UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
NICOLLY SOUZA REMOR SILVA

# ANÁLISE DO REUSO DE LEVEDURAS NO PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJAS ARTESANAIS

Tubarão
2020

**NICOLLY SOUZA REMOR SILVA**

# ANÁLISE DO REUSO DE LEVEDURAS NO PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJAS ARTESANAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Alessandro de Oliveira Limas, Ms.

Tubarão

2020

**NICOLLY SOUZA REMOR SILVA**

# ANÁLISE DO REUSO DE LEVEDURAS NO PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJAS ARTESANAIS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 29 de julho de 2020.

_____

Professor e orientador Alessandro de Oliveira Limas, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

_____

Prof. Camila da Silva Gonçalves, Drª.
Universidade do Sul de Santa Catarina

_____

Prof. Francielen Kuball Silva, Drª.
Universidade do Sul de Santa Catarina

_____

Prof. Jucilene Feltrin, Drª.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Dedico este trabalho a todos aqueles que amo e que estiveram presentes em minha vida, me apoiando e me incentivando a crescer.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Magda e Jayson, por serem a minha base e me apoiarem incondicionalmente. Por todo o incentivo e amor ao longo dos anos e por serem meu porto seguro em todos os momentos.

Ao meu namorado Luandro, por estar sempre ao meu lado, especialmente nos momentos mais difíceis e sempre me incentivar a melhorar.

A toda minha família e amigos pelo suporte emocional e incondicional apoio.

A todos os professores que passaram pela minha jornada acadêmica e foram minhas fontes de inspiração, e principalmente por todos os ensinamentos que tornaram possível esse trabalho.

A todos que fizeram parte dessa jornada, muito obrigada!

## RESUMO

A cerveja é uma bebida fermentada preparada a partir do malte de cevada, água, lúpulo e levedura, tendo sua receita permanecido inalterada por séculos; obtida pela fermentação alcoólica, que consiste na quebra de açúcares fermentáveis por micro-organismos unicelulares – leveduras do gênero *Saccharomyces* – para obter-se álcool e gás carbônico. Nos últimos anos, o mercado de cervejas artesanais vem se desenvolvendo cada vez mais no país, chegando a apresentar um crescimento anual médio de 37,8% no estado de Santa Catarina, e, com isso, microcervejarias necessitam de soluções que reduzam os custos e gastos dos seus processos produtivos. Nesse cenário, a reutilização das leveduras se mostra como uma alternativa promissora para esses empreendedores, desde que certos parâmetros de qualidade sejam acompanhados. Assim, o presente trabalho teve como objetivo, analisar o reuso de leveduras no processo produtivo de cervejas artesanais dos tipos Pilsen, Pale Ale e IPA, com e sem reaproveitamento das leveduras, em relação aos parâmetros de viabilidade, vitalidade e teor alcoólico ao longo das reutilizações, de forma a acompanhar seu comportamento. Para isso, após a primeira fermentação, foram aplicados nas leveduras os métodos de azul de metileno básico, poder de acidificação do meio e o método do título alcoométrico volumétrico. O método de azul de metileno básico mostrou resultados variantes de viabilidade ao longo dos ciclos, necessitando-se assim de mais estudos voltados para as linhagens de leveduras utilizadas no processo, de modo a compreender melhor seu comportamento específico. O método do poder de acidificação do meio indicou uma queda na vitalidade das células em relação à fermentação original, mas durante os reusos pôde-se observar uma estabilidade nos resultados. Por fim, o teor alcoólico sofreu um decaimento ao longo das fermentações, mas que não apresenta valores abaixo do limite esperado se o número de fermentações não passar de três. A partir desses estudos foi possível concluir que a reutilização por até 3 ciclos se mostra aplicável, desde que haja um acompanhamento constante dos parâmetros analisados. Com os métodos estudados, foram elaborados os POPs (Procedimentos Operacionais Padrões), de modo a atender as exigências sanitárias e servir de auxílio para a aplicação prática dos métodos no dia-a-dia da produção na empresa. Para continuidade dos estudos, em trabalhos futuros é importante estabelecer uma metodologia para análise e detecção de micro-organismos deteriorantes gram+ e gram-, e observar se o reuso das leveduras acarreta maior grau de contaminação.



Palavras-chave: Cerveja artesanal. Levedura. Reaproveitamento.

## ABSTRACT

Beer is a beverage produced from malted barley, water, hops, and yeast, having its recipe been unchanged for centuries; obtained from alcoholic fermentation, which consists of breaking down the fermentable sugars by single-celled organisms – yeasts from Saccharomyces genus – to produce alcohol and carbon dioxide. In the last few years, the craft beer market has been growing increasingly, reaching an average annual growth of 37.8% in the state of Santa Catarina, and so the microentrepreneurs need solutions that reduce their processes' costs and expenses. In this scenario, the yeast's reuse is a promising alternative to those entrepreneurs as long as some quality parameters are followed. Thus, the present work aimed to analyse the reuse of yeast in the productive process of Pilsen, Pale Ale and IPA craft beers, concerning the viability, vitality, and alcohol content parameters over the reuses, to monitor their behaviour. For this, after the first fermentation, the basic methylene blue staining method, the acidification power (AP) test and the volumetric strength method were applied on the yeasts. The basic methylene blue staining method showed varying results of cell's viability over the cycles, showing the need for further research on the yeast strains used in the process, to better understand their specific behaviour. The acidification power test indicated a drop in the vitality of the cells when compared to the original fermentation, but over the reuses, it was possible to observe a stability pattern in the results. Finally, the alcohol content has decreased throughout the fermentation, but it does not present values below the expected limit if the process does not exceed three fermentations with reuse. From these studies, it was possible to conclude that the reuse for up to 3 cycles is applicable, if there is constant monitoring of the analysed parameters. With the studied methods, SOPs (Standard Operating Procedure) were elaborated, to meet the sanitary requirements and serve as an aid for the practical application of the methods in the daily production of the company. In order to continue the studies, in future works, it's important to establish a methodology for detection of gram-positive and gram-negative deteriorating microorganisms and to observe if the reuse of yeasts increases the chance of contamination.



Keywords: Craft beer. Yeast. Reuse.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo produtivo de Lagers e Ales ..... 14
Figura 2 – Desenho da malha da Câmara de Neubauer..... 18
Figura 3 – Sistema de diluições seriadas de uma amostra..... 21
Figura 4 - Método de contagem das células em zigue-zague ..... 22

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Fases observadas na curva de crescimento da concentração celular no processo de fermentação alcoólica ..... 15
Gráfico 2 – Porcentagem da viabilidade da levedura estudada, medida por quatro gerações. *Aumento da viabilidade estatisticamente significante (p<0,05) quando comparado à primeira geração. ..... 25
Gráfico 3 – Poder de acidificação de uma levedura cervejeira, indicando a vitalidade, medida ao longo de quatro gerações. *Aumento de vitalidade estatisticamente significante (p<0,05) quando comparado à primeira geração. ..... 27
Gráfico 4 – Simulação do comportamento do teor alcoólico esperado ao longo das reutilizações das leveduras na produção de uma Pilsen. ..... 28
Gráfico 5 – Simulação do comportamento do teor alcoólico esperado ao longo das reutilizações das leveduras na produção de cervejas tipo Ale. ..... 29

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... **11**
1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA ..... 12
1.2 OBJETIVOS ..... 13
**1.2.1 Objetivo Geral** ..... **13**
**1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS** ..... 13
**2 REFERENCIAL TEÓRICO** ..... **14**
2.1 PROCESSO PRODUTIVO DA CERVEJA ..... 14
**2.1.1 Fermentação** ..... **14**
2.2 LEVEDURAS E OS TIPOS DE CERVEJA ..... 16
2.3 CONTROLE DE QUALIDADE ..... 16
**2.3.1 Método de contagem de azul de metileno básico** ..... **17**
**2.3.2 Método do poder de acidificação do meio** ..... **18**
**2.3.3 Procedimento Operacional Padrão** ..... **18**
**3 MÉTODOS** ..... **20**
3.1 PREPARAÇÃO DAS LEVEDURAS ..... 20
3.2 PREPARAÇÃO DAS LEVEDURAS PARA REUTILIZAÇÃO APÓS A PRIMEIRA FERMENTAÇÃO ..... 20
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE AZUL DE METILENO BÁSICO 21
3.4 TESTE DE VITALIDADE PELO MÉTODO DO PODER DE ACIDIFICAÇÃO DO MEIO ..... 22
3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO ..... 23
3.6 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO ..... 23
**4 RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... **25**
4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE ..... 25
4.2 TESTE DE VITALIDADE ..... 26
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO ..... 27
4.4 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO ..... 29
**5 CONCLUSÃO** ..... **30**
**REFERÊNCIAS** ..... **31**
**APÊNDICES** ..... **34**
**APÊNDICE A – POP 001 (Análise da viabilidade das leveduras reutilizadas)** ..... **35**
**APÊNDICE B – POP 002 (Análise da vitalidade de leveduras reutilizadas)** ..... **37**

**APÊNDICE C – POP 003 (Determinação do teor alcoólico)..... 39**
**ANEXOS ..... 41**
**ANEXO A – Relação de estados pelo número de cervejarias, ano e crescimento médio. 42**
**ANEXO B – Ficha técnica da levedura SafAle™ S-04 ..... 43**
**ANEXO C – Ficha técnica da levedura SafAle™ US-05 ..... 44**
**ANEXO D – Ficha técnica da levedura SafLager™ W-34/70 ..... 45**
**ANEXO E – Comparação das análises de viabilidade e vitalidade de cervejarias de Porto Alegre ..... 46**

# 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é descrita como uma bebida obtida pela fermentação alcoólica, a partir do malte de cevada, água, levedura e lúpulo, podendo-se ainda adicionar outros cereais e adjuntos à sua fabricação. A história desta bebida remonta há mais de 6.000 mil anos, de acordo com registros históricos, tendo sua origem nas regiões da Suméria, Babilônia e Egito (Filho, 2016). No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido pela coroa portuguesa no século XIX, durante sua permanência no país (GAUTO e ROSA, 2011 apud BITTENCOURT, 2018).

O mercado cervejeiro vem mostrando sinais de crescimento nos últimos anos no Brasil, e apresenta ainda grandes perspectivas de desenvolvimento, de acordo com os dados divulgados pelo Mapa (2020). No ano de 2019 foi alcançado o número de 1.209 cervejarias registradas no país, com maior concentração na região Sul-Sudeste, onde se encontram mais de 80% desse valor. Santa Catarina ocupa o 4º lugar do ranking, com 148 estabelecimentos e um crescimento anual médio de 37,8% (Tabela apresentada no Anexo A).

Dentro desse cenário, a cerveja artesanal ganha cada vez mais espaço devido à sua alta qualidade, o que atrai muitos empreendedores. O crescimento desse mercado deve ser exponencial nos próximos anos e a expectativa é que respondam por 2% do negócio de cerveja no país em até uma década (BARBOSA, 2014 apud SUHRE, 2014).

Os métodos de produção desses micro empreendedores se baseiam na biotecnologia tradicional, que segue as etapas de escolha do estilo de cerveja a ser produzida e elaboração da receita, escolha da matéria-prima, malteação, brasagem, tratamento do mosto, fermentação, maturação, filtração e engarrafamento do produto final. Os microempreendedores precisam se manter atentos às possibilidades de redução de custos e gastos, e uma das alternativas é a reutilização das próprias leveduras em consecutivos processos (Bittencourt, 2018).

As leveduras são microorganismos unicelulares, que metabolizam os açúcares fermentáveis presentes no mosto cervejeiro, produzindo álcool e gás carbônico. Na produção de cervejas são usadas leveduras pertencentes ao gênero Saccharomyces, organismos sensíveis à temperatura e ao pH do meio, e fundamentais para o aroma final do produto (BITENCOURT, 2018; OLIVEIRA, 2011).

Dessa maneira, neste trabalho uma série de testes será estudada para a avaliação das leveduras reutilizadas no processo produtivo de uma microcervejaria, de modo que seja possível avaliar seu desempenho.

## 1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

Cada vez mais há uma crescente preocupação das empresas no que se refere à responsabilidade ambiental. Nesse contexto, o conceito de "Produção + Limpa" traz uma visão ampla de gerenciamento que visa reduzir o impacto ambiental em todas as etapas produtivas, desde uso de água e energia até o destino consciente dos resíduos ao final do processo. A indústria cervejeira apresenta muitas possibilidades de aplicação do conceito P+L. Por gerar muitos resíduos da produção, a busca de soluções viáveis para esses rejeitos é uma importante parte do processo, sendo que seu reaproveitamento pode trazer tanto benefícios ambientais como econômicos.

As leveduras – microrganismos responsáveis pela fermentação do mosto – são as responsáveis pela produção de álcool e gás carbônico, e apresentam grande importância no sabor e aroma final do produto. Ao fim do processo, o excedente desse componente é descartado junto aos demais efluentes, possuindo um alto potencial poluidor, devido a fatores como carga orgânica e teor de sólidos. Esses resíduos, porém, se destacam pela sua grande capacidade de reaproveitamento. De acordo com Santos e Ribeiro (2005), a levedura possui alta carga orgânica (DBO equivalente a 120.000 a 140.000 mg/L) e grande valor nutricional, podendo dessa forma ser vendida para indústrias de alimentos ou ainda, opção esta que traria economia para o processo, a possibilidade de sua reutilização no processo produtivo da própria cervejaria.

Há um constante cuidado na produção dessas bebidas no que se refere à qualidade do produto final, desde características sensoriais quanto teor alcoólico. No caso das leveduras, precisa-se ter um cuidado ainda maior quando tratamos do seu reuso no processo, sendo necessário manter um rigoroso controle durante a fermentação, de modo a manter um padrão de células metabolicamente ativas e saudáveis. Para se ter um maior controle, deve-se fazer uso de ferramentas que auxiliem a manter uma padronização do processo. Para isso, podemos contar com os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs), documentos que descrevem de forma uniformizada os passos para se efetuar determinada operação na indústria.

Assim, propõe-se a seguinte questão: **por quantos ciclos é possível reutilizar as leveduras no processo produtivo de cervejas artesanais, de forma a se obter indicadores de desempenho aceitáveis na fermentação?**

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Analisar o reuso de leveduras no processo produtivo de cervejas artesanais dos tipos Pilsen, Pale Ale e IPA em uma microcervejaria do sul de Santa Catarina. Foi analisado esse reuso para a produção de cervejas dos tipos Pilsen, Pale Ale e IPA com e sem reaproveitamento das leveduras.

### 1.2.2. Objetivos específicos

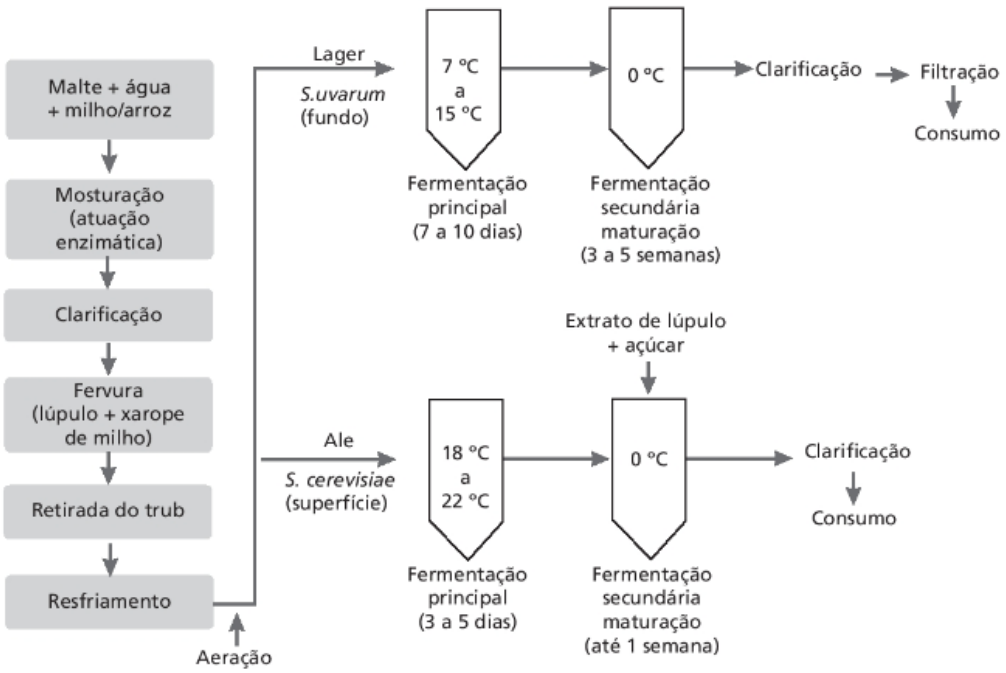
- Aplicar o método do azul de metileno básico para avaliar a viabilidade das células ao longo do seu reuso no processo;
- Executar o método do poder de acidificação do meio para determinação da vitalidade das leveduras;
- Determinar o teor alcoólico das cervejas produzidas em cada etapa, com e sem o reuso de leveduras;
- Elaborar POPs dos métodos estudados para padronizar os procedimentos.

# 2 REFERENCIAL TEÓRICO

## 2.1 PROCESSO PRODUTIVO DA CERVEJA

A cerveja, uma bebida fermentada existente há mais de 6.000 anos, conta com um processo produtivo que tem permanecido quase que inalterado há séculos. O processo produtivo tradicional pode ser dividido em oito operações essenciais: moagem do malte; mosturação ou tratamento enzimático do mosto; filtração do mosto; fervura do mosto; tratamento do mosto (remoção do precipitado, resfriamento e aeração); fermentação; maturação e clarificação (FILHO, 2016). Esse processo é ilustrado no fluxograma abaixo:

Figura 1 – Processo produtivo de Lagers e Ales



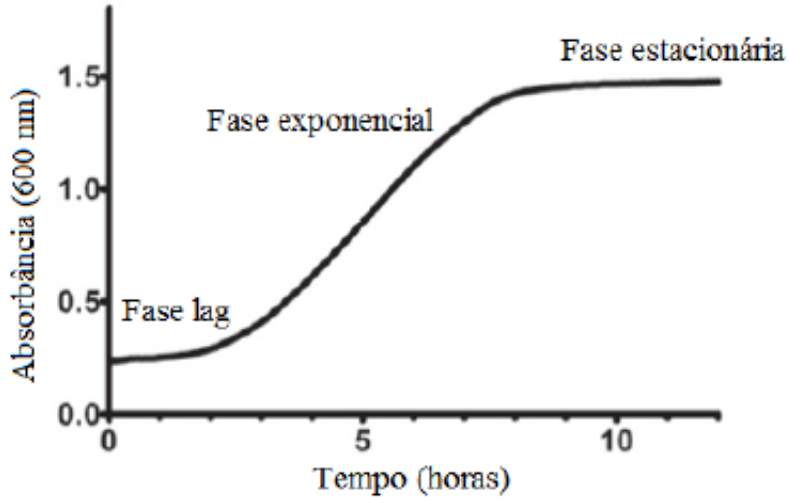

Fonte: Russel (1994 apud Filho, 2016).

### 2.1.1 Fermentação

O processo fermentativo consiste no ponto central para produção de qualquer bebida alcoólica, possuindo como principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura, sob condições anaeróbicas (FILHO, 2016).

O processo num todo pode ser dividido nas etapas de adaptação (lag), exponencial (log) e estacionária

Gráfico 1 – Fases observadas na curva de crescimento da concentração celular no processo de fermentação alcoólica




Fonte: Suhre (2014).

Inicialmente, no mosto cervejeiro, as leveduras passam por um período de adaptação ao ambiente (fase lag), dando assim início ao ciclo celular. É uma fase importante para obtenção de leveduras saudáveis, sendo o controle de temperatura e da taxa de inoculação fundamentais. Temperaturas mais altas resultam em mais células e a rapidez do crescimento pode gerar precursores de aromas indesejáveis. Já as altas taxas de inoculação (promovendo uma rápida fermentação e diminuição da fase lag) ou baixa (promovendo um aumento da fase lag) diminuem a vitalidade da levedura (WHITE e ZAINSHEFF, 2010 apud SUHRE, 2014).

Durante a fase exponencial, a concentração celular pode aumentar até cinco vezes o seu valor inicial. O crescimento celular é acompanhado pela formação de até 45g/L de etanol e 42g/L de CO2. A conversão de açúcares em etanol é de aproximadamente 85% da conversão teórica. A diferença para conversão teórica representa a proporção de açúcares do mosto utilizados para formação de biomassa e de outros metabólitos. O rendimento do dióxido de carbono é ligeiramente menor do que aquele do etanol, dado que parte do CO2 é fixado pela levedura em reações de carboxilação (FILHO, 2016).

Por fim, na fase estacionária o crescimento da população cessa, a atividade fermentativa diminui e as leveduras reabsorvem grande parte dos compostos de aroma indesejáveis, equilibrando assim o aroma final (PALMER, 2006 apud SUHRE, 2014).

## 2.2 LEVEDURAS E OS TIPOS DE CERVEJA

As características de sabor e aroma de qualquer cerveja são determinadas majoritariamente pelo tipo de levedura utilizada. As leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica pertencem ao gênero Saccharomyces, e embora existam centenas de espécies de levedos, a maior parte não é apropriada para a produção da bebida. Os mais popularmente usados são as espécies Saccharomyces cerevisiae (Ale) – que produz uma camada de espuma cremosa na superfície dos tanques, e por isso é conhecida como levedura de alta fermentação – e Saccharomyces pastorianus (Lager) – cuja concentração fica no fundo do tanque, com pouca espuma na superfície, sendo então conhecida por levedura de baixa fermentação (FILHO, 2016; MORADO, 2017).

A partir disso, classificam-se as cervejas como Ale (fermentação de superfície), Lager (fermentação de fundo) e as cervejas de fermentação selvagem. Nas cervejas de fermentação de superfície (Ale), a fermentação acontece em temperaturas entre 15 ºC e 25 ºC, de três a cinco dias. Elas costumam ser mais densas, mais escuras e de paladar mais acentuado que as Lager, devido a maior quantidade de ésteres e outros compostos aromáticos gerados (principalmente pela temperatura da fermentação). As cervejas de fermentação de fundo (Lager) apresentam uma fermentação a temperaturas entre 9 ºC e 15 ºC, durante dez a quatorze dias. Essa baixa fermentação leva a cervejas de aromas menos frutados e condimentados, e que tendem a ser mais douradas, leves e brilhantes (MORADO, 2017; VIDGREN et al., 2010 apud SUHRE, 2014).

## 2.3 CONTROLE DE QUALIDADE

Para garantir a qualidade da cerveja, é extremamente necessário que se mantenha um rigoroso controle sobre a fermentação, ficando atento a todos os fatores relacionados à levedura escolhida para o processo. Isso porque, para se obter um produto que atenda aos padrões mínimos de qualidade, a fermentação deve ser realizada utilizando leveduras viáveis, metabolicamente ativas e em um meio livre de contaminação de bactérias que podem afetar negativamente o sabor final da cerveja produzida (SUHRE, 2014).

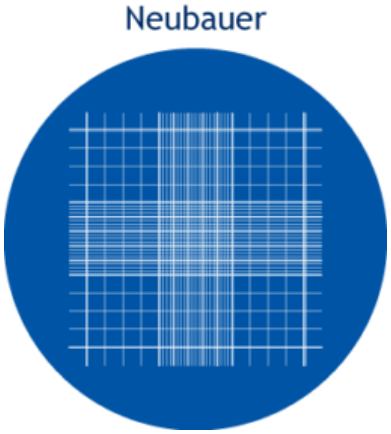
### 2.3.1 Método de contagem de azul de metileno básico

Para garantir uma produção de cervejas artesanais confiável e de alta qualidade, as leveduras usadas no processo precisam apresentar boas taxas de viabilidade. A viabilidade, no contexto cervejeiro, é definida como a capacidade da célula de crescer e se replicar (BENDIAK & SMART 2000 apud MORAES, 2017). De acordo com Filho (2016), o número inicial de células viáveis deve estar na faixa de 6x106 células/mL. Quanto maior o número de leveduras fisiologicamente competentes na biomassa, maior será a taxa de produção de álcool ou de atenuação, sendo assim essenciais os ensaios de viabilidade na avaliação da qualidade das leveduras (SUHRE, 2014).

Dessa maneira, um ensaio frequentemente aplicado na rotina das pequenas e grandes fábricas é o teste do azul de metileno, onde se estima a percentagem de células viáveis pela ausência ou presença do corante no meio intracelular visualizado por microscópio. Esse método possibilita níveis de sensibilidade, rapidez e simplicidade satisfatórios nessas medições, o que é essencial para a boa manutenção dos processos fermentativos (SAMI et al., 1994). O procedimento em questão consiste na mistura de partes iguais da suspensão de leveduras diluída e da solução corante azul de metileno. Todas as células com alta atividade fisiológica permanecem sem a cor azul enquanto as células não viáveis apresentam-se coloridas com esta cor. A porcentagem ou o número de células viáveis é determinado transferindo-se com uma pipeta de Pasteur a amostra para câmara de Neubauer (CECCATO-ANTONINI, 2004 apud MONGELO, 2012).

As câmaras de contagem são dispositivos que consistem geralmente em uma lâmina grossa de uso microscópico com uma profundidade específica para depósito da amostra. Seu centro é formado por duas câmaras nas quais são gravadas linhas divididas em quadrantes de dimensões conhecidas, chamadas de malhas de leitura. Como há a padronização destes quadrantes é possível visualizar a amostra ao microscópio e assim realizar a contagem determinando o número de células presentes naquela área determinada (KASVI, 2017).

Figura 2 – Desenho da malha da Câmara de Neubauer




Fonte: Kasvi (2017).

### 2.3.2 Método do poder de acidificação do meio

A acidificação do meio por leveduras ou bactérias ácido láticas, suspensas em um novo meio ou alimentadas com um substrato, como a glicose, é um ótimo indicador em um processo fermentativo, como a produção de cerveja. O teste do poder de acidificação (PA) consiste em um método rápido e fácil de avaliar a habilidade das células de executar uma fermentação satisfatória, e tem sido muito usado ao longo dos anos como critério de rejeição na avaliação da qualidade das culturas mãe (GABRIEL *et al*., 2008).

Em um estudo de Siegler et al (1981), foi apontado que durante a fermentação, a capacidade das leveduras de acidificar o meio pode ser resultado da produção de $CO_2$ e da extrusão de H+ pela proteína PMA1 ($H^+$-ATPase da membrana de S. cerevisiae). Dessa forma, o método do poder de acidificação se mostra um meio eficiente e simples de avaliar a vitalidade das leveduras cervejeiras (SUHRE, 2014).

O teste funciona medindo a habilidade da população das células de manter diferentes concentrações de íons $H^+$ intra e extracelulares quando dispostas em água destilada, além de também medir as mudanças nessas concentrações induzidas pela presença de glicose (KARA et al., 1988).

### 2.3.3 Procedimento Operacional Padrão

A segurança alimentar é um parâmetro de importância indiscutível quando se fala da indústria alimentícia. O estudo e aplicação da qualidade higiênico-sanitária têm sido cada vez

mais abrangente, e o uso de técnicas padronizadas é de grande auxílio na execução de testes e procedimentos (SÃO JOSÉ et al., 2011).

Para auxiliar nessa tarefa, faz-se uso do POP, ou Procedimento Operacional Padrão, que consiste em um documento exigido pela Vigilância Sanitária, que descreve as operações a serem executadas em estabelecimentos que trabalham com serviços de alimentação. Eles são descritos pela RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, que dispõe sobre a regulamentação técnica para estes documentos (ANVISA, 2002).

# 3 MÉTODOS

O objetivo desse estudo será analisar todas as cervejas produzidas pela empresa, sendo elas dos seguintes tipos: Pilsen, Pale Ale e IPA. Foram utilizadas as leveduras Saccharomyces cerevisiae linhagens S-04 e US-05 na produção das cervejas Pale Ale e IPA, respectivamente, e Saccharomyces pastorianus linhagem W-34/70 na produção da Pilsen.

## 3.1 PREPARAÇÃO DAS LEVEDURAS

Inicialmente as amostras foram preparadas seguindo a orientação de reidratação do fabricante, conforme segue:

Polvilhar a levedura em no mínimo 10 vezes o seu peso em água estéril ou mosto de 25 a 29°C (77°F a 84°F) – no caso das leveduras S-04 e US-05 – e de 21 a 25°C (70°F a 77°F) – no caso do W-34/70. Deixar descansando por 15 a 30 minutos. Gentilmente mexer por 30 minutos, e dosar o creme resultante no tanque de fermentação. Alternativamente, dose a levedura diretamente no tanque de fermentação desde que a temperatura do mosto esteja acima de 20°C (68°F). Polvilhe progressivamente a levedura seca no mosto certificando-se que a levedura cubra toda a superfície do mosto disponível para evitar grumos. Deixar por 30 minutos, para então misturar o mosto usando aeração ou pela adição de mosto (FERMENTIS, 2017).

As fichas completas contendo os dados das leveduras utilizadas encontra-se nos Anexos B, C e D no final deste relatório.

Foi feita a escolha de reutilizar as leveduras em mais três fermentações, respeitando o que foi sugerido por Filho (2010), que aponta uma viabilidade satisfatória na faixa máxima de 4-6 ciclos.

## 3.2 PREPARAÇÃO DAS LEVEDURAS PARA REUTILIZAÇÃO APÓS A PRIMEIRA FERMENTAÇÃO

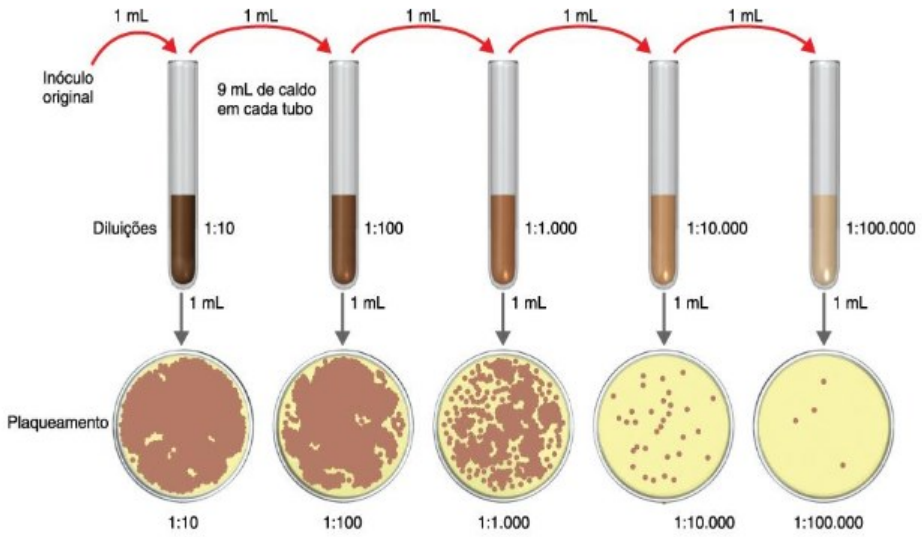
De acordo com a metodologia proposta por Melo et al. (2017), após a primeira fermentação, as leveduras utilizadas são coletadas do fundo do fermentador, utilizando-se recipientes sanitizados com álcool 70º. Essas leveduras passam por um processo de lavagem, que consiste na adição de água destilada, e coleta em um recipiente sanitizado. Esse recipiente permanece então em repouso por 3 horas a temperatura ambiente para precipitação de impurezas e leveduras mortas. Após esse período, o sobrenadante – que consiste em leveduras

viáveis – é retirado e colocado em um novo recipiente, onde ficará em repouso novamente, agora por 24 horas a 4ºC.

## 3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE AZUL DE METILENO BÁSICO

Antes de proceder com o método, de forma que seja viável realizar a contagem em placas, é necessário fazer uma série de diluições para que seja possível uma visualização mais clara e precisa das células no microscópio. Nas diluições seriadas, o inóculo original é diluído em uma série de tubos de diluições. Nesse caso, cada tubo de diluição subsequente tem apenas um décimo do número de células do tubo anterior (TORTORA et al., 2011).

Figura 3 – Sistema de diluições seriadas de uma amostra



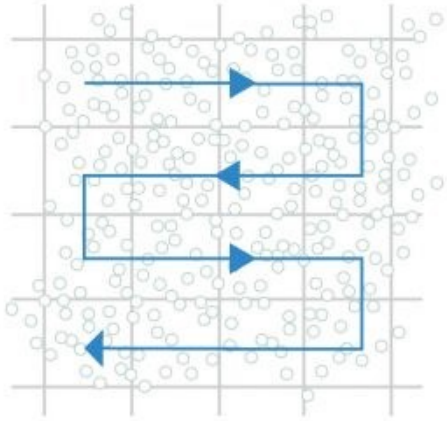

Fonte: Tortora et al. (2011).

Seguindo o método proposto por Sami et al. (1994), deve-se começar preparando uma solução padrão, dissolvendo-se azul de metileno em água destilada, de modo a atingir a concentração de 0,1% (p/v). Para preparar a solução de coloração, a solução padrão é diluída 10x em um tampão de glicina 0,1M, em um pH equivalente a 10,6. A solução de coloração é então misturada em uma quantidade igual à da suspensão celular (amostra de leveduras), e incubada a 25ºC por 15 minutos.

Uma alíquota (1 mL) dessa solução deve então ser analisada em câmara de Neubauer, onde é feita a contagem com o auxílio de um microscópio, que permite uma clara visualização da malha e dos quadrantes. As marcações dos quadrantes têm dimensões distintas, permitindo que sejam realizadas contagens de células de tamanhos diferentes, grandes ou pequenas. Por ser muito fácil se perder nessa contagem, existem algumas técnicas de como efetuar este

procedimento, como realizar a contagem em zigue-zague (KASVI, 2017), de acordo com a Figura 4, mostrada abaixo:

Figura 4 - Método de contagem das células em zigue-zague



Fonte: Kasvi (2017).

Para o cálculo percentual da viabilidade, será usada a fórmula (1), descrita por Suhre (2014):

$$Viabilidade(\%) = \frac{\sum_{i \geq 150} t_c - \sum cm}{\sum_{i>150} t_c \times 100} \qquad (1)$$

Onde $\Sigma_{i \geq 150}\ tc$ se refere ao somatório do número total de células contadas em cada quadrante (com número maior ou igual a 150) e Σcm corresponde ao somatório do valor contabilizado de células inviáveis (ou seja, as leveduras que apresentaram cor azul).

## 3.4 TESTE DE VITALIDADE PELO MÉTODO DO PODER DE ACIDIFICAÇÃO DO MEIO

Com base no estudo realizado por Moraes (2017), a metodologia escolhida para o teste de vitalidade da cultura de leveduras foi originalmente descrita por Kara et al. (1988).

Inicialmente, é coletada uma amostra das leveduras e feita a contagem em uma câmara de Neubauer para determinação da concentração de células (conforme foi descrito no item 3.3 desse trabalho). A concentração (UFC/mL) é calculada pela fórmula (2):

$$C = Nc \times 10.000 \times 10.000 \qquad (2)$$

Onde *C* indica a concentração das células, *Nc* representa o número de células registrado na contagem; o primeiro termo 10.000 é relativo à câmara de Neubauer, enquanto o segundo se refere ao fator de diluição.

Seguindo com o método, a amostra deve então ser centrifugada a 10.000rpm por 3 minutos. O precipitado é lavado três vezes com água destilada, e novamente centrifugado, sendo então disperso em água destilada e o pH é regulado para o valor de 6,3. A partir disso, o valor do pH deve ser acompanhado por 10 minutos; é feita uma segunda medição e então adiciona-se uma solução de glicose 50% p/v, e o pH é acompanhado por mais 10 minutos. O procedimento deve ser realizado com agitação magnética para evitar a sedimentação das células.

Por fim, o poder de acidificação é calculado pela fórmula (3):

$$PA = (pH_0 - pH_{10}) + (pH_{10} - pH_{20}) \qquad (3)$$

Onde

$pH_0$ = pH inicial;

$pH_{10}$ = pH após 10 minutos de experimento;

$pH_{20}$ = pH após 20 minutos de experimento, ou 10 minutos após adição de glicose.

Segundo Kara et al. (1988), o método é reprodutível (DP da média =0,61%) e não é afetado por variações de ±11% no peso.

## 3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO

De acordo com Bitencourt (2018), o teor alcoólico da cerveja pode ser determinado através do método do título alcoométrico volumétrico, que usa as medidas de densidade. O cálculo é feito utilizando-se a fórmula (4), apresentada abaixo:

$$\%ABV = (OG - FG) \times 131 \qquad (4)$$

Sendo:

% ABV: (Alcohol by Volume) Teor de álcool presente na mistura (v/v)

OG: Densidade relativa original, medida após a fervura.

FG: Densidade relativa final, medida do mosto fermentado.

Para esse teste, são adicionados 100mL das amostras da cerveja produzida em uma proveta, e com o auxílio de um densímetro é feita a leitura do valor da densidade em cada etapa.

## 3.6 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

A aplicação dos POPs na empresa contribui para a correta aplicação dos métodos propostos, garantindo assim as condições de higiene e a qualidade esperados do processo, evitando assim possíveis erros.

Para elaboração dos POPs foi utilizado o modelo cedido pela empresa, que conta com “objetivo”, “campo de aplicação”, “material necessário”, “descrição, frequência e responsabilidade”, “procedimento”, “registro” e “referências”.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

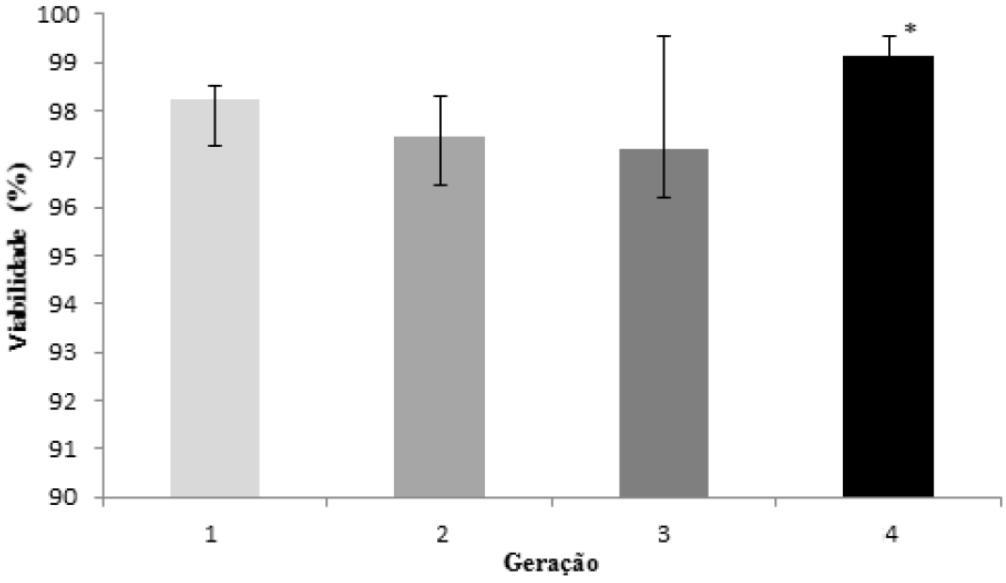
Devido a paralisação decorrente do Decreto Estadual nº 515, de 17 de março de 2020 (e sucessivas prorrogações), que estabeleceu a quarentena e as restrições as atividades presenciais, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2, não foi possível finalizar as atividades previstas para o estágio presencial. Dessa forma, são aqui apresentados os resultados esperados baseados em pesquisa bibliográfica referente ao tema da linha de pesquisa.

## 4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE

O acompanhamento da vitalidade das leveduras se faz indispensável para manutenção da qualidade da cerveja. Vilches (2012) realizou um estudo na otimização da reutilização das leveduras, onde as células foram utilizadas em 10 fermentações consecutivas. Foi observado que as células apresentam um padrão de aumento da viabilidade na segunda, quinta e sexta reutilizações, seguido da sua diminuição no terceiro, quarto, sétimo e oitavo reusos.

Suhre (2014) analisou apenas quatro gerações da levedura (o que significa que as leveduras foram reutilizadas em 3 fermentações), onde foi perceptível uma diminuição seguida de um aumento no parâmetro estudado, conforme é possível observar no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Porcentagem da viabilidade da levedura estudada, medida por quatro gerações. *Aumento da viabilidade estatisticamente significante ($p<0,05$) quando comparado à primeira geração.




Fonte: Suhre (2014).

Na segunda parte do estudo realizado por Suhre (2014), foi feita uma comparação da viabilidade e vitalidade com amostras de diferentes cervejarias do Rio Grande do Sul, e dentre essas amostras havia ainda variações na quantidade dos reusos das células (tabela apresentada no Anexo E). Nesse estudo, é possível confirmar esse padrão oscilante ao observar altas taxas de viabilidade em números avançados de reutilizações, e números menores em reusos intermediários.

Há ainda necessidade de mais estudos realizados de forma específica na levedura utilizada no processo em questão, para total compreensão do padrão de seus comportamentos na reutilização ao longo das fermentações.

## 4.2 TESTE DE VITALIDADE

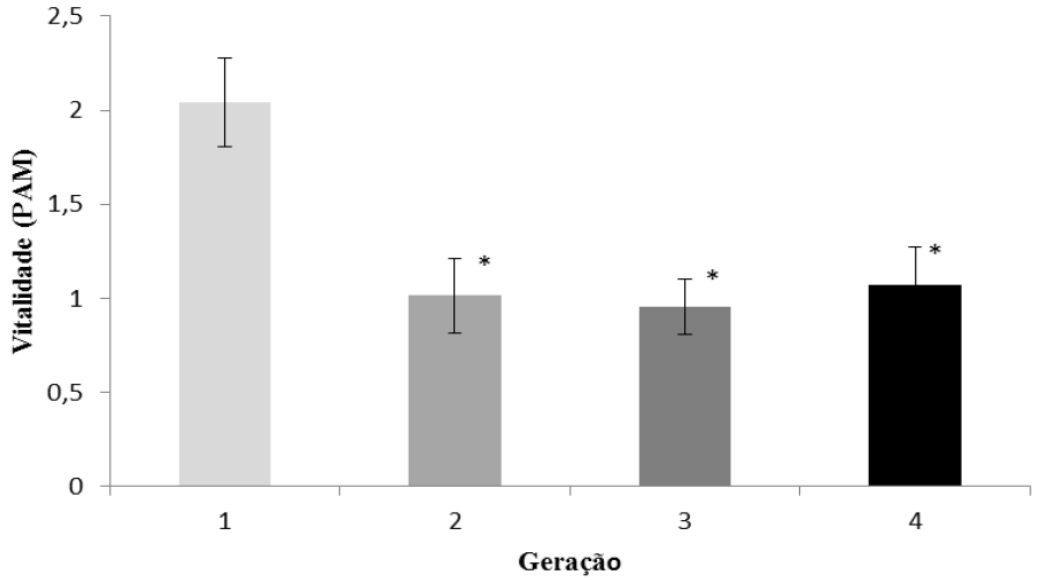
Assim como o teste de viabilidade, este é fundamental na avaliação das leveduras reutilizadas e funciona como um complemento na sua análise. Ambos são indispensáveis, além de consistirem em testes simples.

A vitalidade das células de levedura depende de diversos parâmetros, desde a temperatura de armazenamento até mutações que podem ocorrer de forma espontânea. Dependendo das condições de armazenagem, é possível a ocorrência de problemas como floculação imprópria das células, redução do etanol e má utilização dos açúcares fermentáveis (Suhre, 2014).

De acordo com Kara et al. (1988), a performance da fermentação pode ser precisamente antecipada através do teste do poder de acidificação, não só para a Saccharomyces cerevisiae. Os resultados obtidos em um estudo com outras quatro leveduras sugerem que o teste possui ampla aplicabilidade.

No estudo realizado por Suhre (2014), foi analisada a vitalidade de leveduras ao longo de quatro gerações, e os resultados dos testes por acidificação foram comparados.

Gráfico 3 – Poder de acidificação de uma levedura cervejeira, indicando a vitalidade, medida ao longo de quatro gerações. *Aumento de vitalidade estatisticamente significante (p<0,05) quando comparado à primeira geração.




Fonte: Suhre (2014).

As células apresentam uma tendência de decaimento da vitalidade em relação à primeira fermentação, mas tiveram resultados estatisticamente semelhantes ao longo dos reusos, indicando um padrão de estabilidade.

A partir dos dados coletados na segunda parte do estudo realizado por Suhre (2014), foi possível observar que maiores valores de acidificação do meio estavam ligados à maiores percentuais vitalidade. Além disso, foi possível inferir também que não há uma relação direta entre os valores de viabilidade e vitalidade com o número de reutilização das leveduras.

Em outro estudo, realizado por Nicholson e Pearson (2014) sobre as variáveis que afetam a vitalidade de leveduras, foi mostrado que há uma tendência de diminuição da vitalidade no uso de leveduras que foram armazenadas por mais tempo, mas que não há variação exatamente ligada com a passagem de tempo nas fermentações.

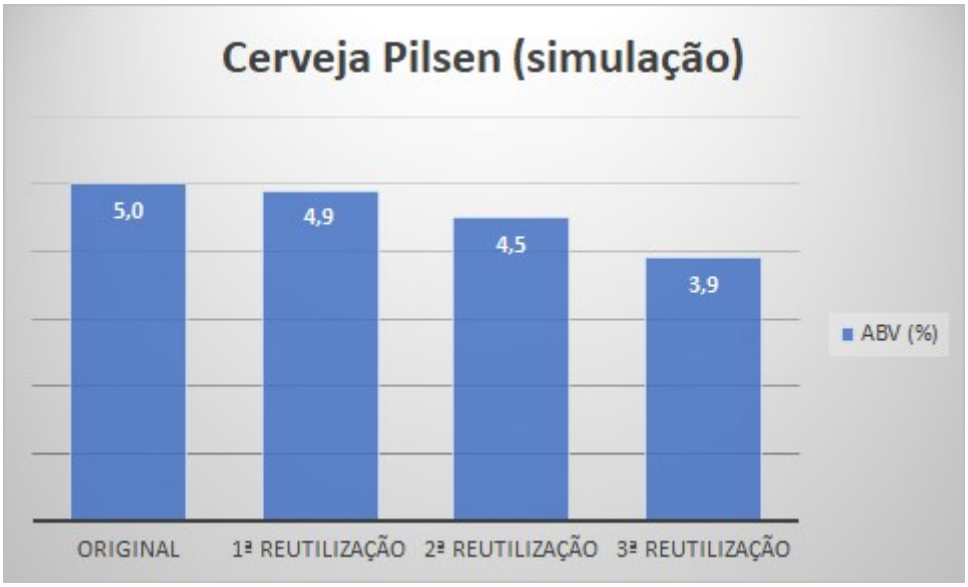
## 4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO

De acordo com o BJCP (2015 apud VARGAS, 2018), as cervejas tipo ale apresentam valor de ABV (alcohol by volume) entre 5,5-7,5 % de teor alcoólico, sendo que as cervejas Pale Ale e IPA se enquadram nesse estilo e devem, assim, apresentar valores nessa faixa. Já as cervejas tipo Pilsen, segundo Grejo (2014) devem apresentar ABV entre 4,0-5,0% de teor alcoólico. Para que o estudo se mostre viável, o esperado é que ocorra apenas um pequeno decaimento no teor de álcool a cada vez que a levedura é reaproveitada na fermentação.

Em seu estudo de reaproveitamento na produção de cervejas artesanais tipo Lager, Bittencourt (2018) observou um decaimento sucessivo ao longo das fermentações, com diminuições de 2%, 10% e por fim 22% no valor do teor alcoólico, em relação à produção sem reaproveitamento. Ainda assim o parâmetro se encontrava dentro do permitido, sendo viável a produção desde que haja um controle sobre o decaimento, seguindo o limite viável na quantidade de reutilizações. Salles e Horst (2015), utilizando a levedura Saccharomyces cerevisiae (W-34/70) também chegaram a valores semelhantes, com uma queda próxima de 25% do valor inicial do teor alcoólico.

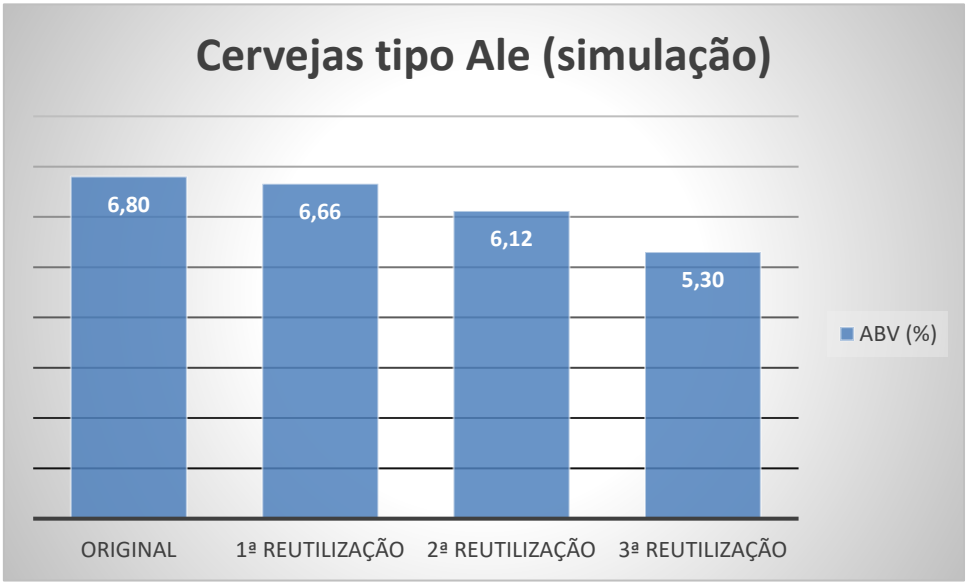
Os gráficos abaixo, elaborados com dados simulados, foram feitos com base nos valores observados nos estudos citados anteriormente, de forma a elucidar o que foi descrito:

Gráfico 4 – Simulação do comportamento do teor alcoólico esperado ao longo das reutilizações das leveduras na produção de uma Pilsen.




Fonte: Elaboração do autor, 2020.

Gráfico 5 – Simulação do comportamento do teor alcoólico esperado ao longo das reutilizações das leveduras na produção de cervejas tipo Ale.




Fonte: Elaboração do autor, 2020.

## 4.4 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Os POPs desenvolvidos são apresentados nos Apêndices A, B e C, seguindo a ordem dos métodos apresentados no presente trabalho. São os seguintes:

- POP 001 – Análise da viabilidade das leveduras reutilizadas;
- POP 002 – Análise da vitalidade de leveduras reutilizadas;
- POP 003 Determinação do teor alcoólico.

# 5 CONCLUSÃO

Com o objetivo de reduzir custos e amenizar o impacto ambiental, o presente trabalho estudou a possibilidade de produzir cervejas artesanais dos estilos Pilsen, Pale Ale e IPA a partir da reutilização de leveduras no processo. Não foi possível avaliar o desempenho específico de cada tipo levedura, de modo que foram aqui apresentados resultados baseados em pesquisas bibliográficas de estudos em diversos estilos de cervejas.

Para o método do azul de metileno básico, que avaliou a viabilidade das células ao longo dos reusos, os resultados se mostraram oscilantes ao longo dos reusos, necessitando-se assim de mais estudos para cada linhagem de levedura usada, de forma a compreender seu comportamento.

O poder de acidificação do meio, que determina a vitalidade das leveduras mostrou uma queda no valor da acidificação em relação à fermentação original, mas se manteve estável ao longo dos reusos, mostrando que a vitalidade das células, independentemente do número de reutilizações, apresenta um valor satisfatório.

O teor alcoólico das cervejas produzidas sofreu um decaimento gradual ao longo dos reusos. Segundo os estudos acompanhados, a reutilização é factível até 3 reusos; acima disso, o valor do teor alcoólico é reduzido abaixo fora da faixa esperada para cada estilo.

Todos os métodos elencados nesse estudo são conhecidos e consolidados na avaliação de leveduras cervejeiras, além de caracterizarem-se por serem simples e despenderem poucos reagentes e materiais. Com isso, pode-se concluir que a reutilização dentro de uma faixa de 3 fermentações se mostra praticável, desde que haja um acompanhamento dos parâmetros estudados.

Os procedimentos operacionais padrão foram elaborados seguindo as exigências da ANVISA, conforme RDC nº 275, de 2002. Esses documentos estabelecem os métodos apresentados de forma simples e direta, e servirão de auxílio para a aplicação prática dos métodos no dia-a-dia da produção na empresa.

Como sugestão para trabalhos futuros, seria interessante adicionar uma metodologia para detecção de microorganismos deteriorantes (gram+ e gram-), e também testes de análise sensorial para as cervejas produzidas com reuso de leveduras, de forma a assegurar que suas características organolépticas estejam dentro dos padrões de qualidade esperados.

# REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada- **RDC nº 275**, de 21 de outubro de 2002. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254> Acessado em: 8 de agosto de 2020.

BITENCOURT, F. S. **Reaproveitamento de levedura no processo produtivo de cerveja artesanal: comparação do decaimento do teor alcoólico**. 2018. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universitário de Formiga - UNIFOR, Formiga, 2018.

FERMENTIS. **SafAle™ S-04**. 2017.

FERMENTIS. **SafAle™ US-05**. 2017.

FERMENTIS. **SafLager™ W-34/70**. 2017.

FILHO, W. G. V. **Bebidas Alcoólicas**: Ciência e Tecnologia. Volume 1. 2 ed. São Paulo: Blutcher, 2016.

GABRIEL, P., DIENSTBIER, M., MATOULKOVÁ, D., KOSAŘ, K. and SIGLER, K. 2008, Optimised Acidification Power Test of Yeast Vitality and its Use in Brewing Practice. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, p. 270-276. Disponível em: < https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00338.x >. Acesso em 21 de junho de 2020.

GREJO, M. M. **Determinação do teor alcoólico na cerveja pilsen**. 2014. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis, 2014.

KARA, B. V. et al. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, 1988, v. 94, p. 153-158. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/264473670_Prediction_of_fermentation_performance_of_brewing_yeast_with_the_acidification_power_test >. Acesso em 21 de junho de 2020.

KASVI. **Como é realizada a Contagem de Células?** São José dos Pinhais, 2017. Disponível em: < https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/ >. Acesso em 12 de junho de 2020.

LOSADA, Gisele. **Controle Estatístico de Processos**. 1 ed. Porto Alegre: SAGAH, 2017.

LOUZADA, F. et al. **Controle Estatístico de Processos**: uma abordagem prática para cursos de engenharia e administração. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

MAPA. **Anuário da Cerveja** - 2019. Brasília, 2020. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2020/03/anuario-cerveja-WEB.pdf >. Acesso em 10 de julho de 2020.

MELO, H. H. A. de, et al. **Estudo de diferentes concentrações de leveduras reaproveitadas para produção de cerveja artesanal "pale ale".** IFNMG. Almenara, 2017

MONGELO, A. I. **Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2012.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**: 1. ed. São Paulo: Alaúde Editorial, 2017.

MORAES, J. da C. **Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro**. 2017. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

NICHOLSON, M.; PEARSON, B. Variables influencing viability of brewer's yeast. **Fungi**, 2014, v. 7, p. 23-27. Disponível em: < https://www.fungimag.com/spring-2014-articles-02/V7I1%20LR%20101Yeast23-27pdf.pdf >. Acesso em 25 de junho de 2020.

OLIVEIRA, N. A. M. de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. 2011. 45 f. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de Saccharomyces cerevisiae em cultura mista com Lactobacillus fermentum. **Sci. agric**., Piracicaba, v. 55, n. 3, p. 520-527, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161998000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 29 de maio de 2020.

SALLES, Luciane B.; HORST, Guilherme B. **Avaliação da eficiência da levedura Saccharomyces cerevisiae (W-34/70) reaproveitada na produção de cerveja**. 2015. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

SAMI, M. et al. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tóquio, v. 78, n. 3, p. 212-216, 1994.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em <https://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acesso em 31 de março de 2020.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; COELHO, A. I. M.; FERREIRA, K. R. Avaliação das boas práticas em unidade de alimentação e nutrição no município de Contagem-MG. **Alim. Nutr**., Araraquara, v. 22, n. 3, p. 479-487, jul./set. 2011.

SUHRE, T. **Controle de Qualidade em Microcervejarias**: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras. 2014. 48 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

VARGAS, B. de O. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação do potencial antioxidante de cervejas tipo Ale (IPA).** 2018. 56 F. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

VILCHES, P. F. da S. **Análise da levedura fermentadora S-33 para otimização de sua reutilização na produção de cervejas especiais**. Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica – PUCRS, 2012.

# APÊNDICES

# APÊNDICE A – POP 001 (Análise da viabilidade das leveduras reutilizadas)

| | Procedimento Operacional Padrão | POP 001 | |
|---|---|---|---|
| HAI BIER DESDE 2018 | **Análise da viabilidade das leveduras reutilizadas** | Versão: | 001 |
| | | Folha nº: | 2/2 |
| | | Criado em: | 09/07/2020 |
| | | Revisado em: | 18/07/2020 |
| | | Próxima Revisão: | 18/07/2021 |

**Objetivo**

Testar a viabilidade das células reutilizadas na fermentação.

**Campo de aplicação**

Laboratorial.

**Material necessário**

Pipeta, tubos de ensaio, câmara de Neubauer, microscópio.

**Descrição, Frequência e Responsabilidade**

O ensaio de viabilidade pelo método do azul de metileno básico deve ser efetuado a cada fermentação com reutilização das leveduras no processo.

**Procedimento**

1. Coletar uma amostra das leveduras que serão reutilizadas na próxima fermentação, utilizando um recipiente sanitizado com álcool 70º.
2. Realizar diluições em série, transferindo com uma pipeta 1 mL de amostra para 9 mL de água destilada em um tubo de ensaio, até atingir a concentração de 1:10.000 mL.
3. Preparar a solução padrão de azul de metileno, dissolvendo-se azul de metileno em água destilada, de modo a atingir a concentração de 0,1% (p/v). Para preparar a solução de coloração, a solução padrão é diluída 10x em um tampão de glicina 0,1M, em um pH equivalente a 10,6.
4. Misturar a solução e a amostra em partes iguais e incubar a mistura por 15 minutos a 25ºC.
5. Após esse período, transferir 1 mL da mistura em uma câmara de Neubauer, onde deve ser feita a contagem com auxílio de um microscópio. Nessa técnica, as células viáveis não apresentam coloração, enquanto as células não viáveis são coloridas de azul.
6. Registrar o número total de células observado em um quadrante e o número de células coloridas em azul (inviáveis) no mesmo, e então aplicar esses valores na fórmula abaixo:

$$Viabilidade\ (\%) = \frac{\sum_{i \geq 150} t_c - \sum cm}{\sum_{i > 150} t_c \times 100}$$

Onde:

$\Sigma i_{\geq 150} t_c$ = somatório do número total de células contadas em cada quadrante (com número maior ou igual a 150);

| Elaborado por: | Revisado por: | Aprovado por: |
|---|---|---|
| Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss |

Documento confidencial. Proibida a cópia, reprodução ou alteração sem autorização expressa da empresa.

$\Sigma cm$ = corresponde ao somatório do valor contabilizado de células inviáveis (leveduras que apresentaram cor azul).

7. Registrar na planilha de controle de qualidade (PLA 001).

**Registro**

Planilha de controle de qualidade (PLANILHA 001).

**Referências**


KASVI. **Como é realizada a Contagem de Células?** São José dos Pinhais, 2017. Disponível em: < https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/ >. Acesso em 12 de junho de 2020.

MONGELO, A. I. **Validação de Método Baseado em Visão Computacional para Automação da Contagem de Viabilidade de Leveduras em Indústrias Alcooleiras**. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2012.

SAMI, M. et al. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tóquio, v. 78, n. 3, p. 212-216, 1994.

SUHRE, T. **Controle de Qualidade em Microcervejarias**: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras. 2014. 48 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.




Documento confidencial. Proibida a cópia, reprodução ou alteração sem autorização expressa da empresa.

# APÊNDICE B – POP 002 (Análise da vitalidade de leveduras reutilizadas)

| | Procedimento Operacional Padrão | POP 002 | |
|---|---|---|---|
| HAI BIER DESDE 2018 | **Análise da vitalidade de leveduras reutilizadas** | Versão: | 001 |
| | | Folha nº: | 2/2 |
| | | Criado em: | 09/07/2020 |
| | | Revisado em: | 18/07/2020 |
| | | Próxima Revisão: | 18/07/2021 |

**Objetivo**

Realizar o ensaio de vitalidade nas leveduras reutilizadas.

**Campo de aplicação**

Laboratorial.

**Material necessário**

Pipeta, tubos de ensaio, câmara de Neubauer, microscópio, centrífuga e pHmetro.

**Descrição, Frequência e Responsabilidade**

Ensaio de vitalidade das células pelo método do poder de acidificação do meio, realizado sempre antes da reutilização de leveduras na fermentação.

**Procedimento**

1. Coletar uma amostra das leveduras que serão reutilizadas na próxima fermentação, utilizando um recipiente sanitizado com álcool 70º.
2. Realizar diluições em série da amostra, transferindo com uma pipeta 1 mL de amostra para 9 mL de água destilada em um tubo de ensaio, até atingir a concentração de 1:10.000 mL.
3. Transferir 1 mL da amostra para câmara de Neubauer, onde a contagem deve ser feita com auxílio de um microscópio. A concentração é determinada pela fórmula abaixo:

$$C = N \times 10.000\ (câmara\ de\ Neubauer) \times 10.000\ (fator\ de\ diluição)$$

   Onde:

   C = concentração de células, em UFC/mL

   N = número de células contadas
4. Centrifugar a amostra a 10.000 rpm por 3 minutos.
5. Lavar o precipitado celular 3 vezes com água destilada e misturar com 10 mL de água destilada estéril, com um pH ajustado para 6,3.
6. Registrar o pH inicial pelos próximos 10 minutos.
7. Adicionar 0,5 mL de solução de glicose 20% (p/v) e registrar o pH por mais 10 minutos.
8. Com os dados coletados, calcular o poder de acidificação usando a seguinte fórmula:

$$PA = (pH0 - pH10) + (pH10 - pH20)$$

   Onde


Documento confidencial. Proibida a cópia, reprodução ou alteração sem autorização expressa da empresa.

PA = poder de acidificação (usado para estimar a vitalidade das células)

pH0 = valor de pH no início do experimento (t=0)

pH10 = valor de pH 10 minutos após início do experimento (t=10 min)

pH20 = valor de pH após adição de glicose (t=20)

9. Registrar na planilha de controle de qualidade (PLA 001).

**Registro**

Planilha de controle de qualidade (PLANILHA 001).

**Referências**


KARA, B. V. et al. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, 1988, v. 94, p. 153-158. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/264473670_Prediction_of_fermentation_performance_of_brewing_yeast_with_the_acidification_power_test >. Acesso em 21 de junho de 2020.

MORAES, J. da C. **Desenvolvimento e padronização do ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro**. 2017. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SUHRE, T. **Controle de Qualidade em Microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 2014. 48 f. Monografia (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.




Documento confidencial. Proibida a cópia, reprodução ou alteração sem autorização expressa da empresa.

# APÊNDICE C – POP 003 (Determinação do teor alcoólico)

| | Procedimento Operacional Padrão | POP 003 | |
|---|---|---|---|
| HAI BIER DESDE 2018 | **Determinação do teor alcoólico** | Versão: | 001 |
| | | Folha nº: | 2/2 |
| | | Criado em: | 09/07/2020 |
| | | Revisado em: | 18/07/2020 |
| | | Próxima Revisão: | 18/07/2021 |

**Objetivo**

Determinar o teor alcoólico das cervejas produzidas, através do método do título alcoométrico volumétrico.

**Campo de aplicação**

Laboratorial.

**Material necessário**

Densímetro e proveta (250 mL).

**Descrição, Frequência e Responsabilidade**

Toda cerveja produzida deve passar por esse procedimento, realizado pela pessoa responsável.

**Procedimento**

1. Coletar a primeira amostra após a fervura, em um recipiente sanitizado com álcool 70º.
2. Dispor 100mL da amostra em uma proveta graduada.
3. Realizar a medida da densidade com o auxílio de um densímetro, em triplicata.
4. Coletar a segunda amostra ao fim da fermentação, em um recipiente sanitizado com álcool 70º.
5. Dispor 100mL da amostra em uma proveta graduada.
6. Realizar a medida da densidade com o auxílio de um densímetro, em triplicata.
7. Calcular o valor médio dos dados coletados e aplicar na seguinte fórmula:

$$\%ABV = (OG - FG) \times 131$$

Onde:

% ABV: (*Alcohol by Volume*) Teor de álcool presente na mistura (v/v)

OG: Densidade relativa original, medida após a fervura.

FG: Densidade relativa final, medida ao final da fermentação.

8. Registrar na planilha de controle de qualidade (PLA 001).

**Registro**

Planilha de controle de qualidade (PLANILHA 001).

**Referências**

| Elaborado por: | Revisado por: | Aprovado por: |
|---|---|---|
| Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss |

| | Procedimento Operacional Padrão | POP 003 | |
|---|---|---|---|
| HAI BIER DESDE 2018 | **Determinação do teor alcoólico** | Versão: | 001 |
| | | Folha nº: | 2/2 |
| | | Criado em: | 09/07/2020 |
| | | Revisado em: | 18/07/2020 |
| | | Próxima Revisão: | 18/07/2021 |

BITENCOURT, F. S. **Reaproveitamento de levedura no processo produtivo de cerveja artesanal: comparação do decaimento do teor alcoólico**. 2018. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universitário de Formiga - UNIFOR, Formiga, 2018.

| Elaborado por: | Revisado por: | Aprovado por: |
|---|---|---|
| Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss | Diogo Quirino Buss |

# ANEXOS

## ANEXO A – Relação de estados pelo número de cervejarias, ano e crescimento médio

Tabela 1 - Relação dos 10 estados que apresentam maior número de cervejarias por ano e crescimento médio

| Nº | UF | 2017 | 2018 | 2019 | Crescimento médio |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | SP | 124 | 166 | 241 | 39,5% |
| 2 | RS | 142 | 184 | 236 | 28,9% |
| 3 | MG | 87 | 116 | 163 | 36,9% |
| 4 | SC | 78 | 104 | 148 | 37,8% |
| 5 | PR | 67 | 93 | 131 | 39,8% |
| 6 | RJ | 57 | 62 | 78 | 17,3% |
| 7 | ES | 11 | 17 | 34 | 77,3% |
| 8 | GO | 21 | 25 | 28 | 15,5% |
| 9 | BA | 7 | 12 | 20 | 69,0% |
| 10 | RN | 6 | 9 | 20 | 86,1% |

Fonte: MAPA (2019).

# ANEXO B – Ficha técnica da levedura SafAle™ S-04

Fermentis
LESAFFRE FOR BEVERAGES

## SafAle™ S-04

ACTIVE DRY YEAST

Fermento Ale Inglês, selecionado por sua rápida característica de fermentação e sua habilidade de formar sedimentos compactos no final da fermentação, ajudando a melhorar a clarificação da cerveja. Recomendado para a produção de uma grande variedade de ales e especialmente adaptado para cervejas acondicionadas em barris de madeira e para fermentação em tanques cilindro cônicos.

**INGREDIENTES:** Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), Agente Emulsificante: E491

| ÉSTERES TOTAIS | ÁLCOOIS SUPERIORES TOTAIS | AÇÚCARES RESIDUAIS | FLOCULAÇÃO | SEDIMENTAÇÃO |
|---|---|---|---|---|
| 37 | 363 | 18 g/l* | + | rápida |
| ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC | | ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC | *10g maltotriose/L correspondendo a uma atenuação aparente de 75% | |

Leveduras cervejeiras secas da Fermentis são conhecidas por ter a habilidade de produzir uma grande variedade de estilos de cerveja. A fim de comparar nossas cepas, nós fizemos testes em condições laboratoriais com um mosto padrão para todas as cepas e condições padrão de temperatura (SafLager: 12°C por 48h e depois 14°C / SafAle: 20°C). Nós focamos nos seguintes parâmetros: produção de álcool, açúcares residuais, floculação e cinética da fermentação.

Dado o impacto da levedura na qualidade da cerveja pronta é recomendado respeitar as instruções de fermentação prescritas. Nós instruímos fortemente aos usuários a fazerem testes de fermentação antes de qualquer uso comercial de nossos produtos.

**FERMENTAÇÃO:** Idealmente 15-20°C (59-68°F)

**DOSAGEM:** 50 a 80 g/hl

**INSTRUÇÕES DE REIDRATAÇÃO:** Polvilhar a levedura em no mínimo 10 vezes o seu peso em água estéril ou mosto de 25 a 29°C (77°F a 84°F). Deixar descansando por 15 a 30 minutos.
Gentilmente mexer por 30 minutos, e dosar o creme resultante no tanque de fermentação.
Alternativamente, dose a levedura diretamente no tanque de fermentação desde que a temperatura do mosto esteja acima de 20°C (68°F). Polvilhe progressivamente a levedura seca no mosto certificando-se que a levedura cubra toda a superfície do mosto disponível para evitar grumos. Deixar por 30 minutos, para então misturar o mosto usando aeração ou pela adição de mosto

**ANÁLISE TÍPICA:**

| | |
|---|---|
| % peso seco: | 94.0 – 96.5 |
| Células Viáveis no empacotamento: | > 6 x $10^9$ /g |
| Bactérias Totais*: | < 5 / ml |
| Bactéria ácido acético*: | < 1 / ml |
| Lactobacillus*: | < 1 / ml |
| Pediococcus*: | < 1 / ml |
| Levedura selvagem não Saccharomyces*: | < 1 / ml |
| Microorganismos Patogênicos: de acordo com regulamentação vigente | |

* Quando a levedura seca é inoculada a uma taxa de 100 g/hl, equivale a uma concentração de > 6 x $10^6$ céluluas viáveis/ml

**ARMAZENAMENTO**
36 meses a partir da data de produção. Durante o transporte: O produto pode ser transportado e armazenado em temperatura ambiente por períodos de tempo não excedendo 3 meses sem afetar sua performance.
No destino final: Manter em condições secas e frescas (< 10°C/50°F).

**VIDA ÚTIL**
Ver data máxima para consumo impressa no pacote.
Pacotes abertos devem ser selados e mantidos a 4°C (39°F) e usados dentro de 7 dias após abertos. Não usar pacotes moles ou danificados.



The obvious choice for beverage fermentation

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marcq-en-Barœul Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com

# ANEXO C – Ficha técnica da levedura SafAle™ US-05

Fermentis
LESAFFRE FOR BEVERAGES

## SafAle™ US-05

ACTIVE DRY YEAST

Fermento Ale Americano, selecionado para produzir cervejas bem balanceadas com baixo diacetil e com um paladar final bem "crispy" e limpo. Forma uma firme camada de espuma e apresenta uma habilidade muito boa de se manter em suspensão durante a fermentação.

**INGREDIENTES:** Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), Agente Emulsificante: E491

| ÉSTERES TOTAIS | ÁLCOOIS SUPERIORES TOTAIS | AÇÚCARES RESIDUAIS | FLOCULAÇÃO | SEDIMENTAÇÃO |
|---|---|---|---|---|
| 40 | 269 | 11 g/l* | +/- | média |
| ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC | ppm em mosto com 18°P a 20°C em tubos EBC | *3g maltotriose/L correspondendo a uma atenuação aparente de 81% | | |

Leveduras cervejeiras secas da Fermentis são conhecidas por ter a habilidade de produzir uma grande variedade de estilos de cerveja. A fim de comparar nossas cepas, nós fizemos testes em condições laboratoriais com um mosto padrão para todas as cepas e condições padrão de temperatura (SafLager: 12°C por 48h e depois 14°C / SafAle: 20°C). Nós focamos nos seguintes parâmetros: produção de álcool, açúcares residuais, floculação e cinética da fermentação.

Dado o impacto da levedura na qualidade da cerveja pronta é recomendado respeitar as instruções de fermentação prescritas. Nós instruímos fortemente aos usuários a fazerem testes de fermentação antes de qualquer uso comercial de nossos produtos.

**FERMENTAÇÃO:** idealmente a 18-28°C (64-82°F)

**DOSAGEM:** 50 a 80 g/hl

**INSTRUÇÕES DE REIDRATAÇÃO:** Polvilhar a levedura em no mínimo 10 vezes o seu peso em água estéril ou mosto de 25 a 29°C (77°F a 84°F). Deixar descansando por 15 a 30 minutos.
Gentilmente mexer por 30 minutos, e dosar o creme resultante no tanque de fermentação.
Alternativamente, dose a levedura diretamente no tanque de fermentação desde que a temperatura do mosto esteja acima de 20°C (68°F). Polvilhe progressivamente a levedura seca no mosto certificando-se que a levedura cubra toda a superfície do mosto disponível para evitar grumos. Deixar por 30 minutos, para então misturar o mosto usando aeração ou pela adição de mosto

**ANÁLISE TÍPICA:**

| | |
|---|---|
| % peso seco: | 94.0 – 96.5 |
| Células Viáveis no empacotamento: | > 6 x $10^9$ /g |
| Bactérias Totais*: | < 5 / ml |
| Bactéria ácido acético*: | < 1 / ml |
| Lactobacillus*: | < 1 / ml |
| Pediococcus*: | < 1 / ml |
| Levedura selvagem não Saccharomyces*: | < 1 / ml |
| Microorganismos Patogênicos: | de acordo com regulamentação vigente |

* Quando a levedura seca é inoculada a uma taxa de 100 g/hl, equivale a uma concentracão de > 6 x $10^6$ céluluas viáveis/ml

**ARMAZENAMENTO**
36 meses a partir da data de produção. Durante o transporte: O produto pode ser transportado e armazenado em temperatura ambiente por períodos de tempo não excedendo 3 meses sem afetar sua performance.
No destino final: Manter em condições secas e frescas (< 10°C/50°F).

**VIDA ÚTIL**
Ver data máxima para consumo impressa no pacote.
Pacotes abertos devem ser selados e mantidos a 4°C (39°F) e usados dentro de 7 dias após abertos. Não usar pacotes moles ou danificados.

*FOLHA DE DADOS TÉCNICOS - SafAle™ US-05 - Rev: Julho2017*

The obvious choice for beverage fermentation

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marcq-en-Barœul Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com

# ANEXO D – Ficha técnica da levedura SafLager™ W-34/70

Fermentis
LESAFFRE FOR BEVERAGES

## SafLager™ W-34/70

ACTIVE DRY YEAST

Essa famosa cepa do fermento da Weihenstephan na Alemanha é usada mundialmente na indústria cervejeira. SafLager W-34/70 permite produzir cervejas com bom equilíbrio de aromas florais e frutados e traz sabores limpos e alto drinkability à cerveja.

**INGREDIENTES:** Levedura (*Saccharomyces pastorianus*), Agente Emulsificante: E491

| ÉSTERES TOTAIS | ÁLCOOIS SUPERIORES TOTAIS | AÇÚCARES RESIDUAIS | FLOCULAÇÃO | SEDIMENTAÇÃO |
|---|---|---|---|---|
| 37 | 155 | 5 g/l* | + | rápida |
| ppm em mostos com 18°P em tubos EBC a 12°C durante as primeiras 48h de fermentação, e logo a 14°C | ppm em mostos com 18°P em tubos EBC a 12°C durante as primeiras 48h de fermentação, e logo a 14°C | * 2g maltotriose/L correspondendo a uma atenuação aparente de 83% | | |

Leveduras cervejeiras secas da Fermentis são conhecidas por ter a habilidade de produzir uma grande variedade de estilos de cerveja. A fim de comparar nossas cepas, nós fizemos testes em condições laboratoriais com um mosto padrão para todas as cepas e condições padrão de temperatura (SafLager: 12°C por 48h e depois 14°C / SafAle: 20°C). Nós focamos nos seguintes parâmetros: produção de álcool, açúcares residuais, floculação e cinética da fermentação.
Dado o impacto da levedura na qualidade da cerveja pronta é recomendado respeitar as instruções de fermentação prescritas. Nós instruímos fortemente aos usuários a fazerem testes de fermentação antes de qualquer uso comercial de nossos produtos.

**FERMENTAÇÃO:** idealmente 12-15°C (53.6-59°F)

**DOSAGEM:** 80 a 120 g/hl para fermentação a 12°C – 15°C (53.6-59°F).

Aumentar dosagem para fermentação abaixo de 12°C (53°F), para 200 a 300 g/hl a 9°C (48°F)

**INSTRUÇÕES DE REIDRATAÇÃO:** Polvilhar a levedura em no mínimo 10 vezes o seu peso em água estéril ou mosto de 21 a 25°C (70°F a 77°F). Deixar descansando por 15 a 30 minutos.
Gentilmente mexer por 30 minutos, e dosar o creme resultante no tanque de fermentação.
Alternativamente, dose a levedura diretamente no tanque de fermentação desde que a temperatura do mosto esteja acima de 20°C (68°F). Polvilhe progressivamente a levedura seca no mosto certificando-se que a levedura cubra toda a superfície do mosto disponível para evitar grumos. Deixar por 30 minutos, para então misturar o mosto usando aeração ou pela adição de mosto

### ANÁLISE TÍPICA:

| | |
|---|---|
| % peso seco: | 94.0 – 96.5 |
| Células Viáveis no empacotamento: | > 6 x $10^9$ /g |
| Bactérias Totais*: | < 5 / ml |
| Bactéria ácido acético*: | < 1 / ml |
| Lactobacillus*: | < 1 / ml |
| Pediococcus*: | < 1 / ml |
| Levedura selvagem não Saccharomyces*: | < 1 / ml |
| Microorganismos Patogênicos: de acordo com regulamentação vigente | |

* Quando a levedura seca é inoculada a uma taxa de 100 g/hl, equivale a uma concentração de > 6 x $10^6$ céluluas viáveis/ml

### ARMAZENAMENTO

36 meses a partir da data de produção. Durante o transporte: O produto pode ser transportado e armazenado em temperatura ambiente por períodos de tempo não excedendo 3 meses sem afetar sua performance.
No destino final: Manter em condições secas e frescas (< 10°C/50°F).

### VIDA ÚTIL

Ver data máxima para consumo impressa no pacote.
Pacotes abertos devem ser selados e mantidos a 4°C (39°F) e usados dentro de 7 dias após abertos. Não usar pacotes moles ou danificados.

*FOLHA DE DADOS TÉCNICOS - SafLager™ W-3470 - Rev :DEC2017*

The obvious choice for beverage fermentation

Fermentis Division of S.I. Lesaffre - BP 3029 - 137 Rue Gabriel Péri - 59703 Marcq-en-Barœul Cedex - FRANCE - Tel. +33 (0)3 20 81 62 75 - Fax. +33 (0)3 20 81 62 70 - www.fermentis.com

## ANEXO E – Comparação das análises de viabilidade e vitalidade de cervejarias de Porto Alegre

Tabela 2 - Paralelo entre os resultados das análises de viabilidade e vitalidade das leveduras de diferentes estilos de cerveja e diferentes gerações de microcervejarias da região de Porto Alegre

| Estilo de cerveja | Geração | Viabilidade | Vitalidade |
|---|---|---|---|
| Pilsen | 4 | 80% | 0,6 |
| Weizen | 2 | 78% | 0,3 |
| Amber Ale | 2 | 42% | 0,7 |
| Weizen | 4 | 89% | 1,4 |
| Trapista | 8 | 8% | 0,7 |
| Pale Ale | 1 | 83%% | 0,7 |
| Weizen | 2 | 94% | 0,9 |
| Pale Ale | 1 | 83% | 0,6 |

Fonte: Suhre (2014).