



GUSTAVO HENRIQUE DE SOUZA PAIVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE LEVEDURAS
EM UMA MICROCERVEJARIA**

LAVRAS - MG

2019

GUSTAVO HENRIQUE DE SOUZA PAIVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE LEVEDURAS
EM UMA MICROCERVEJARIA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa

Orientador

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

Coorientador

LAVRAS - MG

2019

GUSTAVO HENRIQUE DE SOUZA PAIVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE LEVEDURAS
EM UMA MICROCERVEJARIA**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 04 de julho de 2019.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa - UFLA

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves - UFLA

Prof. Dr. Gilson Campani Junior - UFLA

Prof. Dra. Isabele Cristina Bicalho - UFLA

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa
Orientador

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Coorientador

LAVRAS - MG

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, Luiz e Dagumar, e minha irmã, Carol, pelo apoio incondicional e todo o incentivo durante a jornada na Engenharia Química.

Aos professores Luciano e José Guilherme, pela orientação, pela oportunidade de realização deste trabalho e a pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos professores Gilson e Isabele, pela participação e pelas sugestões e contribuições como banca examinadora do TCC.

A Cervejaria Naípe Brew, pela oportunidade de estágio a mim concedida e pela doação das amostras de levedura utilizadas neste trabalho.

Ao professor Luís Roberto Batista, por ceder o Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos para que as análises pudessem ser feitas.

Aos meus amigos e colegas da primeira turma de Engenharia Química/UFLA, pela amizade, companheirismo e boa convivência durante esses 5 anos de curso.

Aos meus avós, tios, primos e amigos por toda a força e estímulo durante a graduação.

RESUMO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo e as microcervejarias tem ganhado espaço no mercado com a produção de cervejas artesanais. No processo de fabricação de cerveja é importante ter um controle de qualidade para se ter um produto final com um alto padrão de consumo. As leveduras são responsáveis pela fermentação do mosto cervejeiro, uma etapa importante do processo de produção cervejeira. As leveduras podem ser reutilizadas em diferentes fermentações por até seis vezes. Algumas formas de avaliar a qualidade das leveduras são: viabilidade, vitalidade e a presença de contaminantes microbianos. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a viabilidade das células de levedura de amostras doadas pela Cervejaria Naípe Brew, da cidade de Campo Belo/MG. Foi acompanhada a utilização da levedura desde o primeiro uso até a quarta reutilização de um mesmo lote de fermento. Para fazer as análises de viabilidade, foi usado o método de coloração com azul de metileno e contagem ao microscópio, utilizando uma Câmara de Neubauer. Foram obtidos resultados de viabilidade acima de 80% das gerações de zero (primeiro uso) a quatro (quarta reutilização), sendo os resultados obtidos considerados estatisticamente iguais para as gerações zero e um; e dois, três e quatro. De acordo com os resultados das análises de viabilidade feitas, pode-se concluir que o reuso de leveduras por quatro vezes é um método seguro quanto ao tempo de atenuação de açúcares do mosto, além de ser uma alternativa economicamente viável. Porém, para fazer o reuso de fermento com mais segurança, outras análises devem ser feitas, como a vitalidade das células e a detecção de contaminantes microbianos.

Palavras-chave: Leveduras cervejeiras. *Saccharomyces cerevisiae*. Controle de qualidade. Viabilidade. Microcervejaria. Reaproveitamento de Fermento.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Cerveja.....	3
2.1.1	História da cerveja no Brasil e no Mundo	5
2.1.2	Mercado mundial e nacional de cervejas.....	7
2.1.3	Matérias-primas.....	10
2.1.3.1	Água	10
2.1.3.2	Malte	10
2.1.3.3	Lúpulo.....	11
2.1.3.4	Adjuntos.....	14
2.1.3.5	Levedura	15
2.1.4	Processo de produção	17
2.1.4.1	Moagem de malte	18
2.1.4.2	Brassagem ou mosturação.....	19
2.1.4.3	Filtração ou clarificação do mosto	21
2.1.4.4	Fervura do mosto	21
2.1.4.5	Tratamento do mosto.....	22
2.1.4.6	Fermentação	22
2.1.4.7	Maturação.....	24
2.2.	Controle de qualidade de leveduras	25
2.2.1	Câmara de Neubauer.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Material.....	28
3.2	Determinação da viabilidade celular.....	29
3.2.1	Sistema de captura de imagem do microscópio	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5	CONCLUSÃO	41
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. Estima-se que a produção de cerveja teve seu início por volta de 8000 A.C., sendo desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais (AQUARONE et al., 2001).

De acordo com o estudo da Kirin Beer University em 2017, o Brasil é o 3º maior produtor e consumidor de cerveja no mundo. Em 2017 foram produzidos 14 milhões de metros cúbicos e consumidos 12,56 milhões de metros cúbicos de cerveja no Brasil.

O processo de produção de cerveja pode ser dividido essencialmente em seis etapas. A primeira é a moagem do malte, na qual há a exposição do amido presente no interior do endosperma do grão de malte. Em seguida é feita mosturação ou brasagem, mistura-se água e malte moído, com o objetivo de solubilizar as substâncias do malte em água e fazer a ativação das enzimas, que vão converter o amido em açúcares menores. É feita filtração ou clarificação do mosto, fazendo-se a separação do bagaço de malte do líquido doce (mosto filtrado). É adicionado lúpulo ao mosto filtrado, então ele é fervido, objetivando-se a esterilização do mosto e a evaporação dos compostos indesejados. Feita a fervura do mosto é feito o seu tratamento, com a retirada do precipitado de partículas, resfriamento e aeração do mosto. O mosto clarificado é fermentado pelas leveduras, produzindo a “cerveja verde”, que segue para a etapa de maturação, onde vai ocorrer o aprimoramento de sabor e odor da bebida, além da clarificação da cerveja pela sedimentação do fermento e das proteínas no fundo do tanque (DRAGONE; SILVA, 2010).

As microcervejarias tem ganhado cada vez mais espaço no mercado, com a produção de pequenas quantidades de cervejas, produzidas com ingredientes especiais e maior quantidade de malte por hectolitro. Os produtos oferecidos por esse tipo de negócio são chamados de “cervejas especiais” ou “cervejas premium”, e buscam atender consumidores que buscam por bebidas diferenciadas (SEBRAE, 2017).

O cenário favorável de mercado para as cervejas artesanais vem impondo uma exigência pela melhor qualidade das cervejas consumidas. Apesar do interesse dos cervejeiros brasileiros nos diferentes aspectos do controle de qualidade das leveduras, tais como a viabilidade e vitalidade celulares, são poucas as empresas de biotecnologia que disponibilizam serviços desse gênero no país. As leveduras são responsáveis pela fermentação do mosto cervejeiro, que é uma etapa de extrema importância do processo de produção de cerveja. A fermentação só pode ser realizada por leveduras viáveis e metabolicamente ativas. Consequentemente, quanto maior o

número de leveduras viáveis e fisiologicamente competentes no mosto, maior será a taxa de produção de álcool ou de atenuação de açúcares (SUHRE, 2014). Por questões econômicas, as leveduras são reutilizadas em diferentes fermentações, sendo que a cada fermentação realizada por determinada levedura é denominada como uma geração. O fermento para a fabricação de cerveja pode ser usado até a sexta geração (INSTITUTO DA CERVEJA, 2017). O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção de cerveja do tipo lager, da primeira à quarta geração, avaliando a eficiência de sua reutilização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

O decreto n.6871, publicado no Diário Oficial da União de 04 de abril de 2009, regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas.

De acordo com a Legislação Brasileira, citado no Artigo 36 do referido decreto, “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo.”

Há uma classificação segundo a Legislação Brasileira, conforme o Artigo 38, que organiza as cervejas, relacionando-as quanto: ao extrato primitivo, à cor, ao teor alcoólico, à proporção de malte de cevada e à fermentação (BRASIL, 2009). Essas classificações são mostradas a seguir:

I – quanto ao extrato primitivo:

O teor de extrato primitivo é a quantidade de substâncias dissolvidas do mosto, que deu origem à cerveja, expressa em porcentagem em peso, ou seja, é a densidade original do mosto, antes da fermentação (GIBRAM, 2014). A relação entre o teor de extrato primitivo e os diferentes tipos de cerveja é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre o tipo de cerveja e o teor de extrato primitivo

Tipo de cerveja	Teor de extrato primitivo (%em peso)
Leve	$5 \leq \text{extrato}_{\text{primitivo}} < 10,5$
Comum	$10,5 \leq \text{extrato}_{\text{primitivo}} < 12$
Extra	$12 \leq \text{extrato}_{\text{primitivo}} \leq 14$
Forte	$\text{extrato}_{\text{primitivo}} > 14$

Fonte: Adaptado de Brasil (2009)

II - quanto à cor:

A classificação quanto à cor é de acordo com padronização da EBC (*European Brewery Convention*), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Relação entre o tipo de cerveja e a cor em unidades EBC

Tipo de cerveja	Cor (unidades EBC)
Clara	Inferior a 20
Escura	Superior a 20

Fonte: Adaptado de Brasil (2009)

A cerveja também pode ser classificada como colorida, quando há a adição de corantes, e a coloração apresentada é diferente das definidas no padrão EBC.

III - quanto ao teor alcoólico

A categorização com relação ao teor alcoólico define a cerveja como sem álcool e com álcool, sendo que na cerveja sem álcool há um limite 0,5% em volume de conteúdo de álcool. Para cervejas sem álcool não é obrigatório a declaração de conteúdo alcoólico no rótulo, e nas cervejas com álcool deve-se obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume.

IV - quanto à proporção de malte de cevada

Em relação à proporção de malte de cevada, as cervejas podem ser classificadas como:

- Cerveja puro malte: possui 100% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;
- Cerveja: aquela que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual a 50% em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;
- “Cerveja de ...”: seguida do nome do vegetal predominante, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior que 20% e menor que 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.

V - quanto à fermentação

Com relação ao processo fermentativo, tem-se a seguinte classificação:

- Baixa fermentação: cerveja obtida pela ação da levedura cervejeira que se deposita no fundo da cuba durante ou após a fermentação tumultuosa. Geralmente, ocorre entre 6 e 14 °C e origina as cervejas do tipo lagers (VIDGREN et al, 2010);

- Alta fermentação: cerveja obtida pela ação da levedura cervejeira que sobe para a superfície do líquido na fermentação tumultuosa. Geralmente, ocorre entre 15 e 25 °C e origina as cervejas do tipo ale (AMORIM, 2013).

As cervejas podem ser denominadas, de acordo com seu tipo, em: Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, observadas as características do produto original (BRASIL, 2009).

De forma simplificada, pode-se considerar a categorização em 3 grupos: Lagers, Ales e Lambics.

Lager é um tipo de cerveja de baixa fermentação. Se enquadra na classificação de cervejas mais leves, com diferentes teores alcoólicos. (DRAGONE; SILVA, 2010). É o tipo de cerveja mais produzida no Brasil, representando 99% das vendas de cerveja no país. Entre seus estilos mais conhecidos, têm-se as Pilsen e American Lager. (SILVA, 2005).

Ale é uma cerveja de alta fermentação. É uma bebida mais aromática, geralmente escura e com mais amargor devido a maior quantidade de lúpulo (DRAGONE; SILVA, 2010). Alguns estilos ale são: English Pale Ale, American Ale, Porter, Stout, Indian Pale Ale (IPA), Weiss ou Weizen, Witbier, Weizenbock.

A Lambic é uma cerveja de origem belga, produzida por fermentação espontânea com microrganismos presentes no meio ambiente. A fermentação pode ser classificada em alta quanto baixa. Uma particularidade marcante deste tipo de cerveja é a acidez, devido a fermentação espontânea por agentes naturais. Uma autêntica Lambic é produzida por um *blend* de cervejas envelhecidas em barris de carvalho, aos quais são adicionadas frutas vermelhas, que conferem um sabor e aroma frutados ao produto, além da coloração avermelhada (DRAGONE; SILVA, 2010). Alguns subtipos de Lambics são: Lambic-Fruit, Straight, Gueuze e Faro (SILVA,2005).

2.1.1 História da cerveja no Brasil e no Mundo

Estima-se que a produção de cerveja teve seu início por volta de 8000 A.C., na Suméria. Sabe-se que a bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais

e difundiu-se juntamente com as culturas do milho, centeio e cevada, que eram a base da alimentação dos povos da Suméria, Babilônia e Egito (AQUARONE et al., 2001). Os egípcios foram os responsáveis pela disseminação da cultura cervejeira para outros povos orientais, fazendo com que ela chegasse a Europa e, mais adiante, para o resto do mundo (DRAGONE; SILVA, 2010).

A cerveja era produzida inicialmente por padeiros, devido a sua relação com a constituição das matérias-primas (grãos de cereais e levedura). A técnica consistia em deixar a cevada de molho até a germinação, a qual era posteriormente moída de forma grosseira e moldada em bolos, nos quais se adicionavam a levedura. Esses bolos eram parcialmente assados e desfeitos, para em seguida, serem colocados em jarras contendo água, objetivando assim a fermentação do líquido. Esta cerveja rústica ainda é produzida no Egito com o nome de Bouza (DRAGONE; SILVA, 2010).

Na Idade Média, século XIII, os cervejeiros alemães foram os primeiros utilizar o lúpulo na cerveja, conferindo as características básicas da bebida atual (AQUARONE et al., 2001). Em 1516, o Duque Guilherme IV da Bavária (Alemanha), aprovou a lei *Reinheitsgebot*, conhecida como Lei da Pureza alemã, relacionada com a fabricação de cerveja, que deveria ser produzida apenas com cevada, lúpulo e água (DRAGONE; SILVA, 2010).

No Brasil, o costume de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, em 1808, quando a família real portuguesa se mudou para o território brasileiro. Nessa época não havia produção local e a bebida era restrita aos nobres, então, a cerveja consumida era importada de países europeus. Em aproximadamente 1836, os imigrantes começaram a produzir cerveja para o comércio local, usando tanto mão-de-obra escrava quanto livre, de acordo com informações publicadas no Jornal do Comércio da cidade do Rio de Janeiro (GIBRAM, 2014).

Em 1853 Henrique Leiden fundou sua fábrica de cervejas em Petrópolis, que foi assumida 10 anos depois por Henrique Kremer, responsável pela expansão da fábrica. A fábrica foi rebatizada em 1898 como Cervejaria Bohemia (BOHEMIA, 2019).

Em 1888 foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a “Manufactura de Cerveja Brahma & Villeger & Companhia” e alguns anos depois, em 1891 na cidade de São Paulo, a “Companhia Antartica Paulista”. Em 1999 ocorreu a união das empresas Brahma e Antártica, originando a Ambev - Companhia de Bebidas das Américas. Em 2004 ocorreu a fusão da Ambev com a cervejaria belga Interbrew, com a criação da Inbev. Em 2008 a Inbev fez uma oferta e comprou a Anheuser-Busch, maior cervejaria dos Estados Unidos. Com esta aquisição

a Inbev tornou-se a maior cervejaria do mundo, e o nome da empresa passou a ser Anheuser-Busch InBev (AMBEV, 2019).

2.1.2 Mercado mundial e nacional de cervejas

A Kirin Beer University fez um estudo sobre a produção e o consumo de cerveja no ano de 2017, os resultados são mostrados na Tabela 3. O consumo anual per capita, por país, é mostrado na Tabela 4.

Tabela 3 – Produção e consumo anual dos maiores mercados cervejeiros em 2017

País	Produção anual (milhões de metros cúbicos)	Consumo anual (milhões de metros cúbicos)
China	39,788	40,143
Estados Unidos	21,775	23,956
Brasil	14,000	12,565
México	11,000	8,532
Alemanha	9,301	8,218
Rússia	7,440	8,008
Japão	5,247	5,116
Reino Unido	4,405	4,405
Vietnã	4,375	4,356
Polônia	4,050	3,798
Espanha	3,720	4,050

Fonte: Adaptado de *Kirin Beer University* (2018)

A produção mundial de cerveja em 2017 foi de 190,9 milhões de metros cúbicos, e foi 0,1 % menor em relação ao ano de 2016. A China tem a maior produção de cerveja pelo décimo sexto ano consecutivo, porém, em relação a 2016, a produção teve um decréscimo de 3,9%, o que pode ser explicado ao amadurecimento e saturação da demanda dos consumidores, além de uma alta nos preços do produto (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2018).

A quantidade de cerveja consumida mundialmente em 2017 foi de 186,72 milhões de metros cúbicos. Além de maior produtora de cerveja, a China é também o país que mais

consome a bebida, sendo que em 2017 o consumo foi de 40,143 milhões de metros cúbicos. A China ocupa o posto de país que mais consome cerveja pelo décimo quinto ano consecutivo. Em relação a 2016, Tailândia e Filipinas foram os países que tiveram a maior taxa de crescimento de consumo de cerveja, com 15,8% e 13,8%, respectivamente. Este fato deve-se ao crescimento da economia nesses países (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2018).

Tabela 4 - Consumo per capita por país em 2017

Posição no ranking	País	Consumo anual per capita (litros)
1	República Checa	183,1
2	Áustria	106,6
3	Alemanha	100,1
4	Polônia	99,4
5	Romênia	95,2
6	Irlanda	94,9
7	Espanha	87,3
8	Namíbia	83,2
9	Eslováquia	81,1
10	Estônia	80,5

Fonte: Adaptado de *Kirin Beer University* (2018)

A República Checa lidera o ranking de consumo de cerveja per capita pelo 25º ano consecutivo. Dos 35 países que foram estudados, 12 tiveram aumento dos níveis de consumo per capita em relação ao ano de 2016 (KIRIN BEER UNIVERSITY, 2018).

No Brasil, o mercado cervejeiro é altamente concentrado, com aproximadamente 98% do setor dominado por 4 empresas: AB-Inbev (67%), Grupo Petrópolis (13%), Heineken (10%) e Brasil Kirin (8%) (FLANDERS INVESTMENT & TRADE, 2015). Em 2017, a Heineken adquiriu a Brasil Kirin por R\$ 2,2 bilhões, e passou a ser segunda maior cervejaria do Brasil, com cerca de 20% em participação de mercado (ABRALATAS, 2017). Na Figura 1 são mostradas as principais marcas de cerveja das 3 cervejarias que dominam o mercado cervejeiro no Brasil.

Figura 1- Principais marcas das cervejarias que dominam o mercado brasileiro



Fonte: Abралatas (2017).

As microcervejarias tem ganhado cada vez mais espaço no mercado, com a produção de pequenas quantidades de cervejas, produzidas com ingredientes especiais e maior quantidade de malte por hectolitro. Os produtos oferecidos por esse tipo de negócio são chamados de “cervejas especiais” ou “cervejas premium”, e buscam atender consumidores que buscam por bebidas diferenciadas (SEBRAE, 2017). De acordo com Abracerva (2019), estima-se que a produção de cerveja artesanal representa 2,5 a 2,7% da produção total de cerveja, sendo que a quantidade fabricada está entre 352 e 380 milhões de litros por ano.

No ano de 2018 haviam 889 cervejarias registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, sendo que 835 é o número de cervejarias artesanais independentes. Das 889 cervejarias registradas, 186 estão no Rio Grande do Sul, 165 em São Paulo e 115 em Minas Gerais, os estados com maior quantidade no país. O número de produtos registrados (chopes e cervejas) por estas cervejarias chegou a 169,681 mil (ABRACERVA,2019).

2.1.3 Matérias-primas

As matérias-primas para a produção de cerveja são: água, malte, lúpulo e levedura (Figura 2) (DRAGONE; SILVA, 2010).

Figura 2 - Água potável, malte de cevada, lúpulo e levedura, matérias-primas essenciais à produção de cerveja.



Fonte: Gibram (2014).

2.1.3.1 Água

A água é, pela quantidade, a principal matéria-prima durante um processo cervejeiro, pois representa aproximadamente 92 a 95% do peso da cerveja (DRAGONE; SILVA, 2010). Existem algumas condições para obtenção de água cervejeira de qualidade: (1) seguir padrões de potabilidade, (2) apresentar alcalinidade de 50 mg/L ou menor e (3) possuir concentração de cálcio por volta de 50 mg/L (DRAGONE; SILVA, 2010).

2.1.3.2 Malte

Malte (Figura 3) é um termo técnico que define a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal (cevada, trigo, milho, aveia, etc.), sob condições controladas. O malte utilizado em cervejarias é obtido de cevada (DRAGONE; SILVA, 2010). A maltagem consiste na germinação dos grãos de cevada, sob temperatura e umidade controladas, com a interrupção da germinação antes do grão se tornar uma nova planta. Nesse processo, o amido do grão apresenta-se em cadeias menores que na cevada, tornando-se menos duro, mais solúvel e contendo enzimas fundamentais para o processo cervejeiro, como a α -amilase e β -amilase (SILVA, 2005). A Tabela 5 mostra a composição média do grão de cevada comparado com o

malte, ou seja, grão de cevada após o processo de maltagem. As quantidades de α -amilase atividade proteolítica são calculadas em unidades de atividade catalítica.

Figura 3 - Grãos de malte



Fonte: We Consultoria (2019).

Tabela 5 - Composição média do grão de cevada e do malte

Características	Cevada	Malte
Massa do grão (mg)	32 - 36	29 - 33
Umidade (%)	10 - 14	4 - 6
Amido (%)	55 - 60	50 - 55
Açúcares (%)	0,5 - 1,0	8 - 10
Nitrogênio total (%)	1,8 - 2,3	1,8 - 2,3
Nitrogênio solúvel (% de N total)	10 - 12	35 - 50
Poder diastásico, °Lintner	50 - 60	100 - 250
α -amilase, (U)	traços	30 - 60
Atividade proteolítica (U)	traços	15- 30

Fonte: Cereda (1985)

2.1.3.3 Lúpulo

O lúpulo, Figura 4, é uma planta trepadeira de 5 a 7 metros de altura, classificada como *Humulus lupulus*, da família *canabaceps*, que possui flores masculinas e femininas em plantas diferentes. Para o processo cervejeiro, o lúpulo utilizado vem das flores femininas das plantas

de lúpulo, que contêm a substância lupulina, obtida durante a fecundação, responsável por atribuir o amargor e aroma característicos da bebida alcoólica. Outros benefícios do lúpulo para a cerveja são: (SENAI, 2014 e DRAGONE; SILVA, 2010).

- diferenciação de cervejas, a partir do nível de aroma e amargor que cada lúpulo transmite a bebida;
- auxílio na diminuição da formação de espuma durante o processo de fervura;
- utilização como agente bactericida – conservante – e coagulante de proteínas;
- estabilidade do sabor e da espuma da cerveja.

Figura 4 - Flor de lúpulo, matéria-prima responsável pelo sabor e aroma característico da cerveja



Fonte: Beleza da Terra (2019).

O lúpulo pode ser comercializado em flores secas (in natura), pellets ou em extratos. A primeira emprega a flor naturalmente, sendo que é pouco usada nos processos cervejeiros realizados atualmente. Quando processado em pellets, as flores de lúpulo são processadas, moídas e comprimidas em pellets (granulados cilíndricos com 6 - 8 mm de diâmetro e 10 - 14 mm de comprimento, com altas densidades e com baixos índices de umidade). São armazenados resfriados e em embalagens de alumínio a vácuo, para minimizar a sua oxidação. Essa é a forma que possibilita o manuseio mais fácil durante o processo de produção de cerveja. Outra maneira de comercialização é em extrato, onde é feita a extração de resinas e óleos do lúpulo através de solventes orgânicos. As desvantagens desse processo é que compostos desejáveis podem ser extraídos do lúpulo e os compostos aromáticos evaporam mais rápidos em relação as flores ou pellets, sendo que o lúpulo nessa forma não fornece quase nenhum aroma (SENAI, 2014).

Basicamente, o lúpulo pode ser dividido em dois tipos: lúpulos aromáticos e de amargor (SILVA, 2005). A Tabela 6 mostra a composição bioquímica do lúpulo em flores:

Tabela 6 - Composição bioquímica do lúpulo

Substâncias	Quantidades (%)
Resinas totais (alfa + beta)	12 - 22
Proteínas	13 - 18
Celulose	10 - 17
Polifenóis	4 - 14
Umidade	10 - 12
Sais minerais	7 - 10
Açúcares	2 - 4
Lipídios	2,5 - 3,0
Óleos essenciais	0,5 - 2,0
Aminoácidos	0,1 - 0,2

Fonte: Tschope adaptado (2001)

Dentre todas as substâncias presentes no lúpulo, para o processo cervejeiro as mais importantes são as resinas (ácidos-alfa e ácidos-beta) juntamente com os óleos essenciais (SENAI, 2014):

- Ácidos-alfa ou humulones: contidos numa concentração de 2 - 16% no lúpulo, com propriedades antibióticas e bactericidas e são responsáveis por dar amargor à cerveja (SENAI, 2014);
- Ácidos-beta ou lupulones: contidos numa concentração de 2 - 10% no lúpulo, que tem contribuição no amargor da cerveja (SENAI, 2014);
- Óleos essenciais: são uma mistura de componentes, principalmente hidrocarbonetos da família dos terpenos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois (LEWIS e YOUNG, 2002). São responsáveis pelo aroma e sabor da cerveja (SENAI, 2014).

O lúpulo deve ser cultivado em regiões de clima temperado, condições que ocorrem entre 35° e 55° de latitude (SENAI, 2014). Os principais produtores mundiais de lúpulo são a Alemanha, os Estados Unidos, a Etiópia, a China e a República Checa (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, 2014). Na Tabela 7 são apresentadas algumas variedades de lúpulo, seus países de cultivo e teores de alfa ácidos.

Tabela 7 - Variedades de lúpulo no mercado por país de cultivo e teor médio de α -ácidos do lúpulo em flor

País de cultivo	Variedade presente no mercado	Teor de α-ácidos (%)
Alemanha	Hallertau Magnum	11 - 16
	Hallertau Merkur	12 - 14
	Hallertau Mittelfruh	3 - 5,5
	Tettnang	3 - 6
	Perle	7 - 9,5
	Spalt	2 - 5,5
Inglaterra	Admiral	13 - 16
	Fuggle	3 - 5,6
	Kent Golding	4,5 - 6,5
	Target	9,5 - 12,5
EUA	Cascade	5,5 - 9
	Chinook	12 - 14
	Cluster	5,5 - 9
	Nugget	12 - 14
	Willamette	4 - 6

Fonte: Adaptado de Homini Lúpulo (2019) e Senai (2014).

2.1.3.4 Adjuntos

Os adjuntos podem ser considerados como carboidratos não maltados de composição apropriada e propriedades que beneficiam de forma suplementar o malte de cevada. Podem estar na forma de cereais, sendo os mais comuns o milho, o arroz e o trigo, além de outros como o sorgo, a aveia, o triticale. Esses elementos são adicionados na fase de fabricação do mosto, proporcionando material fermentável adicional além da redução de custos (DRAGONE; SILVA, 2010).

Outra forma da utilização de adjuntos é na forma de açúcares (cristalizados ou xarope). Estes possuem a vantagem de facilitar a fermentação, aumentando o teor alcóolico da cerveja e deixando-a mais clara. Uma desvantagem é que altas concentrações de glicose podem causar efeito de inibição conhecido como fermentação lenta ou fermentação por arraste (DRAGONE; SILVA, 2010).

Fontes de carboidratos de origem vegetal também são utilizados como adjuntos cervejeiros. Vegetais como batata, mandioca, beterraba e caldo de cana já foram usados com o propósito de substituir parte do malte e também como aromatizantes da bebida. Cervejarias e microcervejarias já tem utilizado o limão, morango, kiwi e maçã como aromatizantes da bebida alcóolica (SILVA, 2005).

A legislação brasileira permite uma quantidade máxima de 45% de adjuntos, caso a quantidade seja maior que a permitida, a cerveja deve ser nomeada como “cerveja de [adjunto utilizado]” (BRASIL, 2009).

O uso de adjuntos na indústria tem diferentes finalidades. Grandes cervejarias utilizam adjuntos para baratear os custos do processo, enquanto microcervejarias adicionam adjuntos no sentido de procurar características diferentes no produto final. Na maioria das vezes as microcervejarias nem mesmo utilizam adjuntos, produzindo cervejas de puro malte, que têm atributos sensoriais marcantes, de maneira geral (GIBRAM, 2014).

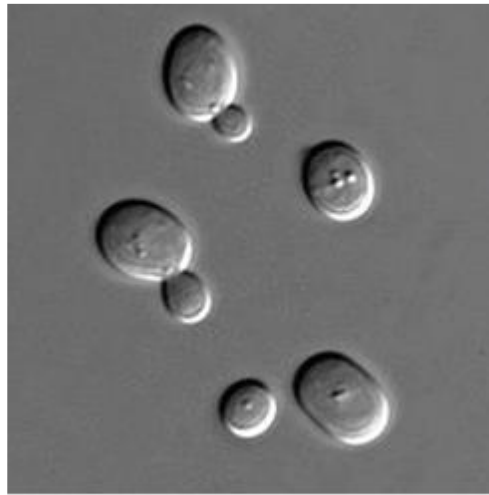
2.1.3.5 Levedura

As leveduras são fungos unicelulares, pertencentes ao domínio das eucarióticas e ao Reino Fungi. As leveduras mais utilizadas em cervejaria são de duas espécies do gênero *Saccharomyces*: *Saccharomyces cerevisiae*, (alta fermentação, típicas das ales) e *Saccharomyces uvarum* (baixa fermentação, típicas das lagers) (SENAI, 2014).

O tipo de levedura utilizada influencia diretamente nas características de sabor e aroma. Outros fatores podem afetar o sabor do produto final, como a temperatura e o pH de fermentação, o tipo e a proporção de adjunto, o modelo de fermentador e a concentração do mosto (DRAGONE; SILVA, 2010).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5), normalmente a mais utilizada no processamento da cerveja, é composta por microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, produzem energia a partir de compostos de carbono – carboidratos, tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias. Em presença do oxigênio as leveduras multiplicam-se e em condições anaeróbias, especialmente importante no processo cervejeiro, as células das leveduras incorporam açúcares simples, como glicose e maltose, e produzem dióxido de carbono e álcool como produtos residuais, além de ésteres, álcoois superiores, cetonas, vários fenóis e ácidos graxos. Outras leveduras como as dos gêneros *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Candida*, *Brettanomyces*, assim como outras espécies, estão relacionadas com a deterioração da cerveja e são geralmente denominadas leveduras selvagens, no sentido de serem diferentes das cultivadas no tanque de fermentação.

Figura 5 - Levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: Held (2010).

Atualmente há conhecimento sobre todo o processo de fermentação alcoólica, no qual as leveduras são responsáveis. Porém, no passado não era assim, por muito tempo a fermentação alcoólica foi considerada divina e mágica (MORADO, 2009). Posteriormente, foi explicada como uma reação química espontânea decorrente do contato com o ar, sendo que a levedura era considerada um subproduto (SCHLENK, 1985). Com os estudos de Louis Pasteur, por volta de 1860, descobriu-se os conceitos sobre a teoria fisiológica da fermentação por microrganismos, a dissolução de oxigênio do mosto, a especificação de um grande número de microrganismos contaminantes, a pasteurização e a conservação da cerveja através do aquecimento. Nesta época, Pasteur convenceu os produtores de cerveja a utilizarem culturas selecionadas de leveduras para manter uma padronização na qualidade da bebida alcoólica (PALMER, 2006).

As leveduras, comumente denominadas como fermento pelos cervejeiros, podem ser classificadas em dois tipos, de alta ou baixa fermentação. As leveduras de baixa fermentação trabalham em uma faixa de temperatura de 7 a 15 °C e sua zona de atuação é a partir do fundo do tanque do fermentador, sendo considerada uma levedura de fundo. Seu tempo de fermentação é de 7 a 10 dias. Já as leveduras de alta fermentação, trabalham com temperaturas entre 18 e 22 °C e sua zona de atuação é na superfície do mosto no fermentador, sendo conhecida como levedura de superfície. A fermentação ocorre num tempo de 3 a 5 dias (DRAGONE; SILVA, 2010).

Existem duas formas de uso das leveduras no processo cervejeiro: seca e líquida. A levedura seca é aquela que passa por um processo de desidratação para melhorar o armazenamento. Para melhores resultados, ela deve ser reidratada antes do uso. A levedura líquida é comercializada em embalagens metalizadas, contendo 50 mL do produto. Os pacotes de levedura na forma líquida apresentam bem menos células de cepas em relação aos pacotes de fermento seco (PALMER, 2006).

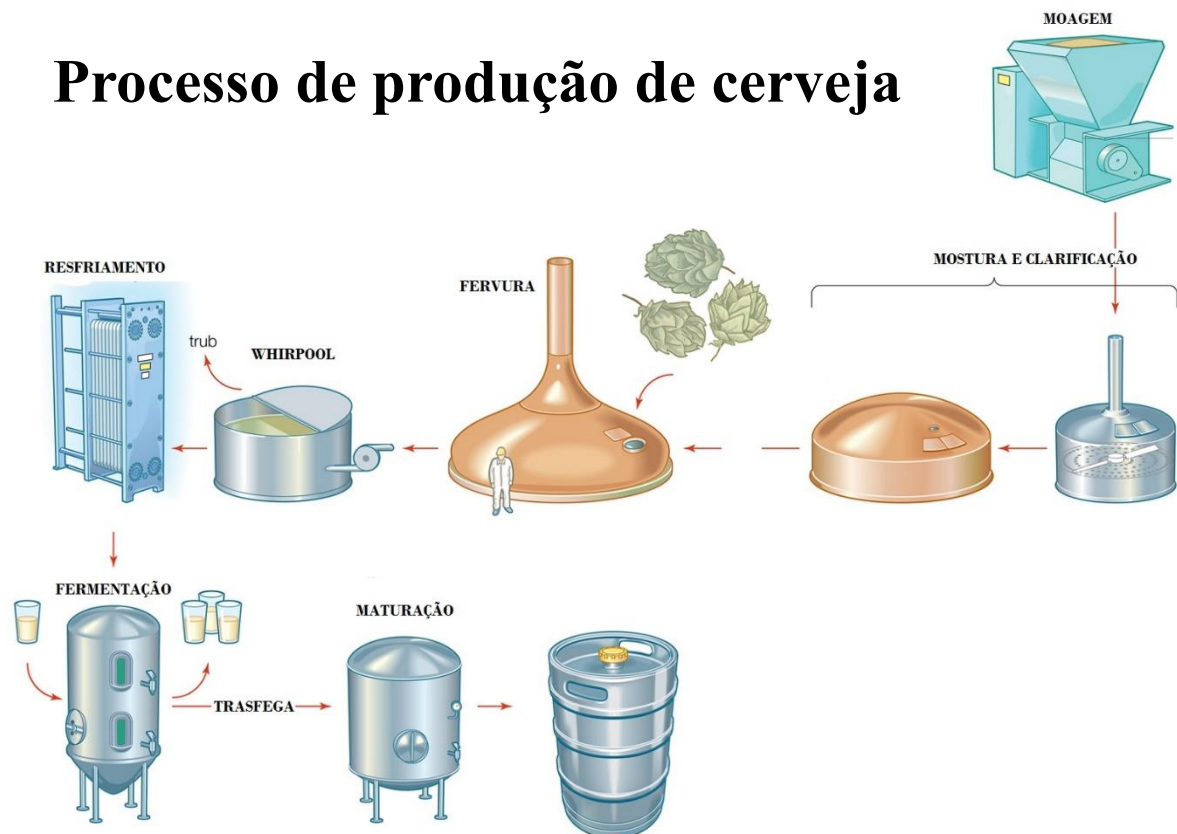
Na fermentação a levedura converte açúcar em álcool etílico e dióxido de carbono, além de outros compostos de sabor como ésteres, álcoois superiores, cetonas, vários fenóis e ácidos graxos. Ésteres são compostos responsáveis por notas frutadas na cerveja, fenóis causam notas de especiarias, e em combinação com o cloro, notas medicinais. O diacetil é um composto cetônico que pode ser benéfico em quantidades reduzidas, porém é um composto extremamente instável, podendo fornecer sabores ligeiramente desagradáveis de manteiga. Álcoois superiores são álcoois com mais de 2 carbonos em sua estrutura, ou seja, compostos de maior peso molecular, e são os principais contribuintes para as “ressacas”. Os ácidos graxos, embora participem das reações químicas que produzem os compostos desejados, também tendem a oxidar em cervejas antigas e produzem off-flavors (sabores desagradáveis, causados por erros do processo ou contaminação bacteriana) (PALMER, 2006).

Por último, destaca-se que a levedura não é usada somente com o objetivo de fermentar o mosto e produzir a cerveja. Assim como a água, o malte e o lúpulo, a levedura é essencial para na definição do estilo e sabor da bebida alcóolica (PALMER, 2006).

2.1.4 Processo de produção

O processo de produção de cerveja pode ser dividido essencialmente em seis etapas: moagem do malte; mosturação ou brassagem; filtração ou clarificação do mosto; fervura do mosto; tratamento do mosto; fermentação e maturação (DRAGONE; SILVA, 2010). O fluxograma do processo é mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do processo de produção de cerveja



Fonte: Adaptado de Cerveja Henrik Boden (2009)

2.1.4.1 Moagem do malte

A moagem do malte é um processo em que se dá início à transformação do malte para ser convertido em cerveja. Essa etapa tem influência direta sobre a velocidade das transformações físico-químicas, o rendimento, o tempo de clarificação do mosto e a qualidade do produto final. O objetivo é a redução do grão de malte de modo uniforme, para obter o rompimento da casca no sentido longitudinal, expondo dessa forma o amido presente no interior do endosperma, a fim de facilitar o trabalho das enzimas no processo de mosturação (DRAGONE; SILVA, 2010).

Na moagem, o grão do malte não deve ficar em forma de farinha (granulometria muito fina) para evitar a formação de pastas, o que torna a filtração lenta. No caso contrário, com a presença de grãos inteiros, pode ocorrer a dificuldade da hidrólise do amido. A moagem ideal, Figura 7, é aquela na qual há total separação do endosperma e da casca, todos os grãos encontram-se moídos e há pouca farinha. Tem-se que a moagem adequada tem a seguinte granulometria, em percentuais: 20–25% de cascas, 45–65% de sêmola e 15–25% de farinha. (SENAI, 2014 e DRAGONE; SILVA, 2010).

Figura 7 - Grãos de malte moídos com granulometria ideal aos processos subsequentes



Fonte: Gibram (2014).

2.1.4.2 Brassagem ou mosturação

A brassagem ou mosturação consiste na mistura do malte moído com água em temperatura programada, conforme um programa previamente estabelecido, com o objetivo de solubilizar as substâncias do malte em água e ativar as enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentáveis (DRAGONE; SILVA, 2010).

Nessa etapa, diversas enzimas, contidas nos grãos dos cereais maltados, por influência dos parâmetros de pH e temperatura ótimos, principalmente, dão início à hidrólise do amido, transformando-o em maltoses e demais açúcares, outras substâncias também são originadas como: proteínas, vitaminas, taninos, etc. Cada enzima tem faixas de pH e temperatura ótima (Tabela 8) que irão auxiliar a atuação das mesmas em partes distintas das moléculas de amido, as quais serão quebradas em açúcares com tamanhos diferentes, devido à existência de cadeias maiores ou menores de carbono (PALMER, 2006).

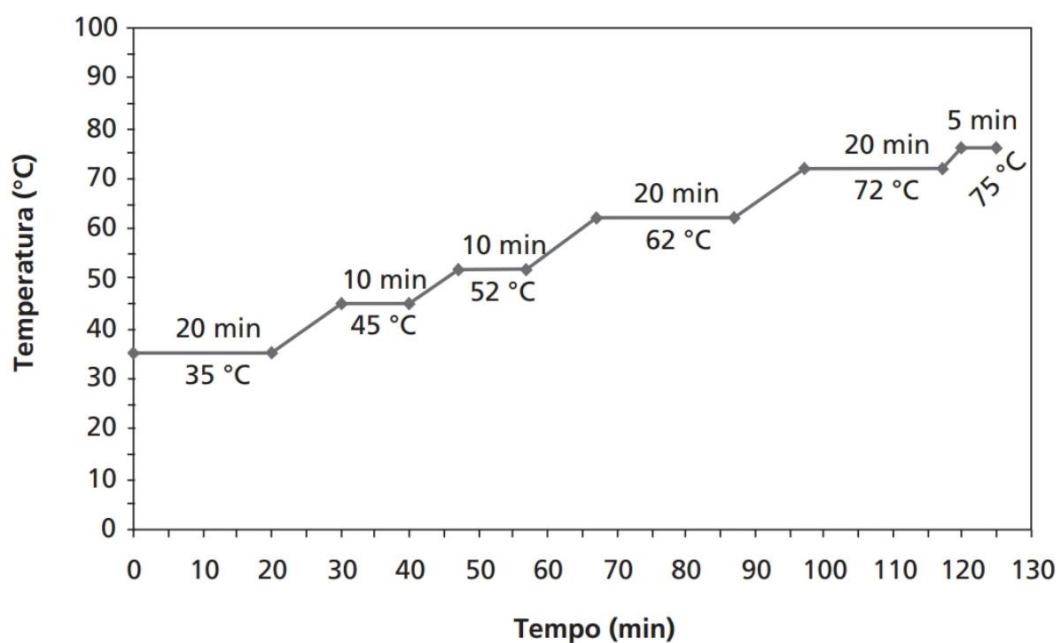
Tabela 8 - Temperatura e pH de atuação das enzimas

Enzimas	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Substrato
Hemicelulases	40-45	4,5-4,7	Hemicelulose
Exopeptidases	40-50	5,2-8,2	Proteínas
Endopeptidases	50-60	5,0	Proteínas
Dextrinase	55-60	5,1	Amido
Beta-amilase	60-65	5,4-5,6	Amido
Alfa-amilase	70-75	5,6-5,8	Amido

Fonte: Tschope (2001).

A escolha do programa de tempo/temperatura (Figura 8) que vai ser aplicado na atuação das enzimas depende da composição e tipo de cerveja desejado, de acordo com a composição de açúcares fermentáveis que deseja-se no mosto ou da quantidade de substâncias proteicas que pretende-se na cerveja. A atuação das enzimas produz um mosto que se compõe de 70-80% de carboidratos fermentáveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose (DRAGONE; SILVA, 2010).

Figura 8 - Variação da temperatura em função do tempo, durante o processo de mosturação.



Fonte: Dragone e Silva (2010).

O malte moído é misturado com água (água primária) a 35 °C na proporção de 1:4, em tanques de aço inoxidável, também conhecidos como tinas, equipado com agitadores, aquecimento, controlador e indicador de temperatura e isolamento térmico (SILVA, 2005).

Na fase final da brassagem, a 72 °C, é feito o teste com solução de iodo a 0,2 mol/L, para verificar se todo o amido do mosto foi hidrolisado e transformado em açúcares. Após a confirmação da completa hidrólise do amido, pela ausência da coloração roxo-azulada, característica da reação entre o iodo e o amido, o mosto é aquecido até 75 °C, a fim de inativar a ação das enzimas presentes, preservando o perfil de açúcares obtidos (DRAGONE; SILVA, 2010).

2.1.4.3 Filtração ou clarificação do mosto

A filtração ou clarificação do mosto, solução contendo os açúcares resultantes da mosturação mais os sólidos indesejáveis, consiste na separação dos sólidos indesejáveis, bagaço de malte, do líquido doce. Essa operação é realizada em um recipiente chamado tina de filtração, construído em aço inoxidável equipado com agitador, disco filtrante PAKSCREENS (fundo falso com ranhuras), bomba centrífuga e isolamento térmico. A casca do malte funciona como meio filtrante nesse processo. Após a separação das partes, a camada filtrante é lavada com certa quantidade de água (denominada água secundária) à 75 °C, com o objetivo de aumentar a extração de açúcar remanescentes na casca e conseqüentemente, aumentar o rendimento do processo (SILVA, 2005).

2.1.4.4 Fervura do mosto

Nesta etapa é adicionado lúpulo ao mosto filtrado, que é fervido, objetivando-se a inativação das enzimas, esterilização do mosto, coagulação das proteínas, extração dos compostos aromáticos e amargos do lúpulo, formação das substâncias constituintes de aroma e sabor, evaporação da água excedente e dos componentes aromáticos indesejados ao produto final (DRAGONE; SILVA, 2010).

O lúpulo é adicionado nessa etapa do processo para estabilizar o mosto e dar sabor de amargor na cerveja. Em muitos casos, adiciona-se o lúpulo no início e no final da fervura. Quando deseja-se ter uma cerveja mais aromática, adiciona-se lúpulo aromático na parte final

da fervura, pois os óleos essenciais são voláteis e evaporam em altas temperaturas (CEREDA, 1983).

O mosto permanece em fervura até alcançar a concentração de açúcar desejada para o início da fermentação, por um tempo de 60 a 90 minutos, permitindo uma evaporação máxima de até 10 % do volume inicial de mosto (SILVA, 2005).

2.1.4.5 Tratamento do mosto

Após a fervura, o mosto deve passar pelas etapas de retirada do precipitado, resfriamento e posterior aeração. Na primeira etapa, há a precipitação dos complexos de proteínas, resinas e taninos denominados de *trub*, com o uso de forças centrípetas através da rotação forçada do meio, sendo que o *trub* sedimenta no fundo do tanque e é separado do mosto límpido (DRAGONE; SILVA, 2010).

Após a retirada do *trub*, o mosto clarificado é resfriado de aproximadamente 95 °C a uma temperatura entre 8 e 20 °C, de acordo com o tipo de fermentação. O salto de temperatura não pode ser excessivamente rápido, por isso, em grandes cervejarias são projetados resfriadores que resfriam o mosto de 95 °C a temperatura de fermentação escolhida em 60 minutos, enquanto em microcervejarias, o resfriamento é feito em duas etapas utilizando trocadores de calor de placas (SENAI, 2014).

É adicionado oxigênio na linha de mosto frio, à saída do trocador de calor, com o objetivo de obter uma concentração de oxigênio dissolvido de 20 ppm, no tanque de fermentação (DRAGONE; SILVA, 2010). Esta etapa é necessária para acontecer a multiplicação da levedura, que acontece na presença de oxigênio, para então a levedura fazer seu trabalho, que é consumir os açúcares presentes no mosto (SENAI, 2014).

2.1.4.6 Fermentação

A fermentação se inicia quando o mosto entra em contato com a levedura. O principal objetivo da levedura é a conversão dos açúcares do mosto em etanol e gás carbônico, sob

condições anaeróbicas (DRAGONE; SILVA, 2010). Industrialmente, ocorre em tanques fechados, revestidos por uma camisa de resfriamento, pela qual passa um fluido refrigerante, que permite controlar a temperatura do processo (SENAI, 2014).

O processo de fermentação para a produção de cerveja tem forte dependência de mecanismos celulares que controlam a mitose e o metabolismo de nutrientes presentes no mosto cervejeiro, sendo estes influenciados por diversas condições ambientais como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, disponibilidade de açúcares fermentáveis e outros nutrientes (CARVALHO; BENTO; SILVA, 2006).

A quantidade do fermento varia de acordo com o teor de extrato no mosto, aeração e temperatura de fermentação. Na maioria dos casos são usados 2 g de fermento por litro de mosto. O mosto de malte apresenta como fonte de carbono os seguintes açúcares: glicose, frutose, sacarose, maltotriose, além de dextrinas. A principal fonte de nitrogênio para síntese de proteínas e ácidos nucleicos, entre outros componentes nitrogenados, se dá pela degradação de proteínas por proteases durante a brassagem. O oxigênio injetado no mosto antes da inoculação do fermento é consumido em poucas horas para produzir ácidos carboxílicos insaturados e esteróis, que irão atuar na síntese da membrana celular, para crescimento celular (BERGMAN, 2001 e SILVA, 2005).

A fermentação pode ser dividida em três fases: fase adaptativa; fase primária ou atenuativa e fase secundária ou de acondicionamento (maturação). Na fase adaptativa, a levedura se adapta as condições do mosto e utilizam todo o oxigênio presente no mosto para se multiplicar. Essa fase dura até 12 horas. A fase primária é o momento da fermentação vigorosa, quando a gravidade da cerveja diminui entre $2/3$ e $3/4$ da gravidade original (O.G. - *Original Gravity*, que é a densidade relativa original, medida após a fervura). Pode durar de 2 a 6 dias para ales, ou de 4 a 10 dias para lagers, dependendo das condições. Ao final dessa fase, em cima da cerveja, forma-se uma espuma contendo taninos, proteínas, lipídeos do lúpulo, entre outras substâncias indesejadas, que deve ser retirada, uma vez que prejudica o gosto da cerveja. Durante a fase secundária ocorre a redução lenta dos fermentáveis remanescentes. As leveduras já se alimentaram dos açúcares fermentáveis mais fáceis na fase atenuativa e começam a consumir os açúcares mais pesados, como a maltotriose. Além disso, o fermento consome alguns dos subprodutos que foram produzidos na fase primária (PALMER, 2006).

Durante o processo fermentativo deve ser realizado um acompanhamento: da atenuação dos extratos (conversão de açúcares em álcool), com o objetivo de se estimar a quantidade de

álcool formado, calculado por meio de fórmulas empíricas; da concentração de diacetil; e do tempo de fermentação, pois este indicará o momento ideal para início da segunda fase da fermentação. Pode-se considerar que a fermentação termina quando o CO₂ deixa de ser produzido ou na prática, os açúcares deixam de ser convertidos, ou seja, a densidade se repete em 72 horas (SANTOS, 2005).

O cálculo do teor alcoólico pode ser feito através da equação empírica mostrada a seguir (PALMER, 2006), Equação 1:

$$\% ABV = (OG - FG) \times 131 \quad (1)$$

Em que:

% ABV: teor alcoólico em álcool por volume;

OG: densidade relativa original, medida após a fervura;

FG: densidade relativa final, medida após a fermentação.

Por questões econômicas, as leveduras são reutilizadas em diferentes fermentações, sendo que a cada fermentação realizada por determinada levedura é denominada como uma geração. O fermento para a fabricação de cerveja pode ser reutilizado até a sexta geração, sendo que fermentos provenientes de tanques que tiveram problemas de contaminação devem ser descartados (INSTITUTO DA CERVEJA, 2017).

2.1.4.7 Maturação

Terminada a fermentação primária, a cerveja passa pelo processo de maturação ou fermentação secundária. Nesta fase, a cerveja é mantida a baixas temperaturas, entre 0 e 3 °C, por um período de 6 a 30 dias e os açúcares residuais são consumidos pelas leveduras remanescentes (CARVALHO, 2007).

Os objetivos da maturação são (DRAGONE; SILVA, 2010):

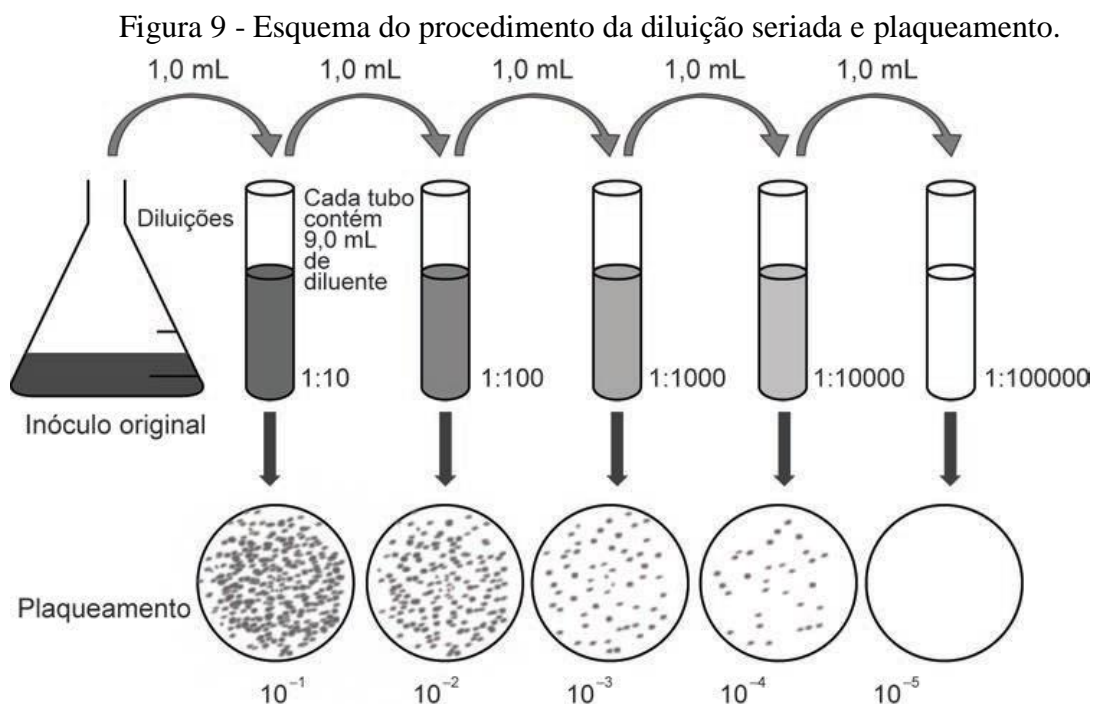
- o aprimoramento do sabor e odor da cerveja, pelas transformações químicas que reduzem a concentração de compostos indesejados como o diacetil, o acetaldeído e o ácido sulfídrico;

- proporcionar a carbonatação, em razão da baixa temperatura, o gás carbônico produzido na fermentação secundária é melhor absorvido pela bebida;
- a clarificação da cerveja pela sedimentação de células de levedura e proteínas.

2.2 Controle de qualidade de leveduras

Para assegurar a qualidade da cerveja, é necessário manter um rigoroso controle da fermentação, com atenção aos fatores internos e externos e também a fisiologia da levedura. Para ocorrer a fermentação as leveduras devem estar viáveis (células devem estar vivas) e metabolicamente ativas na etapa de fermentação (SUHRE, 2014).

Uma maneira de avaliar a viabilidade (percentual de células vivas) consiste na determinação do número de colônias formadas após plaqueamento de uma diluição conhecida de células em meio de cultura sólido. As amostras de leveduras são diluídas, pipetadas em uma placa com meio contendo ágar ou estéril, misturada com o inóculo para o caso da placa estéril e então a placa é incubada. Após esse procedimento, as colônias irão se formar na placa e após um tempo de 24 a 48 horas pode-se analisar a viabilidade das células, contando-se as colônias que se desenvolveram depois da incubação e multiplicando pela diluição. O procedimento é ilustrado pela Figura 9 (SENAI, 2014).

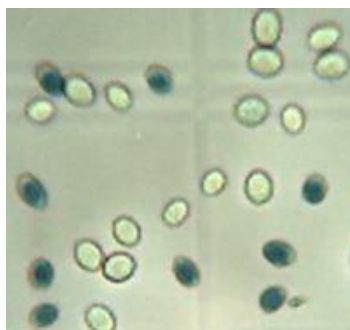


Fonte: Ceccato-Antonini, 2010.

Outra forma de avaliação da viabilidade celular é pela observação microscópica da coloração diferencial de células. Neste método, é adicionado corante a uma amostra de levedura devidamente diluída, sendo que as células de levedura com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as mortas ficam da cor do corante utilizado na técnica, como mostrado na Figura 10. As células vivas contêm enzimas capazes de fazer a redução da substância corante em compostos incolores. O procedimento consiste na contagem das células coradas e não coradas, utilizando um microscópio e uma Câmara de Neubauer, e então calcula-se a razão entre as células coradas e a quantidade total. Os corantes mais utilizados são o azul de metileno e eritrosina (O'CONNOR-COX et al., 1997 e CECCATO-ANTONINI, 2010).

Neste trabalho, foi usado o método da coloração com azul de metileno e contagem ao microscópio, utilizando-se uma Câmara de Neubauer, também conhecida como Hemacitômetro ou Câmara de Contagem. A seguir são mostradas algumas características dessa lâmina.

Figura 10- Células vivas (transparentes) e células mortas (coradas)

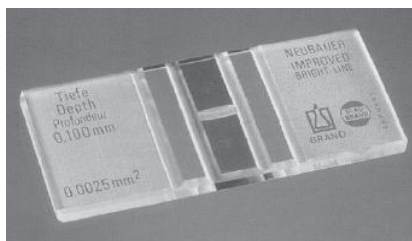


Fonte: Bicalho (2011).

2.2.1 Câmara de Neubauer

A Câmara de Neubauer (Figura 11) consiste em uma lâmina microscópica, mais alta que uma lâmina normal, que contém duas câmaras gravadas no vidro (as duas partes mais escuras no centro da lâmina, na Figura 11). Nestas câmaras são gravadas marcações que a dividem em quadrados de tamanhos conhecidos (LUCARINI et al, 2011).

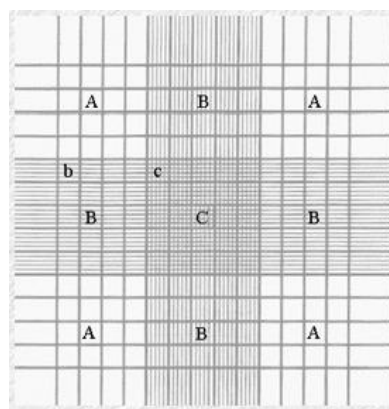
Figura 11 - Câmara de Neubauer



Fonte: Lucarini et al., 2011.

Na Figura 12 são apresentados os três tipos de quadrantes, denominados A, B e C, que juntos constituem um quadrado maior (LUCARINI et al, 2011).

Figura 12 - Quadrantes da Câmara de Neubauer



Fonte: Bicalho, 2011.

Nota-se que os quadrantes têm subdivisões diferentes, sendo que o critério de escolha do quadrante onde as células vão ser contadas é o tamanho das células. Então, células muito grandes são contadas no quadrante A, células de tamanho médio são contadas no quadrante B e células muito pequenas são contadas no quadrante C (LUCARINI *et al*, 2011).

Cada quadrante (A, B e C) possui 1 mm² de área, sendo a área total 9 mm². A lâmina é coberta por uma lamínula, que fica a uma distância (profundidade) de 0,1 mm, que permite se obter um volume de 0,1 mm³ sobre cada quadrante. Com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur, uma alíquota da solução de levedura com corante é adicionada a Câmara de Neubauer, por meio de um dos canais laterais ao campo central, aguarda-se até a amostra se espalhar por toda a superfície da lâmina e procede-se à contagem no microscópio (LUCARINI *et al*, 2011 e CECCATO-ANTONINI, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

As amostras de levedura para os testes de viabilidade foram doadas gentilmente pela Cervejaria Naípe Brew (Figura 13), uma microcervejaria localizada na cidade de Campo Belo/MG. As amostras de 500 mL foram coletadas diretamente do tanque de fermentação na etapa de maturação da cerveja, em frascos de vidro esterilizados com solução de ácido peracético e armazenadas sob refrigeração (0 a 4 °C) até o transporte ao laboratório.

Figura 13 - Cervejaria Naípe Brew



Fonte: Do autor, 2019.

A amostra de levedura doada é da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, de nome comercial Nottingham, da marca Lallemand, fabricada na Áustria.

Foi acompanhada a viabilidade das células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção de cerveja do tipo lager, das gerações de zero a quatro do fermento, com a finalidade de avaliar se era adequado fazer a reutilização nas fermentações. A geração zero é quando o fermento é utilizado pela primeira vez, quando adquirido o pacote fechado do

fornecedor. O fermento reutilizado é transferido de um tanque em maturação (material sedimenta no fundo do tanque) para um tanque que vai iniciar a fermentação, por meio de uma tubulação, no momento de transferência do mosto clarificado para o mesmo tanque. As leveduras não passam por nenhum tipo de tratamento para se fazer o seu reuso.

Vale ressaltar que apesar de cervejas do tipo Lager serem de baixa fermentação e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* serem típicas de cervejas de alta fermentação, essa é uma estratégia comum em cervejarias, para diminuir o tempo da etapa de fermentação da bebida alcóolica, bem como evitar a presença de *off-flavors*.

3.2 Determinação da viabilidade celular

As análises de viabilidade celular foram feitas no Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos, localizado no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, utilizando-se o método de coloração com azul de metileno (CECCATO-ANTONINI, 2010). Preparou-se uma solução de azul de metileno-citrato de sódio, com 0,01 g de azul de metileno, 2 g de citrato de sódio, preparada da seguinte forma: dissolveu-se o azul de metileno em 10 mL de água destilada em um balão volumétrico de 100 mL. Depois de dissolvido, colocou-se o citrato de sódio e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Preparou-se uma solução salina para fazer a diluição da levedura, com 0,85 g de cloreto de sódio e completou-se o volume para 100 mL de água destilada. Ambas as soluções preparadas foram esterilizadas em autoclave a 120 °C por 20 minutos, a pressão manométrica 1,1 atm.

Utilizando um tubo de ensaio, realizou-se a diluição da amostra de levedura na proporção de 1 mL de amostra para 19 mL de solução salina (diluição 1/20, Figura 14). Essa diluição foi escolhida fazendo-se testes com diferentes diluições (1/5, 1/10, 1/20 e 1/50) e contando pelo microscópio a quantidade de células de cada diluição. Foi escolhida a diluição de 1/20 em razão da boa quantidade de células disponíveis para contagem no quadrante, não foi um número muito elevado, que favorece a fadiga do operador, e nem uma quantidade baixa, que compromete os resultados.

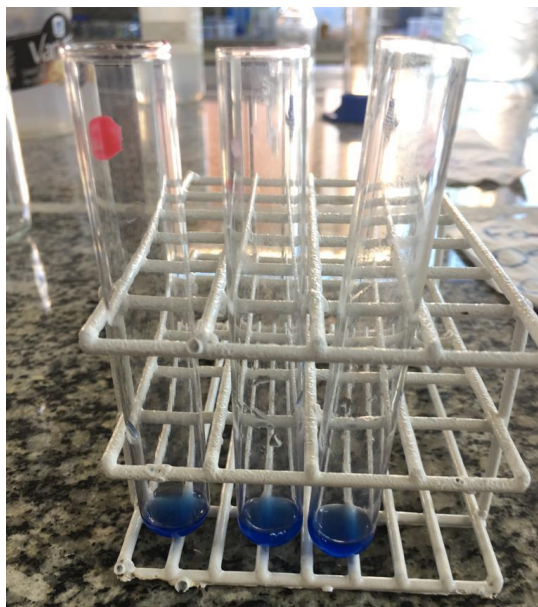
Figura 14 - Amostras de levedura diluída



Fonte: Do autor, 2019.

Transferiu-se 0,3 mL da amostra diluída para um tubo de ensaio e adicionou-se 0,3 mL da solução de azul de metileno-citrato de sódio e foi feita a homogeneização da solução (Figura 15). Transferiu-se uma alíquota desta solução para a Câmara de Neubauer, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocou-se a lamínula sobre a Câmara de Neubauer (marca Optik Labor), e procedeu-se à observação das células com a ajuda de um microscópio (marca Motic, modelo BA2103), na objetiva de 40x.

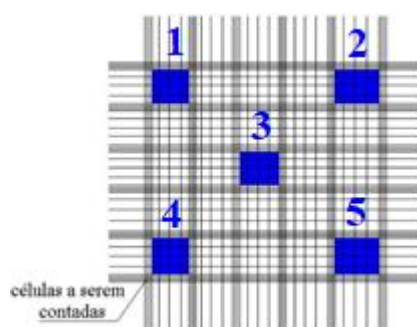
Figura 15 - Mistura da solução de amostra diluída com a solução de azul de metileno-citrato de sódio



Fonte: Do autor, 2019.

Para a contagem de células na amostra, contou-se o número total de células viáveis e não-viáveis nos campos das pontas da câmara (que contém 16 quadrículos) e o campo do centro, totalizando a contagem em 80 quadrículos. Os campos usados para fazer a contagem foram numerados de 1 a 5. Na Figura 16 observa-se um esquema simplificado da câmara de Neubauer. Na contagem, foram consideradas todas as células que estavam nos limites superior e lateral esquerdo do campo e desprezadas as do limite inferior e lateral direito. Também foram contadas todas as células no interior de cada campo considerado, respeitando as considerações anteriormente citadas. Foram contadas e anotadas, em triplicata, a quantidade de células vivas (células transparentes) e as células mortas (células coloridas pelo azul de metileno) para fazer-se o cálculo da viabilidade celular.

Figura 16 - Esquema simplificado da Câmara de Neubauer



Fonte: Adaptado de Bicalho, 2011.

A população total de leveduras da amostra considerada foi calculada pela Equação 2:

$$\frac{\text{Número total de células}}{\text{mL}} = \text{número de células nos 5 campos} \times 5 \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (2)$$

A quantidade de células vivas da amostra foi calculada pela Equação 3:

$$\frac{\text{Número de células vivas}}{\text{mL}} = \text{número de células vivas nos 5 campos} \times 5 \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (3)$$

A viabilidade celular foi calculada pela Equação 4:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (4)$$

3.2.1 Sistema de captura de imagem do microscópio

O microscópio utilizado possuía um sistema de captura de imagens por meio de uma câmera digital acoplada a ele, que enviava a imagem a um computador equipado com uma placa

de aquisição de imagens. Neste, a imagem era digitalizada, permitindo a gravação em disco das análises realizadas. A Figura 17 mostra o microscópio equipado com esse sistema de captura de imagens.

Figura 17 - Microscópio equipado com sistema de captura de imagem



Fonte: Do autor, 2019.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 mostram os resultados das análises das gerações de zero a quatro. Para a determinação da viabilidade foram consideradas as médias dos resultados de cada repetição.

Tabela 9 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da geração zero, considerando a média das 3 repetições.

	Células vivas	Células não vivas	Total	N° células vivas/mL	N° total células/mL	Viabilidade (%)
1° campo	70,33	6,33	76,67			
2° campo	73,00	8,00	81,00	$3,57 * 10^8$	$3,89 * 10^8$	
3° campo	71,00	6,00	77,00	\pm	\pm	$91,79 \pm 2,94$
4° campo	77,00	9,00	86,00	$2,04 * 10^7$	$2,95 * 10^7$	
5° campo	65,33	3,00	68,33			
Total	356,67	32,33	389,00			

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 10 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da geração um, considerando a média das 3 repetições.

	Células vivas	Células não vivas	Total	N° células vivas/mL	N° total células/mL	Viabilidade (%)
1° campo	63,67	10,33	74,00			
2° campo	48,33	5,67	54,00	$2,79 * 10^8$	$3,13 * 10^8$	
3° campo	50,00	6,33	56,33	\pm	\pm	$89,09 \pm 1,98$
4° campo	61,33	4,67	66,00	$5,50 * 10^7$	$5,90 * 10^7$	
5° campo	56,00	7,00	63,00			
Total	279,33	34,00	313,33			

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 11 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da geração dois, considerando a média das 3 repetições.

	Células vivas	Células não vivas	Total	N° células vivas/mL	N° total células/mL	Viabilidade (%)
1° campo	71,00	16,33	87,33			
2° campo	66,00	14,00	80,00	$3,41 * 10^8$	$4,16 * 10^8$	
3° campo	73,00	21,33	94,33	\pm	\pm	$82,13 \pm 2,03$
4° campo	60,00	10,33	70,33	$5,86 * 10^7$	$8,02 * 10^7$	
5° campo	70,67	13,33	84,00			
Total	340,67	75,33	416,00			

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 12 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da geração três, considerando a média das 3 repetições.

	Células vivas	Células não vivas	Total	N° células vivas/mL	N° total células/mL	Viabilidade (%)
1° campo	72,67	14,33	87,00			
2° campo	60,33	14,00	74,33	$3,63 * 10^8$	$4,36 * 10^8$	
3° campo	71,00	15,67	86,67	\pm	\pm	$83,57 \pm 3,21$
4° campo	65,00	14,00	79,00	$6,92 * 10^7$	$9,98 * 10^7$	
5° campo	93,67	15,67	109,33			
Total	362,67	73,67	436,33			

Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 13 - Resultados das análises de viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da geração quatro, considerando a média das 3 repetições.

	Células vivas	Células não vivas	Total	N° células vivas/mL	N° total células/mL	Viabilidade (%)
1° campo	29,33	6,67	36,00			
2° campo	41,33	4,33	45,67	$1,62 * 10^8$	$1,89 * 10^8$	
3° campo	36,00	6,33	42,33	\pm	\pm	$84,21 \pm 5,13$
4° campo	33,33	6,00	39,33	$1,03 * 10^8$	$1,12 * 10^8$	
5° campo	21,67	3,67	25,33			
Total	161,67	27,00	188,67			

Fonte: Do autor, 2019.

Os resultados obtidos para a viabilidade celular das gerações zero a quatro foram, respectivamente: 91,79%; 89,09%; 82,13%; 83,57% e 84,21%. A viabilidade diminuiu da geração zero até a dois, sendo que da geração dois até a quatro o valor subiu.

Foi realizado um Teste de Scott-Knott por meio do *software* Sisvar com nível de significância de 5 %, para analisar estatisticamente os resultados obtidos de viabilidade. O resultado do Teste é apresentado pela Figura 18.

Figura 18 - Teste de Scott-Knott para os resultados de Viabilidade

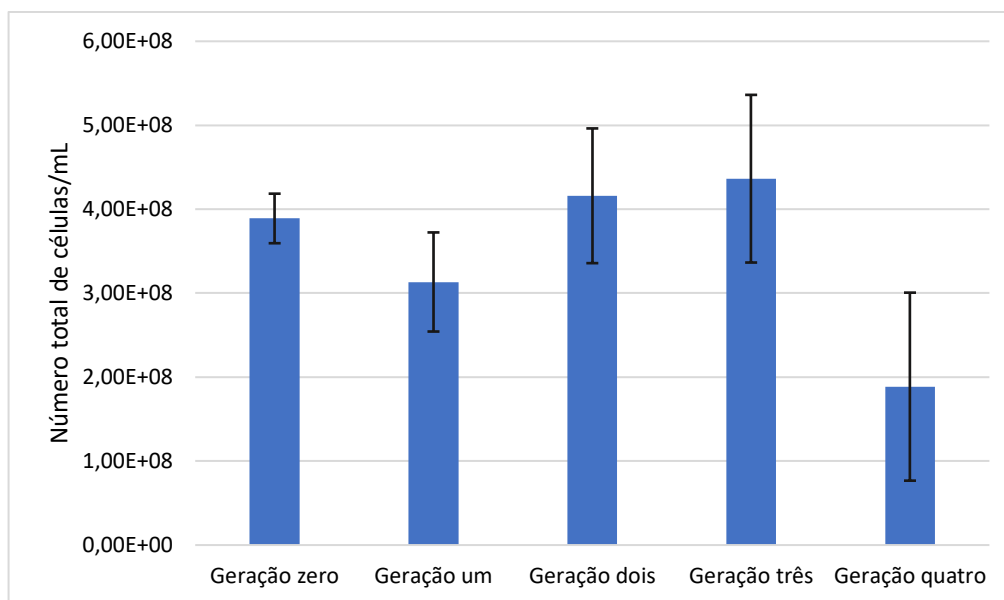
Teste Scott-Knott (1974) para a FV Geração		
NMS: 0,05		
Média harmonica do número de repetições (r): 3		
Erro padrão: 1,88468506063421		
Tratamentos	Médias	Resultados do teste
Geração dois	82.133333	a1
Geração três	83.566667	a1
Geração quatro	84.206667	a1
Geração um	89.093333	a2
Geração zero	91.793333	a2

Fonte: Do autor, 2019.

Pode-se observar que as gerações um e zero são estatisticamente iguais pelo teste de Scott-Knott por possuírem a mesma letra (a2). O mesmo pode-se dizer das gerações dois, três e quatro, por terem a mesma letra (a1). O resultado esperado era que a cada reutilização de uma levedura, sua viabilidade diminuísse, o que indica que a quantidade de células vivas aptas a fermentar diminuem a cada geração. Este comportamento aconteceu das gerações zero e um para as gerações dois, três e quatro. Isto pode ser explicado pelo método de transferência de fermento quando se faz a reutilização, pois o fermento é transferido entre dois tanques por uma tubulação, sem nenhuma medição de vazão, durante um tempo pré-determinado. Porém, este método não é exato pois a massa transferida de fermento muitas vezes não é a quantidade desejada, podendo ser maior ou menor dependendo da pressão interna dos tanques.

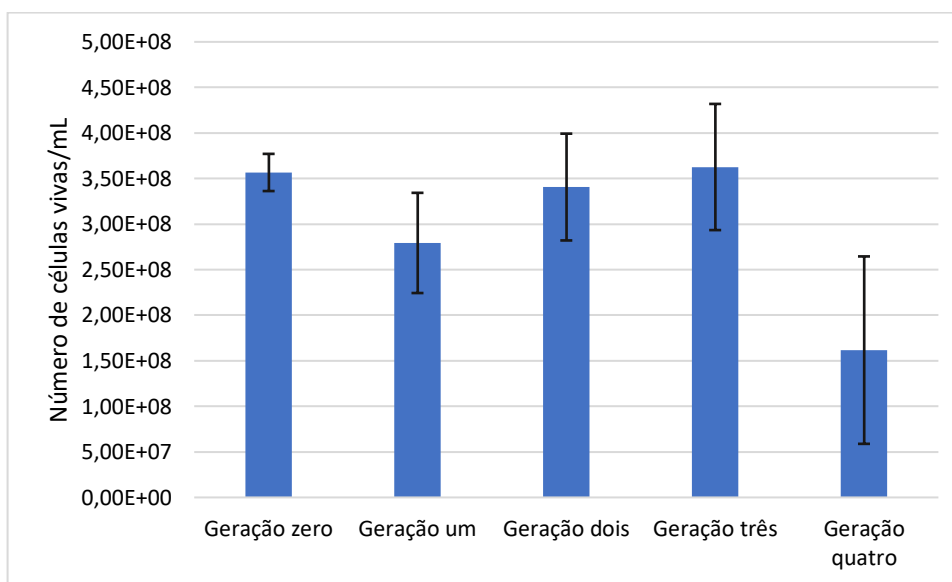
Na Figuras 19 e 20, podem ser visualizadas a população total e de células vivas de levedura em cada geração, que confirma o que foi supracitado sobre a quantidade de massa de fermento transferida.

Figura 19 - População total de células média em cada geração



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 20 - População de células vivas média em cada geração

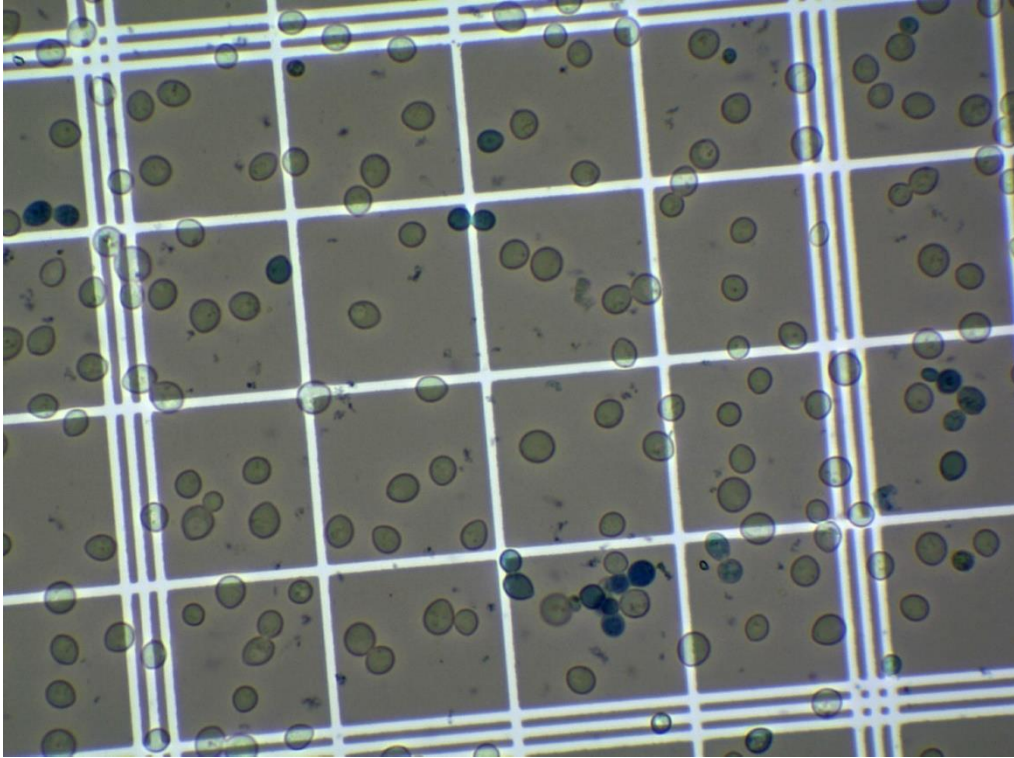


Fonte: Do autor, 2019.

A geração quatro apresentou o menor número total de células por mL e número de células vivas por mL, o que pode ser explicado pelo fato da amostra estar muito viscosa e por isso foi mais difícil retirar com precisão a quantidade desejada para realizar a diluição.

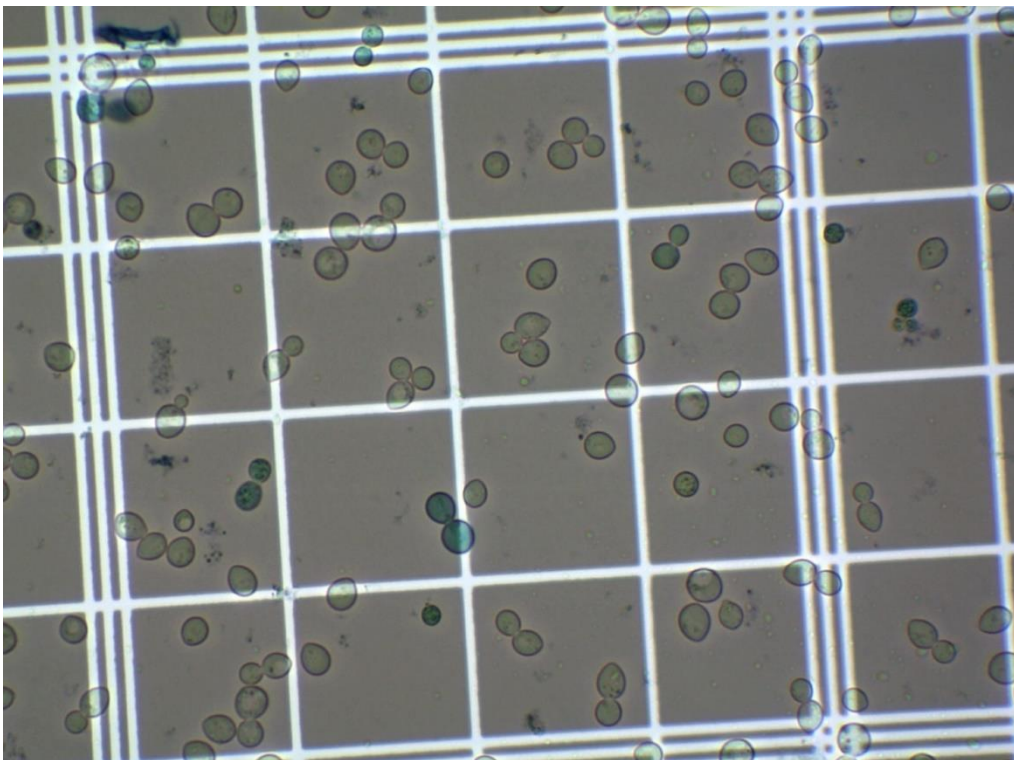
Nas Figuras 21, 22, 23, 24 e 25 são mostradas imagens obtidas pelo Sistema de Captura de Imagem do Microscópio em cada geração.

Figura 21 - Imagem da análise no microscópio, 1º campo da geração zero.



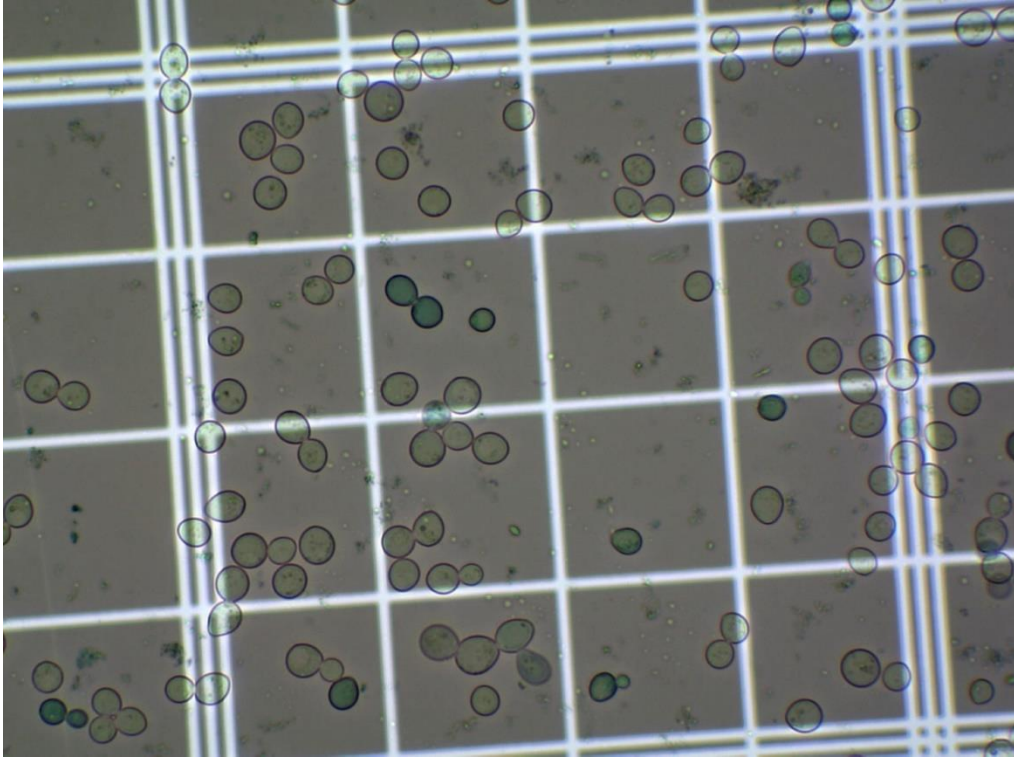
Fonte: Do autor, 2019.

Figura 22 - Imagem da análise no microscópio, 1º campo da geração um.



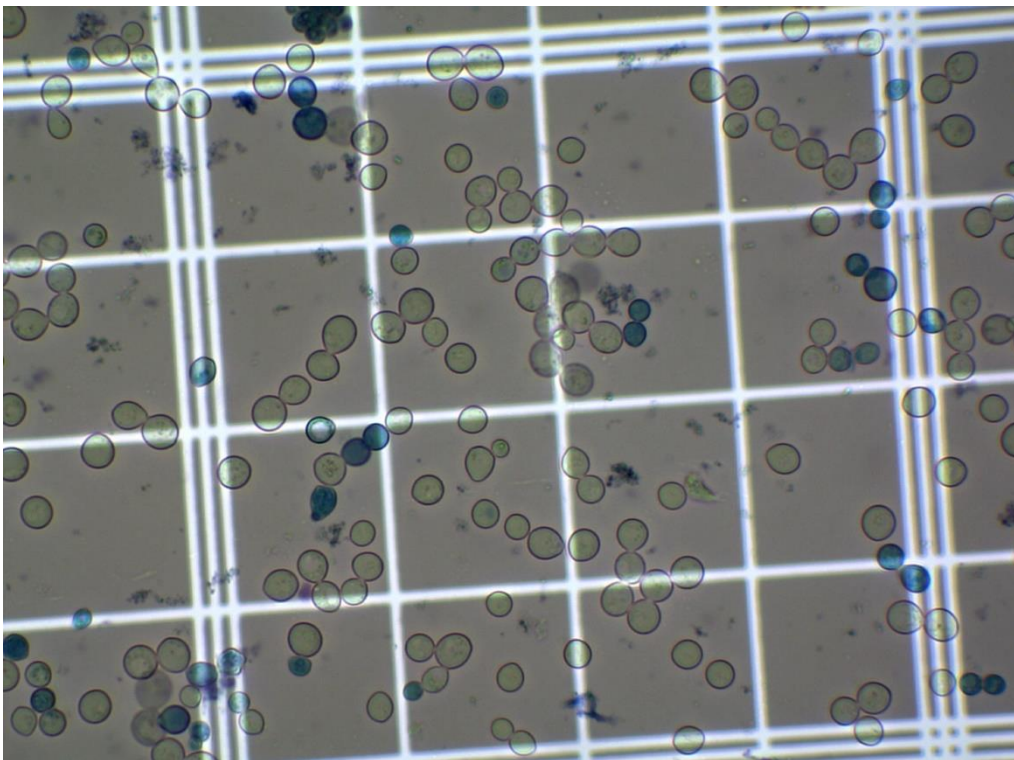
Fonte: Do autor, 2019.

Figura 23 - Imagem da análise no microscópio, 4º campo da geração dois.



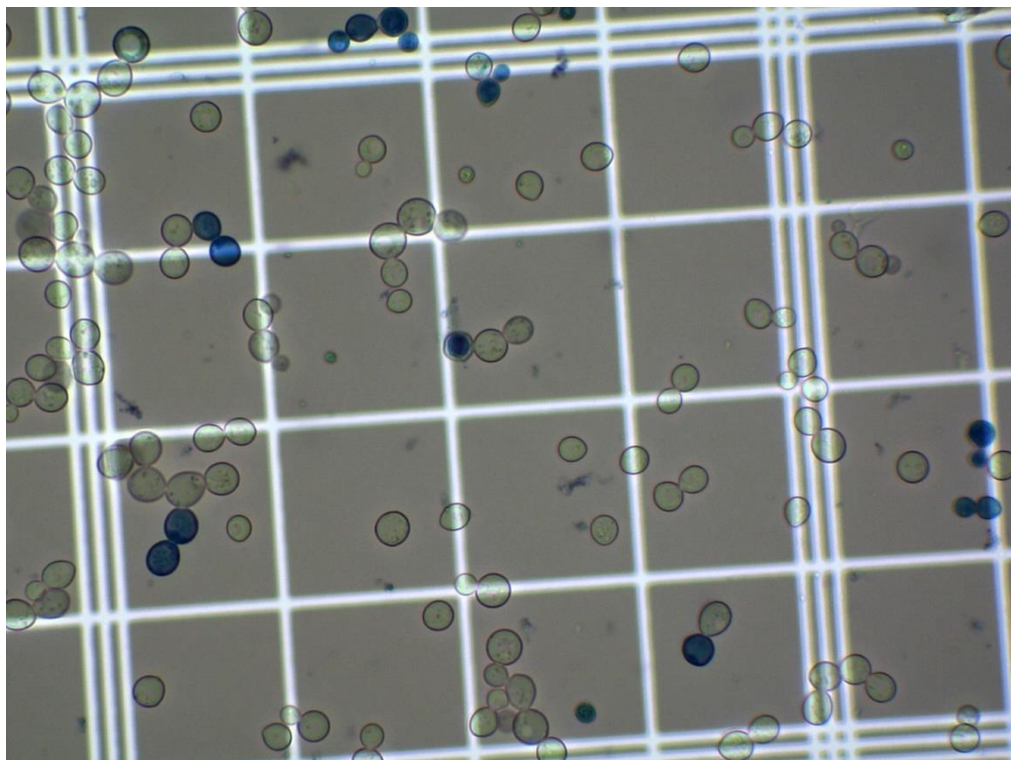
Fonte: Do autor, 2019.

Figura 24 - Imagem da análise no microscópio, 1º campo da geração três.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 25 - Imagem da análise no microscópio, 3º campo da geração quatro.



Fonte: Do autor, 2019.

No geral, índices satisfatórios de viabilidade foram obtidos até a geração quatro, o que mostra que o reuso de leveduras por quatro vezes é um método seguro quanto ao tempo de atenuação de açúcares do mosto, além de ser uma alternativa economicamente viável. Foi inoculado inicialmente 500 g de fermento Nottingham, que tem o custo de R\$ 501,00 (CASA O.L.E.C, 2019), caso fosse feita apenas uma fermentação com esse fermento, o investimento com leveduras seria esse valor. Reutilizando o fermento por quatro vezes, o investimento cairia para R\$ 125,25 por fermentação. Outra vantagem do reuso de fermento é o ganho de tempo na fermentação, visto que a levedura já está mais adaptada ao meio.

No entanto, não se pode garantir o reuso de leveduras apenas pelas análises de viabilidade. O processo de fermentação terá uma eficiência satisfatória somente se as leveduras estiverem viáveis e metabolicamente ativas, além de estarem livres de contaminantes microbiológicos. Diante disso, é necessário fazer análises de vitalidade celular e detecção de contaminantes microbianos para fazer a reutilização do fermento com mais segurança.

A análise de vitalidade celular pode ser feita por meio da medição do glicogênio contido no fermento, do potencial de redução das leveduras, da avaliação da quantidade de CO₂ pelo fermento, da mensuração da taxa de absorção de oxigênio pelas leveduras ou por um teste de acidificação do meio.

Para a detecção de contaminantes microbianos pode ser usado o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), que detecta DNA de microrganismos contaminantes utilizando uma pequena quantidade de amostra. São sintetizados alguns marcadores moleculares que identificam os contaminantes, fazendo-se reações em cadeia da polimerase com a amostra de levedura e realizando análises por eletroforese em gel de agarose 0,8% para identificar a presença dos microrganismos avaliados.

Uma sugestão é o aperfeiçoamento do método de transferência de massa de fermento, para se ter um maior controle e eficiência do reaproveitamento. Uma possível solução para esse problema é a instalação de um medidor de vazão na tubulação que ocorre a transfega de fermento no processo de reutilização. O método de transferência de biomassa de leveduras diretamente entre os tanques tem a vantagem de ser mais seguro quanto a contaminação. Outra maneira seria armazenar o fermento em um recipiente graduado e então transferir a quantidade correta armazenada para um novo tanque de fermentação.

5 CONCLUSÃO

O controle de qualidade de leveduras é um parâmetro muito importante para os cervejeiros artesanais e microcervejarias, pois a fermentação é uma das etapas que mais influenciam o produto final, tanto em relação a eficiência do processo (tempo de atenuação dos açúcares) quanto na geração de *off flavors*, comprometendo assim a qualidade final da cerveja produzida.

Em relação a reutilização de leveduras na fermentação de cerveja, pode-se afirmar em relação a viabilidade, que o reuso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por quatro vezes é seguro, pois o percentual de células vivas disponíveis para realizar o processo de fermentação é alto, e também, representa uma vantagem econômica no processo.

Os resultados das análises de viabilidade das gerações de zero a quatro foram, respectivamente: 91,79%; 89,09%; 82,13%; 83,57% e 84,21%.

Para fazer o reuso de fermento com mais segurança, outras análises devem ser feitas, como a vitalidade das células e a detecção de contaminantes microbianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBEV. Nossa história. Disponível em: <<https://www.ambev.com.br/sobre/nossa-historia/>>. Acesso em: 09 abr. 2019.

AMORIM, B. **As duas grandes famílias cervejeiras.** Revista da cerveja, 2013, v. 7, p. 52-54.

AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W.; LIMA; A. U. **Biotecnologia Industrial.** 4 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. P.91-143.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CERVEJA ARTESANAL. **Mercado da Cerveja 2018.** 2019. Disponível em: <<https://abracerva.com.br/rascunho-automatiko/>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS FABRICANTES DE LATAS DE ALUMÍNIO. **Movimentação no mercado cervejeiro.** 2017. Disponível em: <<http://www.abralatas.org.br/movimentacao-no-mercado-cervejeiro/>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

BERGMAN, L.W. **Growth and Maintenance of Yeast.** In: MACDONAL, P.N. **Methods in Molecular Biology**, v. 177, p.9-14. 2001.

BICALHO, I. C. **Concentração de leveduras da fermentação alcoólica em hidrociclones** [manuscrito] / Isabele Cristina Bicalho. - 2011. 135 f.: il. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15161/1/Diss%20Isabele.pdf>>. Acesso em: 09 mai. 2019.

BOHEMIA: História. Disponível em: <<https://www.bohemia.com.br/historia.php>>. Acesso em: 09 abr. 2019.

BRASIL. **Decreto-lei nº 6.871, de 4 de Junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 Julho de 1994.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em: 09 abr. 2019.

CARVALHO, L. G. de. **Produção de Cerveja.** Dossiê Técnico, REDETEC – Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B. **Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª Parte: A fermentação**. Revista Analytica, v.26, p.46-54, 2007.

CASA O.L.E.C. **FERMENTO NOTTINGHAM 500G LALLEMAND**. Disponível em: <<https://casaolec.com.br/fermento-nottingham-500g-lallemand/p>>. Acesso em: 04 jul. 2019.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias** / Sandra Regina Ceccato-Antonini. -- São Carlos : EdUFSCar, 2010. 105 p. -- (Coleção UAB-UFSCar).

CEREDA, M. P. **Cervejas**. In: AQUARONE *et al.* Biotecnologia alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgar Blucher, 1983. Cap. 3, p. 46.

DRAGONE, G.; SILVA, J.B.A. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo, SP: Blucher, 2010. xxvii, 461 p. (Bebidas; v. 1)

FLANDERS INVESTMENT & TRADE. **The beer sector in Brazil: market survey – overview, list of importers, legislation**. São Paulo, dez. 2015

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Production quantities of Hops by country**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

GIBRAM, D.M. **Fabricação de Cerveja Weissbier por Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* através de processo artesanal**. 2014. 76 p. Monografia, Universidade Federal de São João del Rey, Ouro Branco/MG, 2014.

HELD, P. **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces Cerevisiae***. *Biotek Applications*, 2010. Disponível em: <<https://www.biotek.com/resources/application-notes/monitoring-growth-of-beer-brewing-strains-of-saccharomyces-cerevisiae-the-utility-of-synergy-h1-for-providing-high-quality-kinetic-data-for-yeast-growth-applications/>>. Acesso em: 14 mai. 2019.

INSTITUTO DA CERVEJA. **Curso avançado de tecnologia cervejeira**. Belo Horizonte/MG. 2017.

KIRIN BEER UNIVERSITY. **Global Beer Consumption by Country in 2017**. 2018. Disponível em: <https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/1220_01.html>. Acesso em: 19 abr. 2019.

KIRIN BEER UNIVERSITY. **Global Beer Production by Country in 2017**. 2018. Disponível em: <https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2018/0809_01.html>. Acesso em: 19 abr. 2019.

LEWIS, Michael; YOUNG, Tom W. **Brewing**. 2nd ed. New York, NY: Kluwer Academic, c2001. x, 398 p.

LUCARINI A. C.; SILVA L. A.; BIANCHI R. A. C. **Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos**. PESQUISA & TECNOLOGIA FEI - Nº 26 p 36-40. Disponível em: <<http://fei.edu.br/~rbianchi/publications/RevistaFEI2004-a.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2019.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

O'CONNOR-COX, E & MOCHABA, F. M. & LODOLO, ELIZABETH & MAJARA, M & AXCELL, B. (1997). **Methylene blue staining: Use at your own risk**. Master Brew Assoc Am Tech Q. 34. 306-312.

PALMER, J. J. **How To Brew - Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time**. 3 ed. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2006.

Qual lúpulo escolher: conheça os principais lúpulos do mundo. Disponível em: <<https://www.hominilupulo.com.br/cervejas-caseiras/qual-lupulo-escolher/>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

SANTOS, M. S. D. **Cervejas e refrigerantes** / Mateus Sales dos Santos [e] Flávio de Miranda Ribeiro. - - São Paulo: CETESB, 2005. 58 p. (1 CD): il. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2019.

SCHLENK, F. **Early research on fermentation – a story of missed opportunities**. Trends Biochem Sciences, 1985, v. 10, p. 252-254.

SEBRAE. **Microcervejarias**. Disponível em: <<http://www.sebraemercados.com.br/estudo-sobre-microcervejaria/>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

SENAI. Departamento Regional do Estado do Rio de Janeiro. **Tecnologia cervejeira**/SENAI, agrária, Centro de Tecnologia SENAI alimentos e bebidas. Rio de Janeiro: 2014. 284 p.

SILVA, J.B.A. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo, SP: E. Blücher, 2005. xiv, 550 p.

SUHRE, T. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 2014. 48 p. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2014.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e cervejarias**: a história, a arte e a tecnologia. São Paulo: Aden, 2001. 223 p.

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

WE CONSULTORIA. **Malte-chateau-vienna**. [2019?]. 1 fotografia. Disponível em: <<https://loja.weconsultoria.com.br/malte-chateau-vienna-p100/>>. Acesso em: 02 mai. 2019.