padrão**, quando o teor alcoólico for maior ou igual à 0,5% em volume e deve obrigatoriamente constar no rótulo a percentagem de álcool por volume.

4.3. Matérias-primas para a produção da cerveja

De acordo com Gonçalves (2017), as matérias-primas essenciais para a produção de cerveja, como pode ser verificado na figura I, são água, malte, lúpulo e levedura. E a manipulação destas matérias-primas é responsável pelo aparecimento dos vários tipos de cerveja existentes.

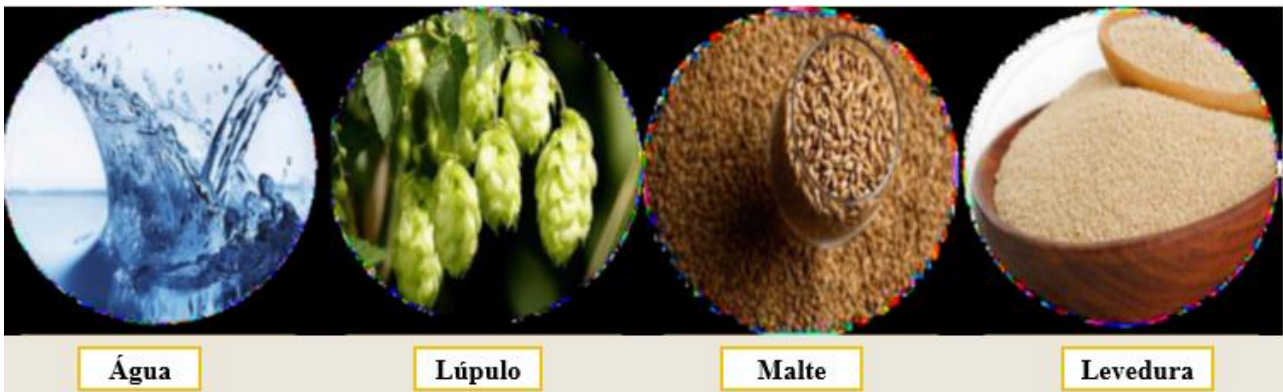


Figura I : Matéria-prima básica para fabricação da cerveja. (Fonte: Viana, 2021)

Água

É a matéria-prima mais importante para a fabricação de cerveja, constituindo cerca de 90-95% da formulação da cerveja, sendo o ingrediente principal. Por isso, a condição da mesma é de suma importância para a indústria cervejeira pelo facto de ser um dos factores decisivos na escolha do local para a instalação de uma cervejeira e também por acarretar consequências na qualidade da cerveja (Oliveira, 2011).

A água para a produção de cerveja deve seguir padrões de potabilidade, ser transparente, inodora e isenta de qualquer sabor estranho ou matéria orgânica (Oliveira, 2011). A presença dos sais dissolvidos pode influenciar no processo fermentativo e, conseqüentemente, na qualidade da cerveja, sendo assim suas quantidades devem estar bem definidas.

Segundo Venturini *et al.*, (2001), o uso de água com elevado teor de cálcio (dureza permanente) está associada a cervejas amargas e para a cerveja *Pilsen* necessita de água mole para a sua produção, ou seja, pobre em cálcio e magnésio. Outro factor importante na análise da água é o controle de seu pH. O pH alcalino favorece a formação de substâncias indesejáveis no processo, como os polifenóis, responsáveis pela adstringência. Geralmente, o valor ideal de pH da água a ser utilizada para produção da cerveja está na faixa entre 6,5-7, ou seja, em pH próximo do neutro, tendo-se assim maior facilidade da atividade enzimática e conseqüentemente um aumento no rendimento da maltose e no teor alcoólico.

Malte

É a designação atribuída ao grão da cevada depois de ter sido submetido a um processo de germinação sob condições controladas (maltagem). Este processo é dividido em limpeza e seleção de grãos, a embebição ou maceração dos grãos, germinação e a secagem do malte com a finalidade de produzir enzimas utilizadas na conversão das matérias-primas em mosto (Carvalho, 2007).

A cevada é utilizada como constituinte principal pela indústria cervejeira, em relação aos outros cereais, segundo Bokulich e Bamforth (2013), pelas seguintes razões:

- Sua contribuição para o sabor da cerveja, pois possui um sabor mais apreciado entre os cereais;
- Facilidade técnica no processo de maltagem;
- Fornece alta percentagem de amido para conversão em açúcares fermentáveis;
- Fornece proteínas e aminoácidos que intervêm no perfil organoléptico e na estabilidade coloidal e da espuma.

E estas características de qualidade só o malte as confere (Bokulich e Bamforth, 2013).

Lúpulo

O lúpulo, de nome científico *Humulus lupulus*, é uma planta trepadeira, sendo que para a fabricação da cerveja são utilizadas suas flores que são prensadas e vendidas sob a forma de pellets. O amargor e o aroma característicos da cerveja são obtidos através das resinas e óleos fornecidos fornecidos pela planta. (Mega *et al.*, 2011).

De acordo com Carvalho (2007), o lúpulo confere o aroma e sabor amargo que são característicos da cerveja, contribui também como um agente anti-espumante e possui efeito bacteriostático sobre as bactérias Gram-positivas, sendo que as propriedades bacteriostáticas do lúpulo são devido aos α – ácidos (humulonas). Este deve ser adicionado durante o processo de fervura do mosto, permitindo assim que os seus componentes se dissolvam e liberem o amargor e o aroma desejados.

Levedura

As leveduras são organismos unicelulares eucarióticos, pertencentes ao Reino Fungi. Reproduzem-se através de brotamento ou assexuadamente por fissão binária e estão presentes em vários processos bioquímicos, sendo utilizadas na fabricação de cervejas e pão há milhares de anos. A formação de aromas na cerveja é fundamental, sendo assim é importante que a cultura de levedura a ser utilizada no processo de fermentação seja a mais pura possível, ou seja, livre de microorganismos contaminantes como é o caso das bactérias e leveduras selvagens (Carvalho, 2007).

No estudo desenvolvido por Carvalho (2007), consta que a utilização das leveduras ocorre devido aos processos metabólicos produzidos pelas mesmas, onde na presença de oxigênio (via aeróbica) há um crescimento elevado e formam dióxido de carbono e na ausência do oxigênio (via anaeróbica) a taxa de crescimento diminui, originando o etanol e dióxido de carbono. O gênero que está directamente relacionado com a fermentação alcoólica é o gênero *Saccharomyces*, porém os

gêneros *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* também são utilizados na produção de bebidas alcoólicas.

As estirpes de leveduras podem ser tradicionalmente divididas em dois grupos, as de fermentação alta, utilizadas para a produção de cervejas tipo *Ale*, e as de fermentação baixa, utilizadas para a produção de *Lagers*. As de alta fermentação, fermentam à altas temperaturas (entre 17-25°C), são rápidas, levando 3-5 dias e no final da fermentação a levedura tende a subir para a superfície do mosto fermentado. Já as de baixa fermentação, fermentam à baixas temperaturas de fermentação (entre 9-15°C), são mais lentas, levando 7-10 dias e no final de fermentação a levedura precipita-se e fica no fundo da cuba de fermentação (Ribeiro *et al.*, 2018).

4.4. Processo de produção de cerveja

Segundo Ambev (2012), a forma de produzir cerveja pode variar dependendo do tipo de cerveja a ser produzida. Porém de um modo geral as etapas envolvidas no processo de produção de cerveja são maltagem, brassagem, fermentação e o processamento final que envolve a filtração, enchimento e a pasteurização.

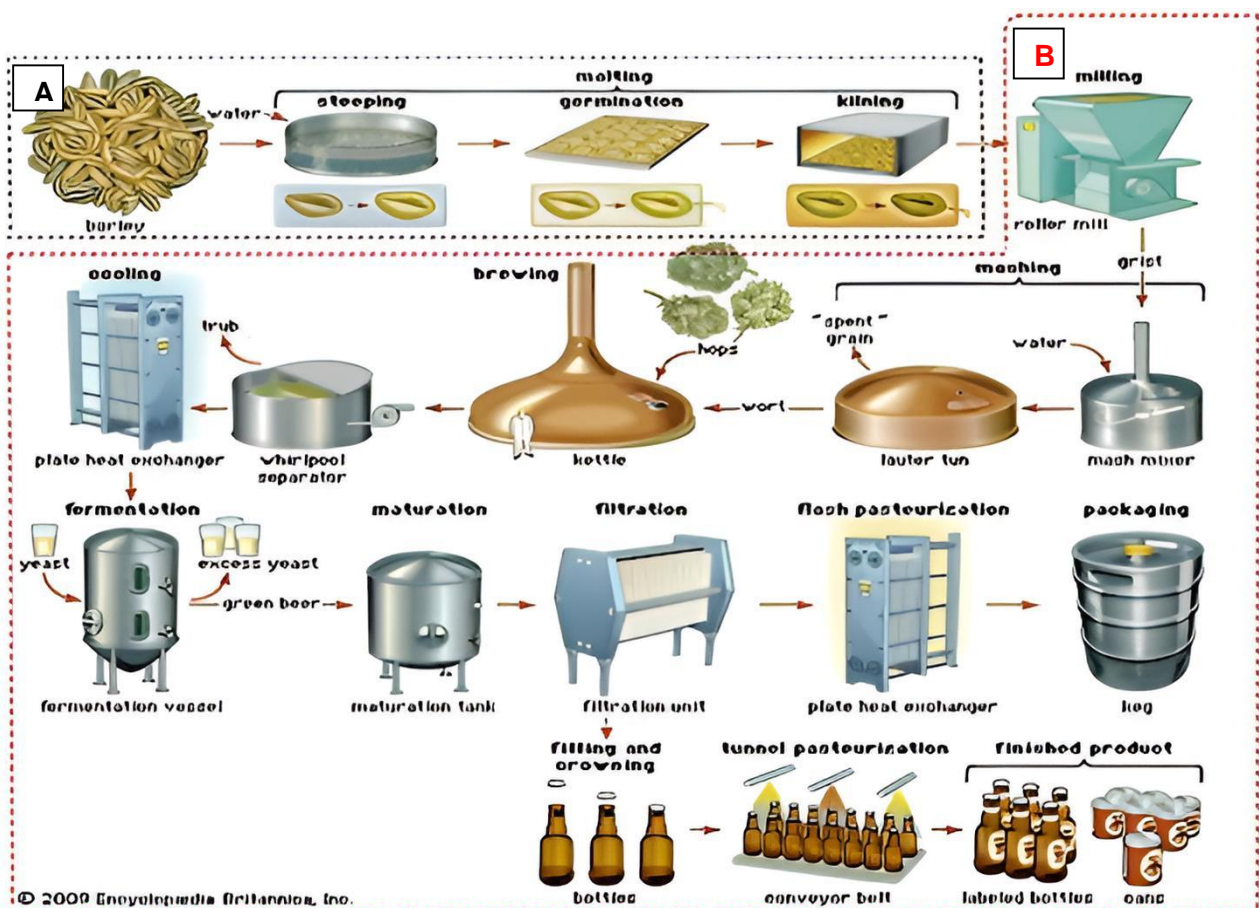


Figura II : Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de produção de cerveja. (A: maltagem; B: Processo cervejeiro que ocorre na unidade fabril- Adaptado pela autora). Fonte: [beer: process of production - Students | Britannica Kids | Homework Help](#)

4.4.1. Maltagem

A maltagem é o processo que antecede a produção da cerveja, caracterizado pela transformação do grão de cevada em malte, onde as enzimas hidrolíticas são sintetizadas e as reservas alimentícias do grão (amido) são modificadas, para que possam ser hidrolisadas durante a produção do mosto. As principais etapas de obtenção do malte são a limpeza e seleção dos grãos, a embebição, germinação e a secagem do malte (Ambev, 2012).

4.4.2. Brassagem

De acordo com Dennis *et al.* (2004), a brassagem consiste na transformação do malte em mosto, seguindo as seguintes etapas:

- **Moagem:** o malte é triturado em um moinho, mantendo as suas cascas praticamente intactas (dependendo do sistema de filtração a utilizar), formando uma farinha grosseira e favorecendo o contacto do malte com a água. Isto fornece condições às enzimas activadas do malte para que entrem em acção, dissolvendo os elementos solúveis que o compõem, tais como açúcares, proteínas, aminoácidos, sais minerais e os polifenóis (substâncias extraídas das cascas). Segundo Jay (2005), a cerveja é uma bebida basicamente feita através de malte hidrolisado e fermentado. A fermentação tem a função de transformar carboidratos em etanol. Os grãos de cevada utilizados têm na sua composição amido, um carboidrato que as leveduras fermentadoras não conseguem hidrolisar. Os grãos de cevada são colocados para germinar e nesse processo o próprio grão produz as enzimas α -amilase e β -amilase. A α -amilase liquefaz o amido e a β -amilase estimula a formação de açúcares

- **Empastagem:** à medida que o malte é moído, o mesmo é enviado para a caldeira de empastagem, onde em contacto com a água, ocorre a dissolução de grande número de substâncias, como os açúcares, as proteínas, os aminoácidos. Há também a dissolução de sais minerais, polifenóis (substâncias extraídas das cascas). Como cada enzima do malte tem um desempenho óptimo a uma determinada temperatura e pH, são dadas as condições descritas na tabela abaixo, de forma a permitir que ocorram as transformações iniciadas durante o processo de maltagem:

Tabela II : Intervalos de temperatura e pH ideais para a actuação das enzimas

Enzima	Temperatura ideal (°C)	pH ideal
α - amylase	70-75	5,6-5,8
β - amylase	60-65	5,4-5,6
Proteases	50-60	5,0-5,5

Como o mosto está misturado com as cascas do malte (bagaço), é preciso proceder a sua separação e esta operação é designada filtração do mosto.

- **Filtração do mosto:** é o processo que visa obter um mosto clarificado, através da separação da solução de açúcares do bagaço, e extrair açúcares fermentescíveis dos materiais sólidos residuais, após a filtração, através da lavagem do bagaço com água quente de modo a obter o máximo de extracto possível. No final, a água de lavagem e o mosto são misturados na caldeira de ebulição.

- **Ebulição do mosto:** o mosto é levado à ebulição com o objectivo de concentrá-lo, inactivar enzimas e estabilizá-lo, evitando o desenvolvimento de microorganismos. A ebulição está associada à adição de açúcares ou xaropes e também do lúpulo, podendo ser na sua forma natural, em *pellets* ou na forma de extracto.

- **Resfriamento do mosto:** após a ebulição, o mosto é enviado para o decantador centrífugo, para que ocorra a separação das proteínas e outras partículas formadas durante a ebulição. Após ser clarificado, o mosto é resfriado em um trocador de calor à temperatura adequada ao gênero de levedura a ser utilizada (alta e baixa fermentação). E logo à saída dos trocadores o mosto é oxigenado, com a finalidade de elevar a oxigenação para manter as condições ideais de fermentação e é doseada a levedura.

4.4.3. Fermentação

A fermentação é importante e determinante para a qualidade e características do produto final. É durante esta etapa que ocorre a transformação do mosto em cerveja, formando-se a maior parte dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor da cerveja (Ambev, 2012).

A fermentação alcoólica inicia-se através da acção das leveduras, que utilizam o açúcar do mosto para o seu crescimento e multiplicação, dando como resultado a formação do álcool e anidrido carbónico. Para garantir as características da cerveja, é fundamental utilizar um fermento puro, que é proveniente de uma mesma origem, sem nenhum tipo de mutação misturada e principalmente nenhum contaminante presente, tais como bactérias ou leveduras selvagens (Ambev, 2012).

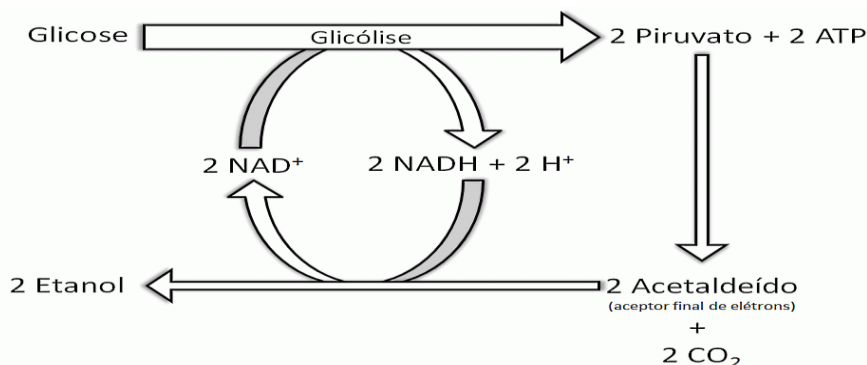


Figura III : Esquema ilustrativo da fermentação alcoólica. (Fonte: Acerva, 2009)

A fermentação pode ser dividida em duas fases, nomeadamente, a fermentação primária e a fermentação secundária. A fermentação primária consiste na inoculação do mosto com as leveduras de cultura, que transformam as moléculas de açúcar do mosto em álcool e dióxido de carbono. Após a fermentação primária, tem-se a fermentação secundária conhecida como maturação. Com a utilização de tanques cilindro-cônicos, não há a necessidade de transferir a cerveja, ou seja, actualmente a fermentação e a maturação ocorrem na mesma cuba. A cerveja permanece a cerca de 0°C, onde são apuradas as características sensoriais da cerveja (aroma e gosto). No final a cerveja é clarificada e filtrada, de modo a remover o excesso de leveduras e eventuais resíduos em suspensão no líquido (Ambev, 2012).

4.4.4. Filtração

De acordo com Habert *et al.* (2006), o processo de filtração é tido como finalização do processo de produção de cerveja. Tem por objectivos, eliminar os microrganismos que causam a turbidez biológica (leveduras e bactérias), eliminar macromoléculas (causadoras da turbidez não biológica, como proteínas, matéria orgânica, compostos do Lúpulo), clarificar e garantir que a estabilidade seja alcançada (microbiológica, organoléptica e coloidal) e garantir que todos coadjuvantes do processo são removidos da cerveja antes do seu enchimento (PVPP, estabilizadores de sílica gel). Este processo de eliminação dessas partículas ocorre através da passagem da cerveja maturada por um meio filtrante sem que haja alteração da qualidade do produto final. Devendo este ser feito com a máxima precaução, pois com a eliminação da levedura, qualquer infiltração de ar terá consequências nefastas sobre a estabilidade organoléptica. Os traços de oxigénio do ar são suficientes para induzir a oxidação, para tal recorre-se com frequência, ao uso da água desaerada e carbonatada para o preenchimento das condutas e expulsão do ar, por onde a cerveja irá percorrer.

A filtração da cerveja é a última etapa para correção organoléptica da cerveja e deve-se ter em conta o teor de CO₂ que reside dentro da cerveja. A quantidade de CO₂ produzido durante o processo de fabricação cervejeira, não é suficiente para fazer face às necessidades finais do produto. Sendo assim, faz-se a carbonatação da mesma que é a injeção do gás carbonico, podendo ser pelo CO₂ gerado na etapa de fermentação ou de fontes externas. E após a carbonatação, a cerveja pronta é enviada para tanques denominados BBT's (*Bright Beer Tank*), ou seja, tanque de cerveja filtrada, onde a mesma é mantida sob condições controladas de pressão e temperatura, de modo a garantir a preservação das propriedades sensoriais e o equilíbrio do teor de CO₂, em todo o volume, antes do seu envio ao enchimento (Ambev, 2012).

De acordo com Ceccato-antonini (2010), nos dias actuais existem várias tecnologias para a filtração da cerveja nas indústrias, como o uso de filtro de placas, de velas até as membranas filtrantes. A

escolha do tipo de filtração depende do estágio de tratamento e da quantidade das partículas presentes na cerveja maturada.

4.5. Contaminantes microbiológicos da cerveja

A cerveja é considerada uma bebida microbiologicamente estável, um meio totalmente desfavorável ao crescimento de microorganismos deteriorantes, devido ao seu baixo pH (3.8-4.4), presença de gás carbônico, etanol e das resinas do lúpulo. Porém, mesmo com as condições acima descritas, alguns microorganismos deteriorantes podem multiplicar-se e sobretudo quando não há capacidade de manter as condições acima descritas (Souza *et al.*, 2017).

Os mesmos autores, citam ainda que os principais factores por detrás do surgimento de microorganismos deteriorantes na cerveja acabada são a perda de CO₂ e consequente infiltração do ar, a recontaminação através dos equipamentos mal higienizados e operadores. As acetobactérias são as mais comuns e produzem metabólitos, causando alterações no produto final, como a turbidez, aromas e gosto desagradável a vinagre, o que também acaba levando à rejeição por parte dos consumidores.

A contaminação microbiológica durante a produção da cerveja pode ocasionar danos ao produto final. É ocasionada principalmente devido a falhas no processo, relacionadas ao armazenamento e qualidade dos grãos, processos de higienização e esterilização deficientes, falta de cuidados de higiene pessoal dos operadores, gerenciamento inadequado e contaminação da levedura, erros no processo de filtração, infiltração e incorporação de ar nas condutas dos BBT's e enchedoras e pasteurização deficiente e também excessiva (Ceccato-antonini, 2010).

Sakamoto e Konings (2003), constataram que existem vários microorganismos relacionados com a deterioração da cerveja. Dentre eles estão as bactérias gram-positivas, principalmente aquelas produtoras de ácido láctico pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são anaeróbicas facultativas e são responsáveis por aproximadamente 70% da deterioração da cerveja. As bactérias do gênero *Lactobacillus* são bactérias heterofermentativas e homofermentativas. Já as bactérias do gênero *Pediococcus* são homofermentativas, sendo a espécie mais conhecida no mundo cervejeiro a *Pediococcus damnosus*.

As bactérias que são capazes de realizar a fermentação de forma aeróbica e anaeróbica, pelo que poderão apresentar um crescimento acentuado tanto na fase de produção do mosto como no processo de fermentação e maturação da cerveja. Por outro lado, a maior parte das bactérias presentes na cerveja são bactérias ácido-acéticas, estritamente aeróbicas e responsáveis pela oxidação do etanol em ácido acético, causando um odor de vinagre às cervejas produzidas (gêneros *Gluconobacter* e *Acetobacter*). Assim, quanto mais elevado for o pH da cerveja, na faixa de 5-6,5, mais fácil encontrar-se-à este tipo de bactérias (Sakamoto e Konings, 2003).

Outro contaminante mais comum no ambiente cervejeiro é a levedura selvagem. A contaminação pode ocorrer por leveduras do gênero *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces* e estes contaminantes competem com as linhagens puras utilizadas pelas cervejarias. As leveduras selvagens do gênero *Saccharomyces* são consideradas as mais perigosas, pois são mais semelhantes às linhagens de levedura de cultivo, dificultando a sua diferenciação (Amorim *et al.*, 2011).

As leveduras que apresentam características contaminantes são consideradas um grande problema para a indústria de fermentação alcoólica. Essas são consideradas leveduras selvagens pois diferem da levedura de cultivo utilizada na produção de cerveja. Elas têm a sua origem no ambiente podendo ser introduzidas ao processo de fermentação através do substrato, água utilizada no processo, ar e pelos problemas que podem surgir durante a assepsia dos tanques de fermentação (Ceccato-antonini, 2010).

Segundo Palmann (2001), apesar do inóculo iniciador das fermentações industriais ser feito com linhagens selecionadas e aprimoradas para uso comercial, existem leveduras selvagens que se encaixam no perfil desejado para processos de seleção e apresentam alta eficiência fermentativa combinada com a capacidade de tolerância aos estresses e elevada capacidade dominante no processo. Pois, a microbiota da fermentação é rica e em grande parte dos casos é detectada a presença de mais de uma levedura selvagem, altamente competitiva, que estabelece dominância ou age em consórcio com a linhagem comercial.

No estudo conduzido por Della-bianca *et al.* (2013), a dominância exercida por uma linhagem é descrita através da proporção desta na população encontrada no fermentador. Esta característica é dependente do grau de competitividade com relação a outras linhagens e a sua velocidade de crescimento.

Através do estudo desenvolvido por Parazzi, Silva e Araújo (2002), na avaliação do desempenho de linhagens de leveduras selvagens isoladas como contaminantes em uma indústria produtora de etanol, observou-se que uma linhagem destacou-se em relação à viabilidade celular, tendo se adaptado perfeitamente às condições do meio. Enquanto que, outra linhagem selvagem apresentou um desempenho fermentativo bastante inferior, porém teve maior crescimento celular, sendo que a sua presença no processo de produção cervejeira pode causar perdas irrecuperáveis.

As linhagens de leveduras selvagens do tipo *Saccharomyces* e a levedura de cultivo apresentam um metabolismo muito semelhante, o que dificulta controlar a contaminação. As leveduras selvagens são de difícil detecção, pois diferentemente das bactérias elas são pouco susceptíveis à presença de ácido, sendo assim impossível serem eliminadas através de um processo de tratamento com ácido (Amorim *et al.*, 2011).

De acordo com o mesmo autor, compreender o comportamento das leveduras selvagens é visto como uma solução para o problema. O monitoramento da permanência de leveduras selecionadas e o controle de linhagens selvagens são importantes para garantir a eficiência da fermentação e também a economia dos insumos utilizados para o controle dos efeitos negativos da contaminação. Outro método é adicionar culturas puras de levedura cervejeira ao composto, de forma a diminuir a quantidade destes microrganismos contaminantes.

Quando se identifica um caso de contaminação por levedura selvagem, que cause prejuízo para o rendimento da fermentação, a melhor ação a ser tomada é a substituição da levedura contaminada, reforço das condições de assepsia e controle das condições de fermentação (Ceccato-antonini, 2010).

4.6. Impacto da levedura selvagem na estabilidade da cerveja

De acordo com Souza e Feveiro (2017), as leveduras selvagens causam as seguintes alterações na cerveja:

- Conferir odores fenólicos (pois possuem uma grande capacidade de descarboxilar ácidos fenólicos levando ao aparecimento de odores fenólicos na cerveja);
- Algumas culturas de *S. cerevisiae* são capazes de produzir proteínas que, quando segregadas em determinados intervalos de pH, podem levar à morte das leveduras de cultivo (*killer yeast*);
- Conferir odores e sabores indesejáveis (possuir um pH bastante baixo de uma forma contínua também potencia o desenvolvimento da levedura selvagem, levando ao desaparecimento gradual da levedura de cultivo);
- A concentração desta levedura selvagem no fundo dos tanques de fermentação, faz com que sejam deixadas grandes quantidades de açúcar residual e aumento do tempo de fermentação;
- Criar uma espécie de película na superfície da cerveja;
- Causar a turbidez da cerveja.

Elas podem ainda causar a produção excessiva de espuma, levando a perda do teor alcoólico e perda de eficiência fermentativa e esta perda é proporcional ao nível de contaminação presente (Lorenz *et al.*, 2000).

No processo de reutilização de células, a levedura passa por um processo de centrifugação e a presença de leveduras selvagens faz com que haja redução da eficiência desta etapa do processo, produzindo uma massa de leveduras menos concentrada. Esta massa passa por uma condição de estresse durante o tratamento ácido, o que pode levar à diminuição da sua actividade celular ou ainda a morte completa da levedura (Amorim *et al.*, 2011).

4.7. Controlo microbiológico das leveduras selvagens

Segundo Ceccato-antonini (2010), a parte indispensável do controlo microbiológico é a detecção e o isolamento de leveduras selvagens, uma vez constatada sua presença na fermentação. As ferramentas utilizadas para a identificação são os meios diferenciais, testes fermentativos e técnicas de identificação moleculares. Os meios de cultura diferenciais ou seletivos permitem isolar e identificar leveduras selvagens das leveduras de cultivo, através de características fisiológicas e morfológicas, como necessidades nutricionais específicas, resistência a determinados compostos e interação com corantes (Ceccato-antonini, 2010).

O isolamento e identificação de leveduras selvagens são realizados utilizando os meios: WLN (*Wallerstein Laboratory Nutrient*), LYS (*Lysine medium*), UBA (*Universal Beer Agar*) e LWYM (*Lin Wild Yeast Medium*), entre outros. Além disso, pode-se fazer o uso de técnicas moleculares como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *DNA-fingerprinting*, que são capazes de detectar contaminações em pequenas quantidades, além de permitir a diferenciação a nível intraespecífico (Lansing, 2004).

Actualmente, não existem produtos ou processos específicos que sirvam para o controle das leveduras selvagens sem que as leveduras de cultivo não sejam afectadas. Sendo assim, é necessário que haja o controle microbiológico do processo, visando identificar as áreas mais críticas e minimizar perdas de rendimento (Amorim *et al.*, 2011).

A contaminação por leveduras selvagens, geralmente é detectada quando há uma queda no rendimento da fermentação, excesso de floculação e produção de espuma, sendo estes sinais típicos da presença de leveduras contaminantes. (Priest e Campbell, 2003).

De acordo com o mesmo autor, para além dos sinais típicos da presença de leveduras contaminantes, elas causam odores e sabores indesejáveis e também a turbidez na cerveja. Estes efeitos podem levar à perdas monetárias pois a cerveja contaminada terá de ser descartada, porque através do processo de pasteurização haverá somente o alcance da estabilidade biológica e não a correcção dos parâmetros de qualidade afectados. Sendo assim, é importante que se faça a substituição da levedura contaminada por levedura de cultivo pura e o reforço das condições de higienização dos equipamentos e do meio ambiente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de estudo

O presente estudo foi conduzido na empresa Cervejas de Moçambique (CDM), que tem por objecto social a produção e subsequente comercialização de cervejas, bem como a importação e exportação de produtos relacionados com o mesmo objecto.

5.2. Técnica de amostragem

Para a realização deste procedimento experimental, foi realizada uma amostragem aleatória simples, onde foram seleccionadas e colhidas amostras em quatro (4) pontos previamente identificados como potencialmente críticos para a contaminação por leveduras selvagens. Nos pontos identificados, foi colhida uma (1) amostra em quatro (4) momentos diferentes e encaminhou-se as amostras para o Laboratório de Microbiologia interno da empresa, conforme ilustra a tabela III:

Tabela III : Demonstração do plano de amostragem

Momento	Ponto de amostragem			
	Levedura	Mosto em fermentação (18-27h)	Cerveja filtrada	Cerveja antes da pasteurização
Amostragem 1	1	1	1	1
Amostragem 2	1	1	1	1
Amostragem 3	1	1	1	1
Amostragem 4	1	1	1	1
Total	4	4	4	4

5.3. Análises microbiológicas: procedimentos laboratoriais

As análises consistiram no cultivo e isolamento, para além da identificação das leveduras selvagens que ocorrem no processo cervejeiro. O procedimento experimental foi realizado tendo como guia o Manual de Microbiologia de Alimentos do Laboratório de Higiene de Alimentos e Águas (1997) e o *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology* (2005).

5.3.1. Cultivo/isolamento de leveduras selvagens

Para a pesquisa (cultivo e isolamento) de leveduras selvagens no processo cervejeiro foram aplicados os métodos propostos por *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology* (2005) e que são seguidos pela empresa.

i. Análise da levedura de cultura

Retirou-se 1 mL da amostra de levedura para um tubo de ensaio contendo 9 mL de soro fisiológico e em seguida homogeneizado com auxílio do vórtex por 60 segundos de modo a obter a diluição mãe. A partir da diluição mãe, de forma asséptica, pipetou-se 1 mL para tubos de ensaio contendo soro fisiológico para obtenção das diluições seriadas até a diluição 10^{-5} . A partir das diluições obtidas, pipetou-se 0.1 mL e inoculou-se na placa de petri contendo o meio de cultura YM+CuSO₄ e a mesma quantidade para outra placa de petri contendo o meio WLN, através da técnica de espalhamento. A amostra foi espalhada com o auxílio do espalhador do vidro pela placa e em seguida, as placas invertidas foram incubadas à 28°C por 4 dias. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

ii. Análise do mosto em fermentação

A amostra do mosto em fermentação foi colhida no intervalo de 18 à 27 horas após do fecho da cuba, tendo se pipetado 0.1mL da amostra de mosto em fermentação para uma placa de petri contendo o meio de cultura YM+CuSO₄ e a mesma quantidade para outra placa de petri contendo o meio WLN, através da técnica de espalhamento. A amostra foi espalhada com o auxílio do espalhador do vidro pela placa e em seguida, as placas invertidas foram incubadas à 28°C por 4 dias. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/mL.

iv. Análise da cerveja filtrada e cerveja antes da pasteurização (enchimento de barris)

Filtrou-se 100mL de cada amostra (cerveja filtrada e da cerveja antes da pasteurização), através do método de filtração por membrana, com o uso de membranas estéreis com diâmetro de 0.45µm de poro e de forma asséptica. Após a filtração, as membranas foram semeadas nas placas de petri contendo o meio YM+CuSO₄ e WLN e em seguida, as placas invertidas foram incubadas à 28°C por 4 dias. Os resultados obtidos foram expressos em UFC/mL.

5.3.2. Identificação micro e macroscópica das colônias suspeitas de leveduras selvagens

Para a identificação micro e macroscópica das colônias suspeitas de leveduras selvagens, bem como a quantificação, teve-se como guia o Manual de Microbiologia de Alimentos do Laboratório de Higiene de Alimentos e Águas (1997).

i. Identificação macroscópica

Para a identificação macroscópica, teve-se como base as características das colónias como o formato, o aspecto e a coloração (LNHAA, 1997).

ii. Identificação microscópica

Para a identificação microscópica, efectuou-se a coloração para observação das suas estruturas morfológicas, sendo que a mesma consistiu na retirada de uma pequena porção da colônia, com o auxílio da ansa de colocou-se sobre uma gota de eritrosina colocada numa lâmina e cobriu-se com uma lamela. Levou-se ao microscópio para a observação, com a objectiva de 40x (LNHAA, 1997).

5.4. Análise e apresentação dos dados

Os dados analisados foram organizados numa tabela excel e submetidos a análise estatística descritiva (cálculo de média e desvio padrão). Estes dados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ocorrência de leveduras selvagens nas diferentes etapas do processo cervejeiro

Foi possível analisar um total de 16 amostras, que foram colhidas nas diferentes etapas do processo cervejeiro, durante 4 semanas, onde foi processada 1 amostra de cada ponto de amostragem por semana e obteve-se os resultados apresentados abaixo:

i. Análise da levedura de cultura

Não houve o desenvolvimento de levedura selvagem em nenhuma das quatro (4) amostras de levedura de cultura, ora analisadas. Neste ponto, os resultados obtidos foram satisfatórios, não tendo sido verificada a ocorrência de levedura selvagem. Estes resultados, demonstraram que a levedura de cultura foi utilizada em condições assépticas, sendo este facto possível através da realização da propagação da cultura em laboratório e a garantia das condições higiénicas dos tanques de levedura para o armazenamento e posterior utilização.

Constatou-se ainda, nas placas contendo o meio WLN, o crescimento de levedura de cultivo e a alteração da cor do meio, como ilustrado na figura IV:



Figura IV : Análise da levedura de cultura. A: Placa contendo o meio YM+CuSO₄ e negativa para levedura selvagem; **B:** Crescimento de levedura de cultivo para a diluição 10⁻⁵ no meio WLN.

O crescimento da levedura de cultivo, verificado no meio WLN, foi devido ao facto deste ser um meio diferencial e permitir a identificação de diferentes colorações, morfologias e texturas dos isolados (Rocha, 2015).

Relativamente à alteração da cor do meio, verificou-se que após o desenvolvimento da levedura de cultivo, o meio tornou-se opaco/claro sendo que inicialmente era verde e as colónias de leveduras desenvolvidas apresentavam de coloração branca e possuíam o centro esverdeado, sendo esta característica típica da levedura de cultivo neste meio. Esta alteração foi também observada por

Jespersen e Jakobsen (1996) e é justificada pelo facto do meio WLN possuir em sua composição o corante verde bromocresol. Sendo assim, à medida que as colónias de levedura se desenvolvem, absorvem o corante verde bromocresol, um indicador de pH, de maneira distinta, permitindo a identificação de características das colónias e a alteração da cor do meio.

ii. Análise do mosto em fermentação

Para a análise do mosto em fermentação, verificou-se que as primeiras duas amostras, referentes à primeira e segunda semana, que através do procedimento utilizado pela empresa para as placas contendo o meio WLN, foram totalmente colonizadas não permitindo a identificação das colónias presentes e houve também a alteração da cor do meio, como é possível observar na figura V:



Figura V : Elevado desenvolvimento da levedura no mosto em fermentação. A e B: Placas contendo o meio WLN; **C:** Placa contendo o meio YM+CuSO₄ e negativa para levedura selvagem.

O crescimento elevado da levedura de cultivo e a alteração da cor do meio WLN, poderá estar relacionado com o facto da amostra ser de mosto em fermentação (18-27h), sendo esta a fase de crescimento exponencial e que possui uma alta viabilidade celular. Este crescimento é ainda justificável pelo facto do meio de cultura utilizado ser propício para o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos. À similaridade da levedura de cultura, para o mosto em fermentação observou-se também o crescimento da levedura de cultivo para o meio WLN e a alteração da cor do meio. As colónias observadas apresentavam coloração branca, eram opacas e circulares, sendo essas características similares às descritas por LNHA (1997).

Com base no mesmo método, verificou-se que nas placas contendo o meio YM+CuSO₄ os resultados obtidos foram satisfatórios sem a ocorrência de levedura selvagem. Este facto pode ser observado na figura V (C), acima ilustrada.

Através dos procedimentos utilizados pela empresa, verificou-se que neste ponto as placas contendo o meio WLN foram totalmente colonizadas e dificultando a sua identificação. Para o mosto em fermentação, a empresa faz o uso do meio WLN adicionado de ciclohexamida, por forma a

inibir o crescimento de leveduras, pois nesta fase da fermentação há o crescimento máximo das células de levedura, dificultando assim a sua diferenciação.

Sendo assim, procedeu-se a realização das diluições seriadas para as duas (2) amostras seguintes, por forma a reduzir a quantidade de microorganismos presentes na amostra. Para a realização das diluições seriadas, foram utilizados os procedimentos descritos no LNHA (1997). Através das diluições seriadas realizadas, obteve-se os resultados apresentados na figura VI:

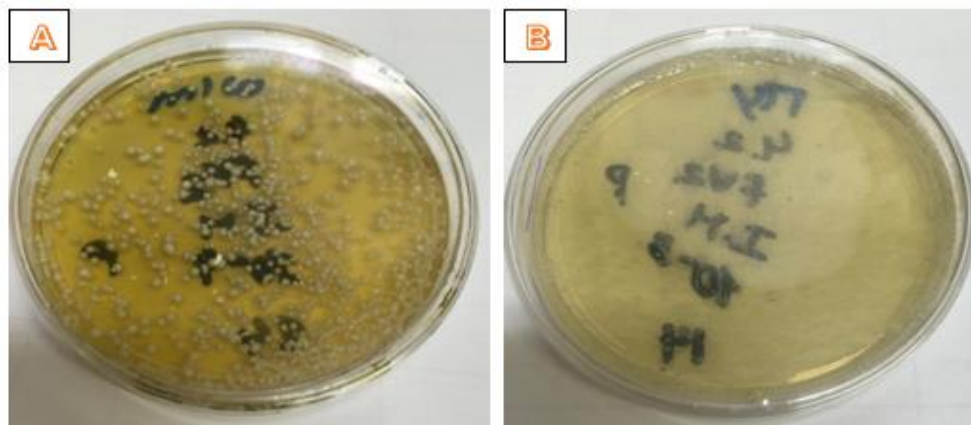


Figura VI : Resultados após as diluições seriadas do mosto em fermentação. A: Crescimento de levedura de cultivo para a diluição 10^{-4} , usando o meio WLN; **B:** Ligeiro crescimento de levedura de cultivo na diluição 10^{-4} , usando o meio YM+CuSO₄.

Os resultados obtidos após as diluições, foram satisfatórios não tendo sido verificada a ocorrência de levedura selvagem. Vários são os factores que contribuíram para a obtenção de resultados satisfatórios na análise do mosto em fermentação, como os citados por Venturini *et al.*, (2001) e descritos anteriormente, como a utilização do inóculo da cultura iniciadora em condições assépticas, realização da higienização e esterilização nos tanques de fermentação e garantia do seguimento das BPH por parte dos manipuladores.

Observou-se ainda que com as diluições utilizadas, que foram as de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , registou-se um elevado crescimento de levedura de cultivo para o meio WLN. Vieira e Fernandes (2012), referem que para o meio WLN deve-se fazer o uso de diluições 10^{-7} e 10^{-8} , forma a reduzir a quantidade de microorganismos presentes na amostra.

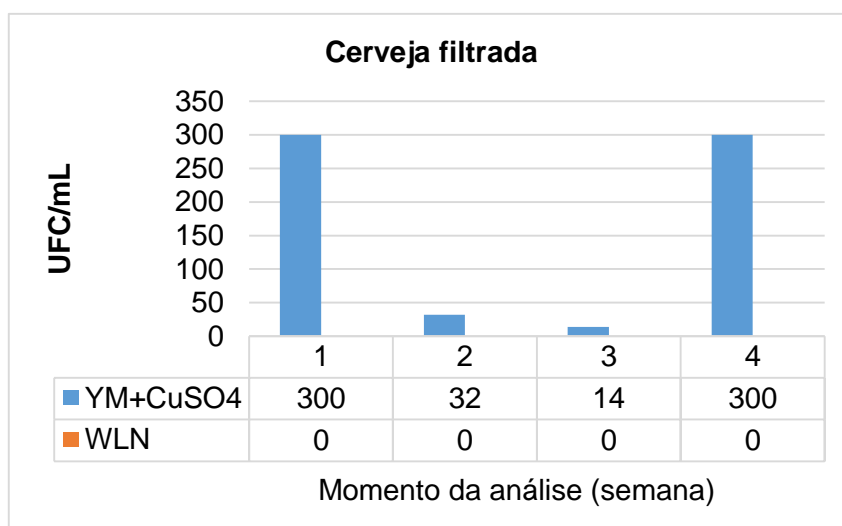
Pelo facto do processo fermentativo consistir no ponto central para a produção de qualquer bebida alcoólica, é imperioso que o mesmo seja livre de contaminações. De acordo com Vaughan *et al.* (2005), o mosto é rico em nutrientes e coopera para o crescimento microbiano, sendo que a contaminação do mesmo por leveduras selvagens poderia levar ao abrandamento ou à cessação da fermentação.

Quanto ao meio YM+CuSO₄, que é um meio selectivo, não houve o desenvolvimento de leveduras selvagens e verificou-se um ligeiro desenvolvimento da levedura de cultivo, o que demonstrou que a quantidade de sulfato de cobre adicionado ao meio não foi efectiva. No trabalho publicado por Sun *et al.* (2016), mostra-se que as leveduras selvagens podem ser mais resistentes ao cobre do que a levedura de cultura, sendo que a quantidade a ser adicionada está na faixa de 50-300 mg/litro, dependendo da sensibilidade da cultura de levedura ao cobre.

iii. Análise da cerveja filtrada

Houve o desenvolvimento da levedura selvagem em 100% (n=4) das amostras analisadas, para o meio YM+CuSO₄, sendo que para o meio WLN, não registou-se o crescimento como demonstra o gráfico 1, que se segue:

Gráfico I : Representação da contagem de levedura selvagem na cerveja filtrada



No gráfico 1, são apresentados os valores das unidades formadoras de colónias de leveduras selvagens, na cerveja filtrada, sendo estes não satisfatórios. Verificou-se a ocorrência de leveduras selvagens nas quatro (4) amostras analisadas, sendo este o maior ponto de contaminação do presente estudo.

A presença de leveduras selvagens afecta de forma negativa a qualidade do produto final como também compromete a aceitação por parte do consumidor. Elas actuam causando a deterioração, tanto nos estágios iniciais como nos estágios posteriores do processamento, causando a deterioração da cerveja (Lorenz *et al.*, 2000).

De acordo com Souza e Feveiro (2017), as leveduras selvagens são pertencentes à dois grupos, as do gênero *Saccharomyces* e as *não-Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Zygosaccharomyces*, entre outros). E a ocorrência das mesmas no processo de produção cervejeira, pode ocasionar problemas no processo fermentativo, turbidez, odores e

sabores indesejáveis na cerveja, sendo que a levedura mais implicada nesses casos é a *Brettanomyces spp.*

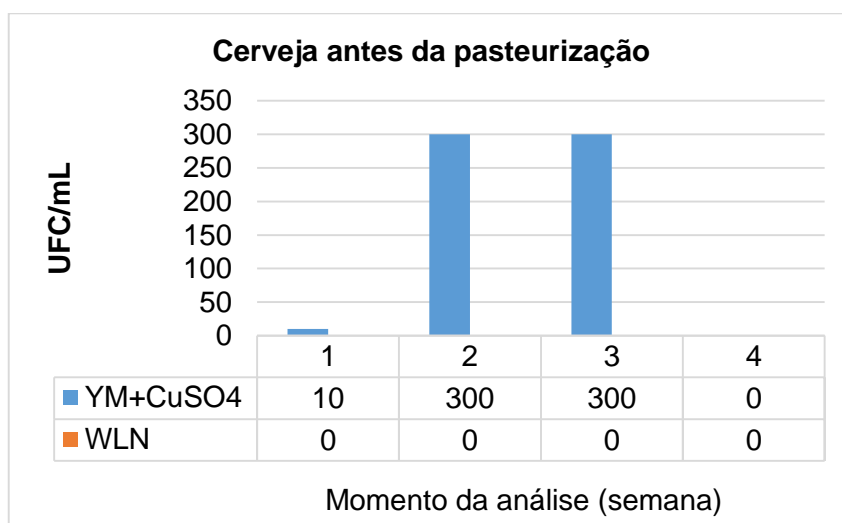
Para o meio WLN, verificou-se que não houve o desenvolvimento da levedura selvagem, porém verificou-se a presença de levedura de cultivo e de bactérias. Silva-Filho (2003), refere que pelo facto deste meio de cultura não ser selectivo, permite o desenvolvimento de qualquer espécie de levedura. E para que haja melhor identificação das características morfológicas das leveduras selvagens, deve-se adicionar um agente inibidor, como é o caso do cicloheximida, que irá inibir o crescimento da levedura de cultivo e permitir o crescimento de leveduras selvagens.

Os resultados dessa análise, sugerem que tenha havido falhas nos processos de higienização e esterilização dos tanques de cerveja filtrada e do ambiente, sendo que estes processos permitem eliminar todos os microrganismos nocivos à cerveja. É imprescindível que a limpeza química efectuada, assegure a eliminação de resíduos de cerveja que podem acumular-se no interior dos tanques. E para complementar a mesma, realizar a limpeza mecânica pela parte externa para eliminar e essas comunidades microbianas que se formam. Para além da limpeza, sugere-se a realização de testes microbiológicos nos possíveis pontos de contaminação durante a maturação da cerveja, apesar da mesma dar-se no mesmo tanque de fermentação, e também no processo de transferência da cerveja maturada para à filtração como também ao enchimento, sendo estes pontos que possam ser estudados.

iv. Análise da cerveja antes da pasteurização (enchimento de barris)

Verificou-se que em 75% das amostras analisadas, houve o desenvolvimento de levedura selvagem para o meio YM+CuSO₄ e para o meio WLN não se registou crescimento, sendo este resultado similar à cerveja filtrada, como demonstra o gráfico 2, que segue:

Gráfico II : Representação da contagem de levedura selvagem na cerveja antes da pasteurização



Referente à ocorrência de leveduras selvagens na cerveja antes da pasteurização, à similaridade da cerveja filtrada, os resultados obtidos não foram satisfatórios em 75% das amostras onde obteve-se a positividade para a ocorrência de leveduras selvagens. Na amostra 4 (quarta semana), o resultado negativo para a levedura selvagem sugere que houve reforço do monitoramento da higienização e esterilização não só para os tanques como também para o ambiente, pois de acordo com Ceccato-antonini (2010), a levedura selvagem tem sua origem no ambiente e pode ser introduzida ao processo, através dos problemas que podem surgir durante a assepsia dos tanques.

Para além do crescimento das leveduras selvagens, verificou-se o crescimento da levedura de cultivo, sendo que este facto deveu-se à quantidade de sulfato de cobre adicionada o meio para a inibir o crescimento de levedura de cultivo, tendo a mesma sido ajustada para fornecer condições ideais para o crescimento de leveduras selvagens e a inibição da cultura de levedura, alterando-se de 10mL para 15mL, por forma a evitar a existência de levedura de cultivo.

De acordo com o Instituto de Análise de Métodos Cervejeiros (1997), o meio YM+CuSO₄ possui a vantagem de suportar de forma selectiva, o crescimento de uma grande variedade de leveduras selvagens e espera-se a eficácia da inibição do sulfato de cobre para o crescimento das leveduras de cultura e o crescimento da levedura selvagem possa ser promovido.

Descrevendo estatisticamente os resultados obtidos no presente estudo, as percentagens para as variáveis ordinais são de 73,1% e 26,9% correspondendo, respectivamente, a resultado negativo e positivo, para a ocorrência de leveduras selvagens. Este cenário indica a necessidade de reforço alguns aspectos, como observou-se para a amostra 4 da cerveja antes da pasteurização.

A empresa possui vários pontos fortes que impulsionam para a obtenção de resultados satisfatórios, como o reforço de monitoramento higienização e esterilização dos tanques e do ambiente, a utilização da levedura em condições assépticas e a realização do controle microbiológico dos equipamentos após a realização do CIP (*Clean In Place*) e em cada estágio de produção. Estes procedimentos garantem a manutenção da qualidade da cerveja produzida.

Das amostras positivas para levedura selvagem, obteve-se a média de 48 ± 110 UFC/mL, sendo que a análise estatística realizada demonstrou que existe maior dispersão dos dados amostrais em relação à média. De acordo com Feijoo (2010), o alto desvio-padrão pode ser interpretado pelo cálculo do coeficiente de variação (CV), avaliando assim a homogeneidade dos dados. Obteve-se um CV de 229%, que é superior à 50%, demonstrando que existe uma alta dispersão e heterogeneidade dos dados obtidos, sendo que quanto maior for este valor menos representativa é a média.

Segundo Ceccato-antonini (2010), as pesquisas aplicadas à produção alcoólica têm-se concentrado maioritariamente em problemas relativos às contaminações bacterianas, permanecendo as

contaminações por leveduras selvagens pouco estudadas e conhecidas, e também pelo facto das cervejas passarem pelo processo de pasteurização para ao alcance da sua estabilidade biológica com a finalidade de conservar e aumentar a vida útil do produto final, porém existem casos em que podem ocorrer falhas neste processo e também alterações do produto antes deste processo.

A presença das leveduras selvagens acarreta problemas como a alta competitividade com a levedura de cultivo e existem casos que as mesmas predominam a população de células existentes. Tendo em conta que para a eliminação de linhagens invasoras, não é possível fazer a utilização de agentes microbianos e as melhores acções a serem tomadas são a substituição da levedura contaminada por levedura de cultivo pura, reforçar as condições de assepsia dos equipamentos e do meio ambiente e controlar as condições de fermentação (Ceccato-antonini, 2010).

Amorim *et al.* (2011), em seu estudo sobre os desafios científicos da produção de bioetanol no Brasil, referenciou que não existem actualmente produtos específicos para o controle das leveduras selvagens que não afectem as linhagens comerciais. Sendo assim, é necessário que haja o controle microbiológico da fermentação, visando minimizar perdas de rendimento, pois as leveduras selvagens podem ser introduzidas ao processo através de diversas formas como, a água utilizada no processo e pelos problemas que podem surgir durante a assepsia dos tanques de fermentação.

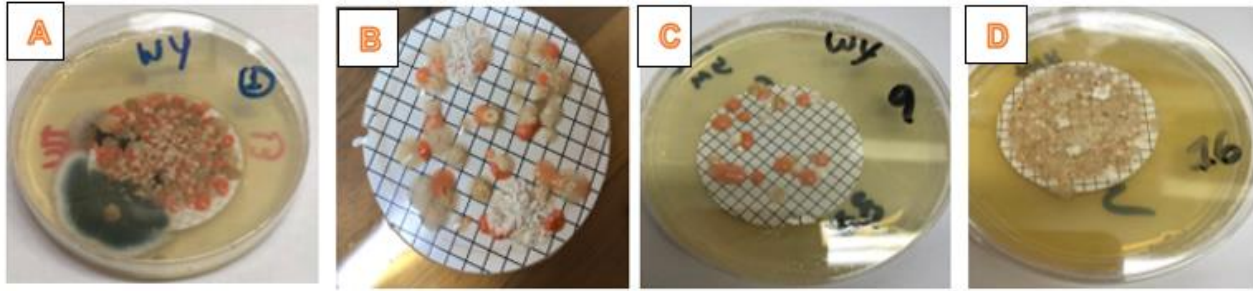
6.2. Identificação micro e macroscópica das colónias suspeitas de leveduras selvagens

Os pontos que apresentaram contaminações foram cerveja filtrada e cerveja antes da pasteurização (enchimento de barris), representando uma frequência de 26,9%. As leveduras selvagens isoladas, foram purificadas e descritas macro e microscopicamente, com base nas características morfológicas exibidas pelas colónias, sendo apresentadas abaixo:

6.2.1. Identificação macroscópica

A morfologia das colónias desenvolvidas no meio YM+CuSO₄ foi documentada, como pode ser observado na figura 7. Verificou-se que as colónias selvagens, possuíam formato arredondado e rasteiro, coloração variada como rosa, castanho e branca e um aspecto liso e rugoso. A morfologia observada nas placas positivas para as leveduras selvagens, mostra que houve predominância de colónias de coloração rosa e castanha, como pode ser visto na figura 7:

Cerveja filtrada



Cerveja antes da pasteurização (enchimento de barris)

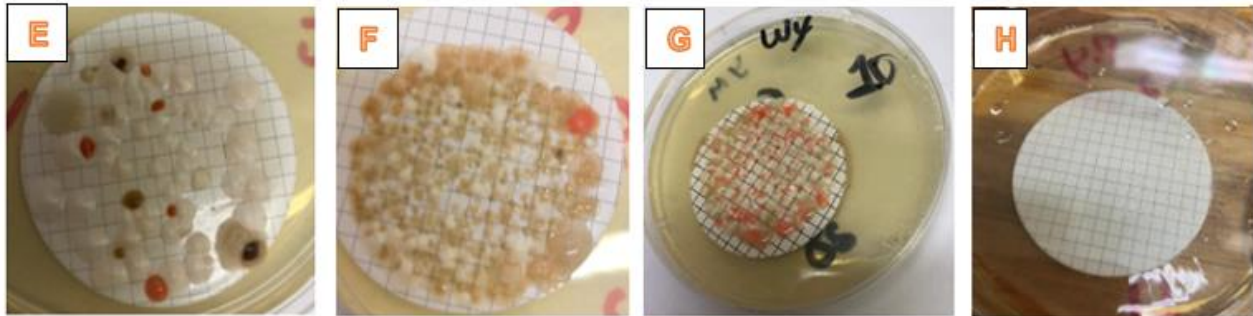


Figura VII : Ocorrência de leveduras selvagens no meio YM+CuSO₄. A, B, C e D (Cerveja filtrada), com a predominância de colónias rosadas e arredondadas; E, F, G e H (Cerveja antes da pasteurização).

Efectuou-se a leitura das placas positivas para levedura selvagem e fez-se a identificação macroscópica das colónias, onde verificou-se que na placa E para além da levedura selvagem houve o desenvolvimento da levedura de cultivo. Os resultados obtidos, estão apresentados na tabela IV, sendo estes obtidos tendo em conta ao formato, aspecto e coloração das colónias:

Tabela IV : Ilustração dos aspectos macroscópicos

Amostra/Placa		Características macroscópicas		
		Formato	Aspecto	Coloração
Cerveja filtrada	Placa A	- Arredondado	- Húmido - Brilhante - Lisa - Cremosa	- Rosa - Castanho
	Placa B	- Arredondado	- Húmido - Brilhante - Lisa - Rugoso - Cremosa - Cerebriforme	- Rosa - Castanho
	Placa C	- Arredondado	- Húmido - Brilhante - Lisa - Cremosa	- Rosa - Castanho
	Placa D	-	- Rugoso - Cerebriforme	- Castanho
Cerveja antes da pasteurização (enchimento de barris)	Placa E	- Arredondado	- Húmido - Brilhante - Lisa - Rugoso	- Rosa - Castanho
	Placa F	- Arredondado - Rasteiro	- Húmido - Brilhante - Lisa	- Castanho
	Placa G	- Arredondado - Rasteiro	- Húmido - Brilhante - Lisa	- Rosa - Castanho

Verificou-se a presença de colónias rugosas, nas placas B, D e E. A presença de levedura de cultivo na placa E, ocorreu devido à quantidade de sulfato de cobre adicionado ao meio, necessitando de ajustes das quantidades para optimização do meio.

A presença de levedura selvagem rugosa, ocasiona a queda no rendimento da fermentação e também na produção do álcool. De acordo com Ceccato-Antonini e Parazzi (1996), elas são capazes de dominar o processo substituindo a levedura de cultivo, causar a formação excessiva de

espuma e também a floculação. Nestes casos, para a retoma do rendimento esperado faz-se a substituição da levedura de cultivo.

De acordo com Priest e Campbell (2003), a floculação é a agregação de células livres, que após a sua união, sedimentam no meio ou flutam. Esse fenómeno ocorre devido a factores intrínsecos, como o controle genético e a factores extrínsecos, como as condições do meio em que as leveduras encontram-se e sua interação com a estrutura da parede celular.

Nas placas A, C, F e G, verificou-se crescimento de colónias que apresentavam-se de formato circular, margens direitas, opacas e diferiam na coloração das mesmas. Estas características observadas nas placas acima citadas foram similares às descritas por LNHAA (1997) para a levedura de cultivo, onde as mesmas apresentam-se de colónias brancas ou cremes, opacas, circulares e com margens direitas.

Observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000), no monitoramento microbiológico da fermentação etanólica, em unidades industriais e em safras diversas, indicaram a presença de um biotipo de levedura que apresentava células dispostas em cadeias, com colónias opacas e circulares, pertencendo à espécie *S. cerevisiae*. Este biotipo apresentou como características a alta capacidade de crescimento, formação de uma espécie de espuma grossa e pegajosa e também levou à perda de açúcar e álcool.

A presença de colónias que possuem características similares à espécie *S. cerevisiae* no presente estudo, foi referenciada por Latorre (2016), onde cita que elas representam maior risco de contaminação, devido à sua similaridade, levam ao baixo potencial fermentativo e supõem-se que as mesmas possam ser mais resistentes a agentes antimicrobianos.

O maior risco de contaminação representado pela ocorrência de leveduras selvagens *Saccharomyces*, é da presença do género *Saccharomyces diastaticus*, devido à sua semelhança morfológica com a levedura de cultivo. Tendo em conta que as leveduras selvagens *Saccharomyces* representam um desafio para as indústrias no que diz respeito ao seu controle por conta da sua similaridade com a levedura de cultivo, enquanto que as leveduras selvagens não-*Saccharomyces* podem ser controladas através das mudanças no processo (Souza e Fevereiro, 2017).

Sendo assim, a análise crítica dos resultados não satisfatórios obtidos sobre a ocorrência de leveduras selvagens no processo, é fundamental pois a presença delas pode acarretar sérios problemas operacionais e também no produto final, tornando assim a realização do controle microbiológico como uma etapa imprescindível para a detecção das leveduras selvagens no processo de produção cervejeira.

6.2.2. Identificação microscópica

Para a identificação microscópica das leveduras selvagens suspeitas, efectuou-se a observação das estruturas morfológicas das colónias obtidas na placa B (colónia castanha rugosa, figura 8-A), placa B (colónia rosa, figura 8-B) e placa C (colónia castanha lisa, figura 8-C). As estruturas visualizadas foram documentadas, onde observou-se a presença de células arredondadas e células alongadas, como visto na figura VIII:

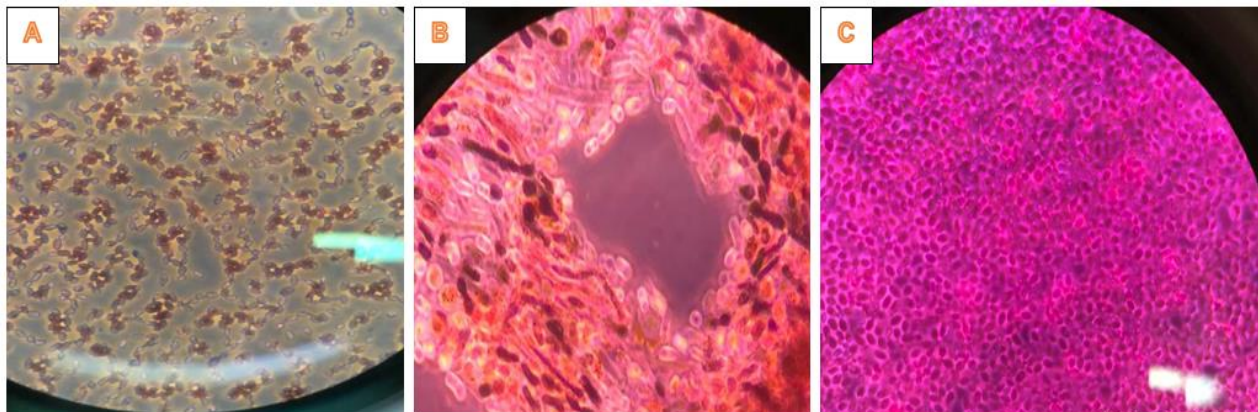


Figura VIII : Características microscópicas das colónias. A - células ovaladas; B - células cilíndricas e alongadas; C - células arredondadas.

Verificou-se a presença de células ovaladas, na figura 8-A e células arredondadas, na figura 8-C. As características observadas no presente estudo, eram similares às da levedura de cultivo descritas por Vaughan-Martini & Martini (2011), que microscopicamente, apresenta células arredondadas ou ovaladas.

De acordo com as observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000), indicaram a presença de um biótipo de levedura com células dispostas em cadeias, pertencentes à *S.cerevisae*. Considerando o estudo de Ceccato-Antonini e Parazzi, verificou-se a presença de células dispostas em cadeias, para a figura 8-A.

Para a figura 8-B constatou-se que apresentava células esféricas, cilíndricas e alongadas. Observou-se ainda que nas células cilíndricas e alongadas, a presença de células-filhas não separadas da célula-mãe, sendo que este fenómeno pode ser derivado de uma falha na separação, permanecendo desta forma unida a célula-mãe.

As características acima descritas, foram semelhantes às descritas por Walt (1984b), em seu estudo sobre a taxonomia das leveduras, onde estudou a ocorrência da levedura do género *Brettanomyces* tendo a mesma como características gerais a presença de células esferoidais, subglobosas a elipsoidais, ogivais, cilíndricas e alongadas e reproduzem-se por brotamento. Este género é encontrado em diferentes ambientes, possuindo a capacidade de sobreviver por longos períodos

de tempo e crescer em produtos em armazenamento, no caso das bebidas alcoólicas o seu desenvolvimento inicia após o processo de fermentação e durante a etapa de maturação.

As características encontradas no presente estudo, foram ainda semelhantes e sugestivas àquelas de estudos realizados por outros autores, em que a confirmação deste género foi mediante a realização de exames macroscópicos em meio líquido, testes bioquímicos como a capacidade de fermentar açúcares. A empresa pode realizar testes moleculares como a reacção em cadeia de polimerase (PCR), que permite a diferenciação a nível intra-específico, como também detecta contaminações em pequenas quantidades. A sua confirmação é essencial pois as *Brettanomyces* são produtoras de grande quantidade de ácido acético e competem com a levedura de cultivo durante o processo de fermentação (Pedro, 2014).

A ocorrência de leveduras selvagens no processo de produção cervejeira, pode ser devido à vários factores. Contudo, existem algumas formas pelas quais se pode evitar a ocorrência das mesmas, como a promoção de melhorias contínuas no processo produtivo, por forma a alcançar níveis ainda mais altos de eficiência e qualidade da cerveja produzida.

Para tal, o seguimento correcto da higienização de todos os equipamentos e do ambiente, tendo em conta o pressuposto de higienização e posterior esterilização, realizar análises microbiológicas dos equipamentos após a esterilização, das leveduras reutilizadas e do produto em cada estágio do processo de produção, são acções que desempenham um papel crucial na prevenção da contaminação por leveduras selvagens.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as respectivas discussões, conclui-se que:

- Houve o desenvolvimento da levedura selvagem no processo de produção, onde a cerveja filtrada e a cerveja antes da pasteurização no enchimento de barris, apresentaram-se como as etapas críticas de ocorrência de leveduras selvagens com uma percentagem de 26,9%.
- Macroscopicamente, existiam colónias de levedura selvagem que apresentavam características similares à levedura de cultivo e verificou-se também características sugestivas à existência de colónias rugosas.
- Microscopicamente, as colónias castanha lisa e castanha rugosa, apresentavam células arredondadas e ovaladas, respectivamente. A colónia rosa, apresentou características como células cilíndricas e alongadas e a presença de células-filhas, o que sugere a presença de levedura selvagem do género não-*Saccharomyces*, que é o caso da *Brettanomyces spp*, necessitando de mais testes para a confirmação.

8. RECOMENDAÇÕES

Mediante os principais resultados e constatações do presente estudo, foram feitas as recomendações a seguir apresentadas:

Por forma a contribuir para a melhoria do desempenho, a optimização de processos da cerveja produzida naquela unidade fabril, recomendou-se:

- Reforçar o controle microbiológico de todo o processo produtivo, identificando as demais áreas que possam contribuir para contaminação por leveduras selvagens e reforçar as condições de assepsia dos equipamentos e do ambiente por forma a minimizar os prejuízos monetários para a indústria;
- Desenvolver um plano de acção para impedir a atracção, o abrigo e o acesso dos pombos à unidade fabril.

À comunidade académico-científica, recomenda-se:

- Continuidade no desenvolvimento do estudo, que é de extrema importância para as indústrias cervejeiras, realizando análises microbiológicas em outros laboratórios, com a modificação dos procedimentos (meios e condições de incubação), por forma a verificar e comparar os resultados obtidos no presente estudo.;
- Continuidade no desenvolvimento do estudo, procurando estudar outras etapas do processo que possam ser focos de contaminação e afectar a qualidade da cerveja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A nossa voz. Jornal Interno da Cervejas de Moçambique. (2023). 3ª Edição, 4 de Abril. Disponível em: <https://heyzine.com/flip-book/5df50375b1.html> Acesso em: 04/04/2023.
- Aguirre, To.; Aragão, F.; Bellon, R. M.; Berthaud, J. e Smale, M. (2000). CG Maíce Conservação da Diversidade: Um Agricultor – Abordagem Colaborativa Cientista. Fase II. Primeiro Relatório Técnico. Centro Internacional de Melhoramento do Milho e do Trigo (CYMMYT), IDRC. D. F. 20 p.
- AmBev. (2012). Companhia de bebidas das Américas. Disponível em: <https://www.ambev.com.br/marcas/cervejas>.
- Amorim, H.V.; Lopes, M.L.; Oliveira, J.V.C.; Buckeridge, M.S.; Goldman, G.H. (2011). Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 91, p. 1267–1275.
- Back W. (2005). Brewery. In: Back, W., Ed., *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Bamforth, C. W. (2001). pH in Brewing: An Overview. *Technical Quarterly*, 38(1): 1-9.
- Bokulich N.A, Bamforth C.W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiol Mol Biol Rev*; 77(2):157-172.
- Briggs, D. E.; Boulton, C. A.; Brookes, P. A.; Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Boca Raton: CRC Press, p. 606-649.
- Carvalho, G.L. Redetec. (2007). Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Produção de Cerveja. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc=>>. Acesso: 06 de Junho de 2023.
- CDM. (2023). Disponível em: <https://cdm.co.mz/historia-cdm/>. Acesso em:04/04/2023.
- Ceccato-antonini, S.R. (2010). Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias. EdUFSCar, 105p.
- Ceccato-antonini, S.R.; Parazzi, C. (1996). Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processos de fermentação etanólica contínua. In: Congresso Nacional Da Sociedade Dos Técnicos Açucareiros Do Brasil, 6, STAB. p. 23-29.
- Della-bianca, B.E.; basso, T.O.; Stambuk, B.U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. (2013). What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology Technology*, v. 97, p. 979–991.

Dennis E. Briggs; Boulton, C. A.; Brookes P. A. and Stevens R. (2004). *Brewing: Science and practice*. Published by Woodhead Publishing Limited, CB1 6AH.

Dragone, G. Almeida e Silva, J.B. (2010). In: Venturini Filho, W.G. *Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia*, Edgard Blücher, v.1.

Feijoo, AMLC. Medidas de dispersão. (2010). In: *A pesquisa e a estatística na psicologia e na educação* [online]. Centro Edelstein de Pesquisas Sociais, pp. 23-27. ISBN: 978-85-7982- 048-9. Available from SciELO Books.

Gameiro, S. S. (2021). *Condições Higio-Sanitárias de Alguns Estabelecimentos de Restauração e Qualidade Microbiológica de Alimentos Neles Produzidos*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Lisboa. Pp. 17-18.

Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Aquilanti L, Clementi F. (2015). The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *Journal of food science*, v.80.

Habert, A.C; Borges, C.P; Nobrega, R. (2006). *Processos de Separação com Membranas*. Published by E-papers.

Hornsey, I. (2003). *A History of Beer and Brewing*. (The Royal Society of Chemistry), p.760. ISBN: 978-1-84755-002-6. Disponível em: [A History of Beer and Brewing 2004 - Hornsey PDF | PDF | Breads | Brewing \(scribd.com\)](#)

Institute of Brewing Methods of Analysis. (1997). *Recommended methods of analysis*. Vol. 2. Pp. 23-45

Jespersen, L.; Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 139-155.

Laboratório Nacional de higiene de alimentos e água – LNHA. (1997). *Manual de microbiologia alimentar*. Maputo, Moçambique: Ministério da Saúde. Pp. 17-33.

Lansing, R. (2004). Recent developments in *Brett* management and monitoring. *Wine Business Monthly*. Disponível em: [Recent Developments in Brett Management and Monitoring \(winebusiness.com\)](#)

Latorre, M. A. (2016). *Incidencia de contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad Nacional del Comahue Centro Regional Universitario Bariloche.

Lorenz, M.C.; Cutler, N.S; Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the cell*. v.11, p. 183-199.

- Matos, R.A.G. (2011). Cerveja: panorama do mercado, produção artesanal, e avaliação de aceitação e preferência. 90f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Ciências agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Mega, J. F.; N., E.; A., C. J. de. (2011). A produção de Cerveja no Brasil. Revista Citino, Brasília, v.1, n.1, p. 21-29.
- Monteiro, A. (2001). Curso Operador Cervejeiro. Companhia Brasileira de Bebidas: Goiânia. Pp. 155.
- Naves, R. F.; Fernandes, F. S.; Pinto, O. G.; Naves, P. L. F. (2010). Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. Enciclopédia Biosfera, v.6, p.1-16.
- Oliveira, A. M. (2009). *Optimização do uso da Água na indústria, O Caso de Estudo da Sociedade Central de Cervejas e Bebidas*. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Oliveira, N.A.M. (2011). Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em microbiota industrial) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Palman, C.L. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, v. 58, p. 198-203.
- Parazzi, C.; Silva, A. R.; Araujo, R. T. (2002). Avaliação de diferentes linhagens de leveduras selvagens na fermentação alcoólica. STAB. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, v. 20, n.3, p. 36-40.
- Pedro, D.N.S. (2014). Quantificação de leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera* em Vinhos de Qualidade. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto politécnico de Bragança. p. 5.
- Priest, F.G.; Campbell, I. (2003). *Brewing microbiology*. 3.ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 399 p.
- Ribeiro, B. D.; Pereira, K. S.; Nascimento, R. P.; Coelho, M. A. Z. (2018). *Microbiologia industrial: Alimentos*. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Rocha, P.P.V. (2015). Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biológica, Universidade do Minho. 91 f.
- Sakamoto K., Konings W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*; 89:105–124.

Silva, D. & T.; J. & Jr, R. & S.; T. & G.; M. & G, E. (2019). Isolamento e Identificação de Fungos em Fezes de Pombos nas Dependências da Universidade de Gurupi (UNIRG). *Amazônia Science & Health*. 7. 79-86. 10.18606/2318-1419/amazonia.sci.health.v7n2p79-86.

Silva-Filho, E.A. (2003). Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas a seleção de linhagens promissoras para expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de Doutorado, UFPE- Biologia de Fungos. 120p.

Siqueira, P. B. (2007). Estudo da cinética bioquímica e sensorial de diferentes tipos de cervejas brasileiras. [Tese de mestrado]: Universidade Estadual de Campinas.

Souza, R. S.; Faveiro, D. M. (2017). Correlação entre a redução da carga microbológica e a inativação da enzima invertase na etapa de pasteurização da cerveja. *Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias*, v.2, n.1, p.15-15.

Sun, X., Liu, L., Zhao, Y., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., & Zhan, J. (2016). Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry*, 192, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.107>.

Taylor, G.T. and Marsh, A.S. (1984) *Journal of the Institute of Brewing*. Vol.90, pp.134-145.

Teixeira, J. R.F. (1993). Alcoolismo: doença no mundo do direito. Pp. 23.

The General Certificate in Brewing (GCB). (2016). Learning Material © Institute of Brewing and Distilling.

Tschope E.C (2001). *Microcervejarias e cervejarias: A história, a Arte e a Tecnologia*. Editora e comunicação Lda. 1 ed.

Vaughan, A., O'Sullivan, T., van Sinderen, D., 2005: Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. *J. Inst. Brew.* 111 (4): 355–371.

Vaughan-martini, A.; Martini, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)*. (2011). In: Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5ª ed. Elsevier, v. 2, p. 733–746.

Venturini, F., WG; Cereda, MP. Cerveja. In: Almeida lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001). *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos vol 4*.

Viana, R. (2021). Métodos de controlo de qualidade nas diferentes etapas de produção de cervejas artesanais. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Vieira, D. A. de P.; Fernandes, N. C. de A. Q. (2012). *Microbiologia Aplicada – Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria*, pp.90.

Walt, J. P. Van der. (1984b). Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts: genus 2: *Brettanomyces* Kufferath *et* van Laer. In: Kreger-van RIJ. N. J. W. (Ed.). *The Yeast a taxonomic study*, Elsevier Science, p. 562-576.