



**Universidade de
Aveiro
2020**

Departamento de Química

**Ana Rita Corga
Fonseca**

**Avaliação do impacto do sistema de extração de
barril de tara retornável na qualidade microbiológica
e organolética da cerveja**



**Ana Rita Corga
Fonseca**

**Avaliação do impacto do sistema de extração de
barril de tara retornável na qualidade microbiológica
e organolética da cerveja**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e sob a supervisão empresarial do Engenheiro Tiago Filipe Marujo de Moreira, coordenador dos serviços técnicos do *Super Bock Group*

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão por toda a confiança depositada e pelo amor incondicional que nos une

o júri

presidente

Professor Doutor Brian James Goodfellow
professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Isabel Da Silva Henriques
professora auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho
Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram, de forma direta ou indireta, para que esta dissertação fosse realizada deixo aqui o meu sincero agradecimento.

À Universidade de Aveiro e ao Super Bock Group manifesto apreço pela possibilidade da realização do presente trabalho e por todos os meios colocados à disposição, agradecendo igualmente a excelência da formação prestada e os conhecimentos transmitidos.

À Doutora Elisabete Coelho, que esteve sempre presente e disponível a ajudar e que deu o maior apoio, incentivo e as valiosas contribuições ao longo do estágio e na realização desta dissertação.

A todos os meus amigos, que estiveram ao meu lado nesta “caminhada” e que ouviram os meus desabaços intermináveis, agradeço o apoio, a força, a amizade e a confiança que depositaram em mim.

Por último, manifesto um sentido e profundo reconhecimento à minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por todos os esforços que fizeram para me apoiarem, por acreditarem sempre em mim e por toda a paciência, carinho e incentivo.

Palavras-chave

Cerveja, sistema de extração, barril, microrganismos, contaminação microbiológica, torneira de pistão, torneira de corte

Resumo

Os barris, à saída da indústria cervejeira, são controlados microbiologicamente e sensorialmente de forma a garantir a qualidade da cerveja antes de serem distribuídos pelos pontos de venda. No entanto, quando acoplados a um sistema de extração, podem ocorrer alterações que irão interferir na qualidade microbiológica e organolética da cerveja. Estes sistemas exigem um procedimento de limpeza eficaz e regular, através do cumprimento dos ciclos de higienização. Devido à necessidade da indústria conseguir dar respostas a todos os pontos de venda, garantindo a realização dessas higienizações dentro dos prazos recomendados, o objetivo desta dissertação consistiu na seleção de um sistema de extração com as melhores características, que assegurasse a preservação da qualidade da cerveja durante mais tempo, permitindo um aumento do tempo entre higienizações e conseqüentemente uma melhor gestão das equipas de higienização. Para isso, foram realizadas análises microbiológicas e sensoriais a diferentes componentes. As torneiras de corte, nomeadamente a CMB e a Antoine com regulador de caudal foram as mais eficazes, constituindo uma excelente alternativa para a substituição das torneiras de pistão, as Mafridis, instaladas num maior número de pontos de venda e facilmente contamináveis. A desmontagem das torneiras demonstrou ser essencial na torneira de corte CMB mas na Mafridis não foi possível avaliar o impacto da desmontagem, devido à contaminação microbiológica provocada por um problema existente nessas instalações, também detetado pela análise sensorial, através da perceção de notas metálicas na cerveja. A desmontagem dos *clicks* provou ser crucial, não devendo ser desprezada pelo técnico que realiza a higienização.

Relativamente aos tubos de arrefecimento (tubo de inundação e de contacto) e ao tubo de FEP, apesar de possuírem características mais vantajosas que os de PVC, os resultados não foram conclusivos, suscitando dúvidas relativamente ao estado da instalação, reforçadas com a perceção de notas metálicas na análise sensorial. Para averiguar a origem da contaminação, efetuou-se uma troca de barris que comprovou que o problema não tinha origem nos barris, mas sim nas instalações. A troca de serpentinas realizada, com o objetivo de tentar justificar os aromas metálicos percecionados caso apresentassem corrosão, revelaram que mesmo após a troca, os resultados microbiológicos foram igualmente não satisfatórios, ficando em aberto qual a verdadeira causa dos resultados microbiológicos obtidos e das notas metálicas percecionadas.

Independentemente da higienização efetuada em torneiras e *clicks* promover a completa remoção de bactérias e leveduras selvagens causadoras de defeitos na cerveja, existem locais/componentes da instalação que estão a contribuir para a proliferação rápida de microrganismos que não estão a ser identificados.

keywords

Beer, beer dispensing, keg, microorganisms, microbiological contamination, piston tap, cutting tap

abstract

The kegs, shipped from the brewing industry, are microbiologically and sensorially controlled in order to guarantee the quality of the beer before being distributed by the points of sale. However, when coupled to an extraction system, changes can occur that will interfere with the microbiological and organoleptic quality of beer. These systems require an effective and regular cleaning procedure, through the completion of the hygiene cycles. Due to the need of the industry to be able to provide assistance to all points of sale, ensuring that these sanitizations are carried out within the recommended deadlines, the objective of this dissertation was to select an extraction system with the best characteristics, which would ensure the preservation of the quality of the beer for longer periods, allowing an increase in the time between sanitizations and, consequently, a better management of the sanitation teams. For this, microbiological and sensory analyzes were performed on beer dispensed with systems with different components. The cutting taps, namely CMB and Antoine with flow regulator, were the most effective, constituting a viable alternative for the replacement of piston taps, the Mafridis, installed in a high number of points of sale and easily contaminated. The disassembly of the taps proved to be essential in the CMB tap, but at Mafridis it was not possible to assess the impact of the disassembly, due to an existing problem in these facilities, as verified in the sensorial analysis, through the perception of metallic notes in the beer. The disassembly of the clicks proved to be crucial and should not be neglected by the technician who performs the cleaning procedure. Regarding the cooling pipes (flood and contact pipe) and the FEP tube, despite having more advantageous characteristics than those of PVC, the results were inconclusive, raising doubts regarding the state of the installation, reinforced with the perception of metallic notes in the sensory analysis. However, in the sensory analysis metallic notes were identified in the beer, suggesting the existence of a problem in the installation or with the kegs, which justified the unsatisfactory results obtained in this tube. For this, a keg change was carried out which proved that the problem was not from the kegs, but in the facilities. The exchange of coils was carried out, aiming to find the origin of the perceived metallic aromas with the hypothesis that they could present corrosion. After coils exchange the microbiological results were equally unsatisfactory, keeping open the true cause of the microbiological results and the metallic notes perceived. Regardless of the sanitizations performed on taps and clicks that promoted complete removal of bacteria and wild yeasts that cause defects in beer, there are places/components of installation that are contributing to the rapid proliferation of microorganisms that are not being identified.

Índice geral

<i>Índice de figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Índice de tabelas</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>vi</i>
1. Introdução	1
1.1 Super Bock Group	2
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Processo cervejeiro	4
2.1.1 Produção da cerveja.....	5
2.1.2 Enchimento da cerveja.....	7
2.2 Sistema de extração de cerveja	9
2.2.1 Componentes.....	10
2.2.2 Reações no interior do barril.....	14
2.2.3 Contaminação microbiológica.....	17
2.2.3.1 Bactérias Gram-positivas.....	19
2.2.3.2 Mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas ao lúpulo.....	21
2.2.3.3 Bactérias Gram-negativas.....	23
2.2.3.4 Leveduras selvagens.....	28
2.2.3.4 <i>Off-flavours</i>	30
2.2.3 Higienização.....	31
2.3 Objetivo	33
3. Metodologias	34
3.1 Recolha de amostras	36
3.2 Análise microbiológica	37
3.2.1 Filtração por membrana.....	37
3.2.1.1 Meios de cultura.....	38
3.2.2 Incubação de placas.....	39
3.2.3 Análise de colónias de microrganismos.....	40
3.2.4 Análise por bioluminescência.....	40
3.3 Análise sensorial	41
4. Resultados e discussão	43
4.1 Análise microbiológica às águas de enxaguamento	44
4.2 Análise microbiológica e sensorial à cerveja	45
4.2.1 Teste das torneiras.....	45
4.2.2 Teste da (não) desmontagem de torneiras.....	50
4.2.3 Teste da (não) desmontagem de <i>clicks</i>	55
4.2.4 Teste dos tubos de arrefecimento.....	59
4.2.5 Teste do tubo de FEP.....	64
4.3 Diagnóstico de contaminação	67
4.3.1 Análise de possíveis causas.....	67

4.3.2 Troca de barris.....	68
4.3.3 Substituição de barris	69
4.3.4 Troca de serpentinas.....	73
5. Conclusões.....	76
6. Trabalho futuro.....	79
7. Referências bibliográficas.....	81
8. Anexos.....	86

Índice de figuras

Figura 1.1 Marcas e produtos comercializados pelo Super Bock Group. ²	2
Figura 2.1 - Etapas do processo cervejeiro (Adaptado de ⁵).	4
Figura 2.2 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica na levedura (Adaptado de ¹⁰).	6
Figura 2.3 (A) Garrafas (B) Barril TP (C) Barril TR (D) <i>Beer Drive</i> ²	7
Figura 2.4 As 8 estações do módulo de enchimento. ¹⁶	9
Figura 2.5 Componentes do sistema de extração de cerveja. ¹⁸	10
Figura 2.6 Esquema do <i>click</i> montado (à esquerda) e desmontado (à direita) ¹⁸	10
Figura 2.7 Esquema do refrigerador. ¹⁸	12
Figura 2.8 Tubo <i>standard</i> (A) de contacto (B) de inundação (C) ²¹	13
Figura 2.9 Torneira (A) de pistão Mafridis (B) de corte CMB (C) de corte Antoine com regulador de caudal (D) de corte Antoine sem regulador de caudal	14
Figura 2.10 Alterações sensoriais ao longo do envelhecimento da cerveja. ²²	15
Figura 2.11 Desenvolvimento de biofilmes na cerveja (Adaptado de ³⁰).	19
Figura 2.12 Metabolismo homo e heterofermentativo de LAB (Adaptado de ¹⁴).	21
Figura 2.13 Mecanismo de resistência ao lúpulo em bactérias Gram-positivas. ³⁷	22
Figura 2.14 Metabolismo das bactérias ácido-acéticas (Adaptado de ^{40 41}).	24
Figura 2.15 Metabolismo de <i>Enterobacteriaceae</i> (Adaptado de ¹⁴).	25
Figura 2.16 Metabolismo de <i>Zymomonas mobilis</i> (Adaptado de ⁴⁴).	26
Figura 2.17 Metabolismo de <i>Pectinatus</i> (Adaptado de ⁴⁹).	27
Figura 2.18 Metabolismo de <i>Megasphaera</i> (Adaptado de ⁵²).	28
Figura 3.1 Esquema das três instalações	35
Figura 3.2 Conjunto de serpentinas.....	35
Figura 3.3 Filtração por membrana das amostras de cerveja.	38
Figura 3.4 Meio de cultura (A) Taylor com cobre (B) UBA com ABP (C) UBA	38
Figura 3.5 Incubação de placas na estufa em (A) aerobiose (B) anaerobiose.....	39
Figura 3.6 Luminómetro usado em análise por bioluminescência.....	40
Figura 3.7 Cabine de prova para análise sensorial	41
Figura 4.1 Pistão de uma torneira Mafridis com contaminação.....	50
Figura 4.2 Esquema da troca de barril.....	69

Índice de tabelas

Tabela 2.1 Principais compostos responsáveis por alterações no sabor e aroma, formados durante o armazenamento da cerveja (Adaptado de ²⁴).....	17
Tabela 2.2 <i>Off-flavours</i> da cerveja produzidos por microrganismos contaminantes.	30
Tabela 4.1 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas águas de enxaguamento antes e após a primeira higienização.....	45
Tabela 4.2 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, nas primeiras 10 semanas.	47
Tabela 4.3 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, à 10 ^a semana.....	47
Tabela 4.4 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, à 10 ^a semana.....	48
Tabela 4.5 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, das primeiras 10 semanas.....	49
Tabela 4.6 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, nas primeiras 10 semanas.	52
Tabela 4.7 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, à 10 ^a semana.....	53
Tabela 4.8 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, à 10 ^a semana.....	53
Tabela 4.9 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, das primeiras 10 semanas.....	55
Tabela 4.10 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de <i>clicks</i> , nas primeiras 10 semanas. ..	57
Tabela 4.11 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de <i>clicks</i> , à 10 ^a semana.....	57
Tabela 4.12 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de <i>clicks</i> , à 10 ^a semana.....	58
Tabela 4.13 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de <i>clicks</i> , das primeiras 10 semanas.....	59

Tabela 4.14 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, nas primeiras 10 semanas.	61
Tabela 4.15 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, à 10ª semana.	61
Tabela 4.16 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, à 10ª semana.	62
Tabela 4.17 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, das primeiras 10 semanas.	63
Tabela 4.18 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, nas primeiras 10 semanas.	65
Tabela 4.19 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, à 10ª semana.	65
Tabela 4.20 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, à 10ª semana.	66
Tabela 4.21 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, das primeiras 10 semanas.	67
Tabela 4.22 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas águas de enxaguamento antes e após a segunda higienização.	70
Tabela 4.23 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes a todos os testes, nas 3 semanas após a segunda higienização.	71
Tabela 4.24 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes a todos os testes, nas 3 semanas após a segunda higienização.	72
Tabela 4.25 Análise por bioluminescência do esfregaço recolhido às 4 serpentinas.	73
Tabela 4.26 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja com as serpentinas antigas e as novas.	74
Tabela 4.27 Controlo organolético das amostras de cerveja com as serpentinas antigas e as novas.	75
Tabela 4.28 Resultados da análise microbiológica das instalações 4 e 6.	75

Lista de abreviaturas

DMS - dimetilsulfureto

DMDS - dissulfureto de dimetilo

DNA- ácido desoxirribonucleico

FEP- etileno propileno fluorado

IPA - India pale ale

LAB – bactérias ácido-láticas

RNA - ácido ribonucleico

SLES - lauril éter sulfato de sódio

SMM - S-Metil-Metionina

TP - tara perdida

TR - tara retornável

1. Introdução

1.1 Super Bock Group

O *Super Bock Group* é a maior empresa portuguesa de bebidas refrescantes cuja atividade central assenta nos negócios das cervejas e das águas engarrafadas. Está presente também nos segmentos de refrigerantes, vinhos, na produção e comercialização de malte e no negócio do turismo, detendo dois ativos de referência na região de Trás-os-Montes: os Parques Lúdico-Termas de Vidago e Pedras Salgadas. ¹ Possui várias marcas conhecidas e uma vasta gama de produtos conforme descrito na Fig. 1.1.



Figura 1.1 Marcas e produtos comercializados pelo *Super Bock Group*. ²

A empresa está sediada em Leça do Balio mas ganha corpo numa geografia mais alargada. A produção de cerveja e sidras está centralizada na sede mas existem mais 12 centros de produção em locais estratégicos, distribuídos pelo país, que incluem a produção de sumos, refrigerantes e de vinhos e ainda a captação e engarrafamento de água, vendas e operações. A empresa tem mais de 1300 colaboradores que garantem a excelência na qualidade dos produtos, atributo esse que constitui a chave para o sucesso e representa uma responsabilidade constante. ³

Esta dissertação foi realizada no departamento da Qualidade, Ambiente e Segurança, no centro de produção de Leça do Balio do *Super Bock Group* e insere-se no âmbito do trabalho desenvolvido pela área funcional dos Serviços Técnicos em parceria com a Assistência Técnica.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Processo cervejeiro

A cerveja é uma bebida obtida por fermentação alcoólica, por ação de leveduras selecionadas adicionadas a um mosto produzido a partir de malte de cereais, principalmente cevada e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, juntamente com água, ao qual é adicionado o lúpulo. As características finais da cerveja estão relacionadas com as matérias-primas utilizadas e dependentes dos vários procedimentos que decorrem ao longo das diferentes etapas do processo cervejeiro (Fig 2.1).⁴

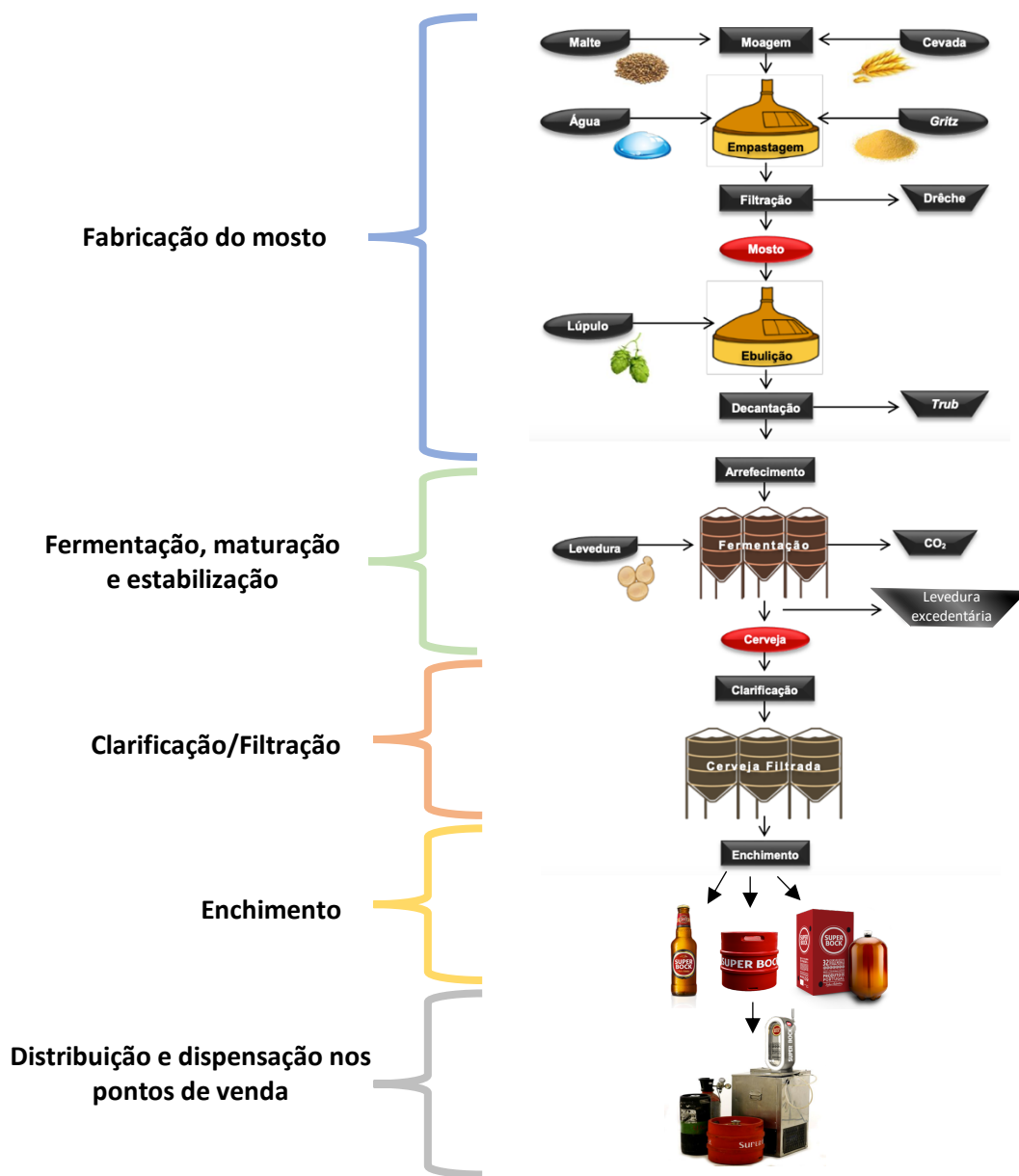


Figura 2.1 - Etapas do processo cervejeiro (Adaptado de⁵).

2.1.1 Produção da cerveja

O processo de produção da cerveja inicia com a **maltagem** que consiste na conversão da cevada em malte. O malte tem origem na germinação e posterior dessecação da cevada, processo este que tem como objetivo a obtenção de enzimas de degradação do amido e de proteína que são produzidas durante a germinação. A fim de possibilitar a rápida extração e conversão dos componentes do malte, dá-se a **moagem**.⁶ A seguir, essa farinha é enviada para caldeiras de empastagem e misturada com água quente para estimular a ação das enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas em aminoácidos metabolizáveis pela levedura e pela conversão de amido em açúcares fermentáveis num processo designado de **brassagem**. O passo seguinte, a **filtração**, tem como objetivo a separação das partículas sólidas não solúveis (dreche) do mosto. O mosto filtrado é enviado para a caldeira de ebulição e adiciona-se o lúpulo. Através da fervura do mosto, são inativadas as enzimas, destruídos os microrganismos (esterilização) e são precipitadas a maior parte das proteínas e polifenóis (*trub*).⁷ Terminada a ebulição, o *trub* é eliminado por decantação e o mosto é arrefecido e enviado para as cubas de fermentação onde é inoculada a levedura.⁶

A **fermentação** é a etapa mais importante de todo o processo cervejeiro, durante a qual as leveduras, em condições anaeróbicas, transformam os açúcares fermentescíveis do mosto em etanol e CO₂, essencialmente. A oxidação da glucose e da frutose, através da glicólise, origina o piruvato. Este produto da glicólise, sofre uma descarboxilação pela ação da enzima piruvato descarboxilase, libertando o CO₂, que se acumula nas bolhas características da cerveja, e acetaldeído. Este aldeído sofre uma redução, havendo a oxidação do NADH a NAD⁺ e forma-se o etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase (Fig 2.2).^{8 9}

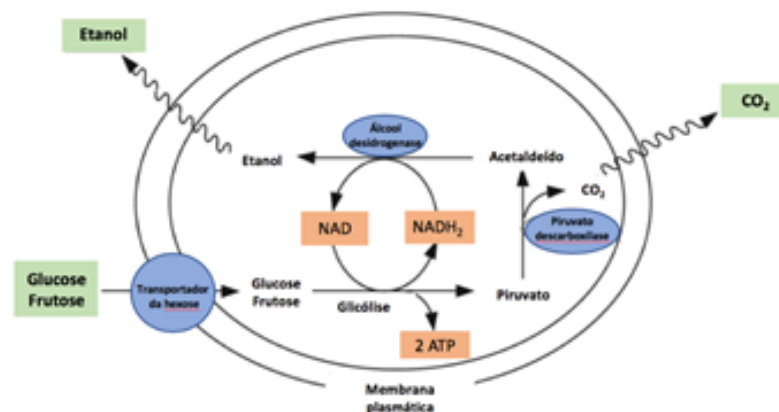


Figura 2.2 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica na levedura (Adaptado de ¹⁰).

Quando já não existem açúcares fermentescíveis na cerveja, começam a depositar-se, no fundo cónico da cuba, agregados de levedura (floculação). ⁹

Após o fim da fermentação, inicia-se a fase de **maturação** que corresponde ao período de estacionamento da cerveja a temperaturas mais baixas com o intuito de permitir a libertação de *off-flavours*, garantindo que estes não estejam presentes no produto final. Para o diacetilo (com sabor/aroma a manteiga rançosa), ocorre uma redução da temperatura até aos 7°C favorecendo a sua decomposição a acetoína e a butanodiol (de sabor/aroma neutro). A **estabilização** é a operação seguinte e consiste em deixar estabilizar a cerveja, a temperaturas entre os 0°C e os 2°C, de forma a permitir que esta se equilibre coloidalmente. Esta estabilização vai não só proporcionar a clarificação do mosto, com a deposição das restantes células de levedura ainda em suspensão, mas também garantir a obtenção de uma cerveja mais estável ao nível das características organoléticas. ¹¹

O processo seguinte, a **filtração/clarificação** da cerveja deve ser realizada mantendo as baixas temperaturas e na ausência de O₂. A presença de O₂ na cerveja desencadeia reações de oxidação que resultam na produção de compostos prejudiciais ao sabor/aroma e à estabilidade da cerveja. ¹² Inicia-se com uma centrifugação, no qual se elimina o que resta de levedura e partículas em suspensão. De seguida, a cerveja passa por 3 filtros, um de *kieselghur* em que as partículas responsáveis pela turvação ficam retidas no leito filtrante e passa através deste apenas a cerveja límpida. De seguida, para o filtro de placas ou filtro PVPP (poli-vinil-poli-pirrolidona) para adsorver os polifenóis que ficam retidos no filtro, evitando assim a formação de turvação a longo prazo. ⁶ E por último, os filtros *trap* que são

utilizados com o intuito de melhorar a operação de clarificação já que estes são capazes de remover as partículas sólidas que ainda ficaram em suspensão após a passagem pelos outros filtros. ¹³ Por fim, a cerveja filtrada é armazenada em Tanques de Cerveja Filtrada (TCFs) e está pronta para o **enchimento**.

2.1.2 Enchimento da cerveja

As cervejas podem ser acondicionadas em garrafa ou em barril, nas respectivas linhas de enchimento, ou em caminhões-cisterna no caso de *Beer Drive*. Existem sete linhas de enchimento, duas de enchimento em barril e cinco de enchimento em garrafa. As linhas de enchimento de barril apresentam grandes diferenças entre elas. Uma destina-se ao enchimento de barris de tara retornável (TR), que são de poliuretano, revestido ou não com inox e a outra a barris de tara perdida (TP) feitos de politereftalato de etileno (PET) (Fig 2.3).



Figura 2.3 (A) Garrafas (B) Barril TP (C) Barril TR (D) *Beer Drive* ²

A pasteurização da cerveja acondicionada em barril designa-se por pasteurização flash. O tratamento consiste num permutador de calor que eleva a temperatura do produto até à temperatura de pasteurização, através da passagem deste em contra-corrente com água quente ou vapor. Depois, o produto mantém-se à temperatura a que foi aquecido num tubo (holding) por alguns segundos e, de seguida, passa em contra-corrente com água glicolada, o que provoca o seu arrefecimento. A cerveja pasteurizada é enviada para um tanque tampão onde é armazenada até ir para os módulos de enchimento. Tendo em conta que a pasteurização é realizada antes do enchimento, é fundamental que os barris estejam estéreis para receber o produto e que o enchimento seja uma operação assética, de maneira a assegurar a isenção de microrganismos. ¹⁴

Os barris de tara retornável, como vêm diretamente dos pontos de venda e são novamente utilizados, exigem um procedimento de higienização, antes de introduzir o produto para garantir que não há qualquer vestígio de cerveja no interior do barril ou qualquer contaminante que pode originar uma contaminação cruzada. O reagente utilizado é o NaOH, um agente alcalino que vai permitir a conversão da matéria orgânica, proveniente da cerveja, em produtos solúveis e facilmente removidos com água. Atua ao nível da solubilização de hidratos de carbono e de proteínas grandes e insolúveis em polipeptídeos pequenos e mais facilmente solúveis e da saponificação de gorduras. Reage também com as membranas celulares, DNA e RNA, destruindo leveduras indesejadas e bactérias. ¹⁵

Inicialmente, os barris entram num túnel e são atingidos com jatos de água quente e com NaOH que eliminam a contaminação exterior. De seguida, entram na pré-lavadora, responsável pela primeira lavagem interior do barril, através da injeção de 5 a 8 L de uma solução de NaOH. O barril segue depois para um dos seis módulos de enchimento, que estão divididos em oito estações, com funções específicas (Fig 2.4):

1. Período de espera para o NaOH atuar sobre os resíduos;
2. Enxaguamento com a primeira solução de NaOH (2 - 3%);
3. Enxaguamento com água fria e pré-enchimento com a segunda solução de NaOH;
4. Período de espera com a segunda solução de NaOH (1,7 - 2,7%);
5. Novo enxaguamento com a segunda solução de NaOH;
6. Enxaguamento com água quente (54-85°C) para aumentar a eficácia do NaOH;
7. Esterilização com vapor, seguido de enchimento com CO₂ para expulsar o O₂;
8. Enchimento do barril com o produto.



Figura 2.4 As 8 estações do módulo de enchimento. ¹⁶

Após o enchimento, é efetuado um controlo microbiológico da cerveja no interior do barril e é realizada uma análise sensorial de forma a assegurar a qualidade do produto. Após esse procedimento, os barris são distribuídos pelos pontos de venda, onde serão acoplados a um sistema de extração.

2.2 Sistema de extração de cerveja

Os princípios básicos para preservar a qualidade da cerveja nos sistemas de extração são determinados pelo uso das peças e acessórios corretos, a garantia dos parâmetros físicos exigidos (pressão de CO₂ adequada, ausência de luz e de O₂ e baixas temperaturas), o asseguramento das condições de higiene e o cumprimento dos ciclos de higienização. ¹⁷

Existem três tipos de sistemas de abastecimento de cerveja nos sistemas de extração e dependem do volume de negócio de cada ponto de venda. Para consumos mais baixos são instalados barris TP com capacidade de 10 ou 20L. Isto permite que o cliente consuma o barril mais rapidamente, garantindo que a cerveja não permaneça dentro do barril, ligada a um sistema de extração, por muito tempo, assegurando a qualidade da mesma. Para consumos intermédios são utilizados barris TR de 30 ou 50L. Para os clientes com maior consumo é adotado o sistema de *Beer Drive*. Em vez de barris, são instalados tanques de armazenamento de 250, 500 ou 1000L e a cerveja é entregue em camiões-cisterna e bombeada para esses tanques. ¹⁸

2.2.1 Componentes

A instalação de extração de cerveja para barril TR é constituída pelos seguintes componentes, representados na Fig 2.5.¹⁸

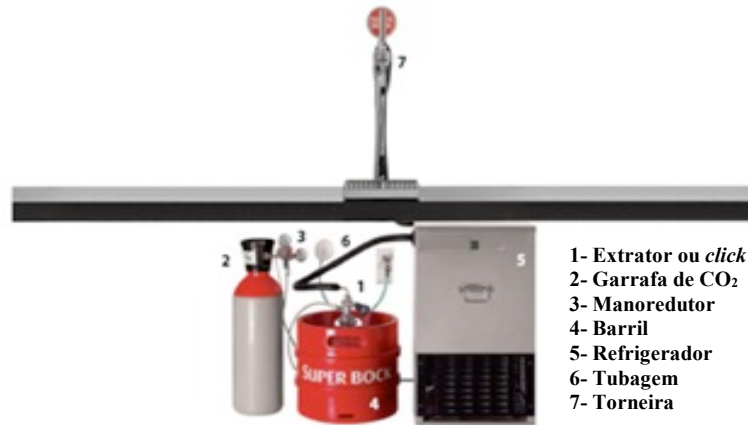


Figura 2.5 Componentes do sistema de extração de cerveja.¹⁸

O **extrator ou *click*** é o componente responsável pela ligação do barril à tubagem. Apresenta dois pontos de ligação, um onde estará ligada a garrafa de CO₂, responsável pela injeção de CO₂ pressurizado para dentro do barril e o outro destinado ao produto, para a extração da bebida de dentro do barril por diferença de pressão (Fig 2.6). O *click* possui uma alavanca que é acionada para baixo após o acoplamento ao barril. Esse movimento provoca a subida do pistão permitindo que a cerveja se desloque do interior do barril para a tubagem e de seguida, até à torneira, através do CO₂ injetado que irá ocupar o espaço vazio deixado pela cerveja.^{17 18}



Figura 2.6 Esquema do *click* montado (à esquerda) e desmontado (à direita)¹⁸

A **garrafa de CO₂** armazena o gás sob pressão, estando aproximadamente a 50 bar. Não deve ser exposto às condições do exterior, nem a fontes de calor. O conteúdo de CO₂ da cerveja é natural para o processo de fermentação e é determinado de acordo com o tipo e estilo da cerveja. Idealmente, esse conteúdo não deve ser alterado enquanto o barril estiver acoplado ao sistema. A principal influência do CO₂ é impulsionar a cerveja à torneira. A quantidade presente numa garrafa dá para, aproximadamente, 20 barris de cerveja.^{17 18}

O **manoreductor** garante que a pressão injetada para o barril não excede o valor recomendado, entre 2 e 3 bar. Este componente é fundamental para assegurar um controlo e uma regulação da pressão, fator crucial para garantir a saída da cerveja com o teor de CO₂ e um nível de espuma adequados. Quando o CO₂ é injetado para o interior do barril com uma determinada pressão, fica aprisionado e formam-se pequenos centros de nucleação onde este, supersaturado, se acumula e começa por se libertar do líquido formado uma bolha que vai crescendo devido ao diferencial de pressão entre a solução e a pressão atmosférica. Quando a pressão interna da bolha ultrapassa a resistência superficial do líquido, esta sobe até à superfície e deixa para trás outra pequena bolha, dando início novamente ao processo. Se a pressão exercida para o interior do barril for insuficiente, haverá pouco CO₂ dissolvido na cerveja, o que leva a uma desgaseificação da cerveja, enquanto que uma pressão excessiva, resulta numa maior absorção de CO₂ pela cerveja, o que levará à formação de muitas bolhas e conseqüentemente, muita espuma.^{17 18}

O **barril** é o recipiente no qual está armazenado o produto sob pressão. Pode variar de formato e de capacidade (30 ou 50L). Para manter a qualidade da cerveja e evitar ou retardar a ocorrência de reações no seu interior, provocando alterações no produto, as condições de armazenamento do barril são essenciais. Deve ser armazenado num local fresco e arejado, com boas condições de higiene e ao abrigo da luz. O condicionamento da cerveja a temperaturas mais baixas atrasa todos os fenómenos associados ao seu envelhecimento.¹⁹ Os barris armazenados possuem uma validade máxima de 6 meses, mas após a sua abertura, devem ser consumidos num período máximo de uma semana.

O **refrigerador** garante o arrefecimento da bebida até à temperatura desejada, retardando as reações de envelhecimento da cerveja. A cerveja passa por um circuito, designado de serpentina, que é um componente mergulhado num banho de água gelada, e que permite a sua refrigeração. A instalação tem de estar em boas condições para que a cerveja seja servida

à temperatura adequada, entre os 2 e os 4°C. Para isso, a grelha do refrigerador deve estar sempre limpa para garantir uma boa ventilação, o banho de água deve ter um bom banco de gelo e essa água deve estar bem límpida e em quantidade suficiente para cobrir a serpentina. A bomba de água deve estar em perfeito estado de funcionamento (Fig 2.7).¹⁸

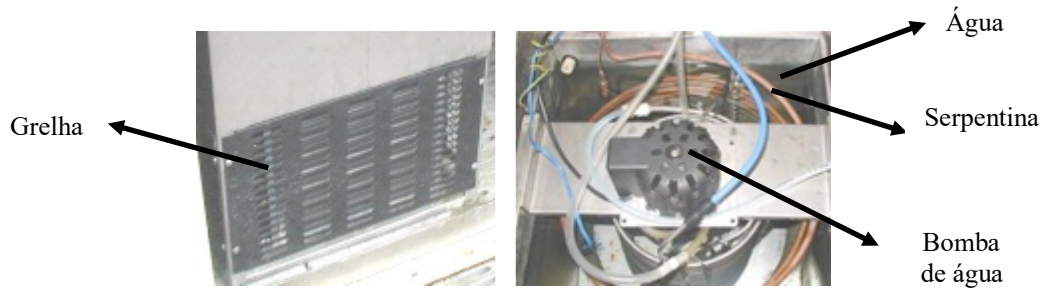


Figura 2.7 Esquema do refrigerador.¹⁸

A **tubagem** permite a passagem da bebida, desde o barril até ao refrigerador e, de seguida, até à torneira de extração. O material da tubagem tem de garantir resistência aos produtos de higienização e impedir a adesão de material orgânico proveniente da cerveja que resulta no desenvolvimento de microrganismos e consequentemente, na formação de biofilmes. Os tubos *standard*, mais utilizados em sistemas de extração, são feitos de policloreto de vinilo (PVC). Têm uma maior capacidade de adesão de biofilmes e são transparentes, o que permite a passagem da luz solar, interferindo com a qualidade da cerveja devido à ocorrência de fenómenos de foto-oxidação, associados à formação de um composto com aroma/sabor desagradável, o 3-metilo-2-buteno-1-tiol. Uma alternativa a estes são os tubos de python que asseguram uma menor adesão de biofilmes, por serem constituídos por polietileno e por um revestimento isolante com 13 mm de espessura, no mínimo, que garante um bom isolamento e evita a entrada de O₂ para o interior do sistema. São envolvidos por um filme estirável e uma manga isolante, impedindo a passagem da luz solar e evitando as reações de foto-oxidação. Estes tubos garantem ainda uma diminuição da temperatura da cerveja visto que no interior do tubo de python, circulará água refrigerada, mantendo a temperatura ideal da cerveja até à sua saída pela torneira. (Fig 2.8). Existem dois tipos de tubo de python, com mecanismos de arrefecimento diferentes, o tubo de contacto e o tubo de inundação. O tubo de contacto consiste num conjunto de 3 tubos sendo que dois deles são responsáveis pela passagem da água e um pela passagem de cerveja. A água proveniente do banco de gelo

entra, por ação da bomba de água do refrigerador, por um dos tubos da água e retorna pelo outro. O tubo por onde circula a cerveja como está encostado aos tubos onde ocorre a circulação dessa água refrigerada permite o arrefecimento, por contacto, da cerveja. O tubo de inundação é um tubo de maior diâmetro constituído internamente por três tubos de menor diâmetro, dois para circulação de água e um para a circulação de cerveja. O tubo responsável pela entrada da água é curto, permitindo que a água, que vem do banco de gelo, entre nesse tubo, por ação da bomba de água do refrigerador e saia de imediato, preenchendo o tubo grande e inundando o tubo onde circula a cerveja. Após isso, a água retorna ao refrigerador pelo outro tubo da água. Assim, a cerveja é refrigerada porque o tubo por onde circula, é inundado de água. ^{18 20}



Figura 2.8 Tubo *standard* (A) de contacto (B) de inundação (C) ²¹

A **torneira** é o último local de passagem do produto até chegar ao copo. Existe dezenas de formatos e feitios de torneiras, mas no *Super Bock Group* são utilizadas as torneiras de pistão e as de corte (Fig 2.9). O seu funcionamento é, de uma forma geral, semelhante mas a diferença dos componentes internos provocam alterações físicas da cerveja no copo, conduzindo a uma maior ou menor formação de espuma. A torneira Mafridis é o modelo mais antigo e o mais frequente nos pontos de venda. É feita de aço-inox e o seu funcionamento é regulado internamente através de um pistão. Já as torneiras de corte, são de inox e possuem uma esfera interna, que resulta numa maior formação de espuma. Dentro das torneiras de corte, existem três modelos, as CMB e as Antoine com e sem regulador de caudal. As torneiras com caudal regulável, possuem essa especificidade porque, para além da esfera comum a todas as torneiras de corte, têm um cilindro interno que provoca um estrangulamento da cerveja, permitindo a diminuição ou o aumento do seu caudal. ¹⁸

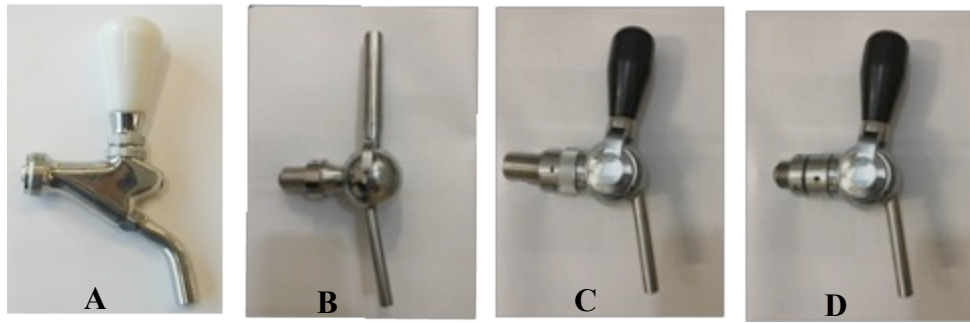


Figura 2.9 Torneira (A) de pistão Mafridis (B) de corte CMB (C) de corte Antoine com regulador de caudal (D) de corte Antoine sem regulador de caudal

2.2.2 Reações no interior do barril

Apesar do processo de envelhecimento ocorrer ao longo do período de armazenamento mesmo em barris fechados, após a sua abertura e acoplado a um sistema de extração, a entrada de O_2 , por muito pequena que seja, vai acelerar o processo de envelhecimento, alterando as características organolépticas da cerveja, e reduzindo abruptamente a validade do produto.^{17 18} Essas alterações na estabilidade sensorial da cerveja incluem uma diminuição da intensidade do amargor, um aumento da intensidade das características “doce” e “caramelo/torrado” de forma contínua e ao aparecimento das características “folha de groselha” e “papel/cartão”, sensivelmente, a meio do termo de vida da cerveja. A característica “folha de groselha”, após surgir, diminui de intensidade no tempo, enquanto que a característica a “papel/cartão” aumenta continuamente. (Fig.2.10)²²

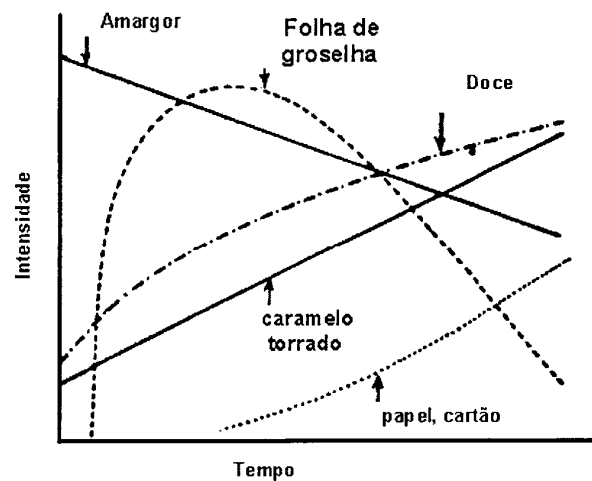


Figura 2.10 Alterações sensoriais ao longo do envelhecimento da cerveja.²²

Existem vários fenômenos responsáveis por essas alterações sensoriais da cerveja no interior do barril e que resultam na degradação e formação de novos compostos.¹⁹

Fomação de espécies reativas do oxigênio (ROS): O aumento da concentração de O_2 e da temperatura leva ao aumento de concentração de radicais livres que reagem com outros compostos da cerveja como: etanol, açúcares, isohumulonas, polifenóis, álcoois, ácidos gordos, entre outros. O radical hidroxilo ($\cdot OH$) irá reagir primeiramente com o etanol, devido à sua alta reatividade e por ser o composto mais abundante na cerveja, formando acetaldeído + Radical Hidroperóxido (ROS). O acetaldeído, descrito como um *off-flavour* quando presente em concentrações acima do seu limite de percepção, irá conferir à cerveja um aroma/sabor a maçã verde.¹⁹ A sua concentração típica na cerveja varia entre 2-15 mg/L e tem um limite de percepção de 5-15 mg/L.²³

Oxidação de ácidos gordos insaturados: Os radicais livres reagem com as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados presentes na cerveja como ácido oleico, linoleico e linolénico, formando hidroperóxidos e posteriormente *trans-2-nonenal*, através de um processo designado por auto-oxidação. Este composto tem sabor a papel/cartão e é o maior indicador do processo de envelhecimento de cervejas. Possui um limite de percepção de 50 – 100 $\mu g/L$. Apesar deste composto ser o aldeído com maior atividade de odor existem outros aldeídos como o nonadienal, decadienal e undecadienal que podem ser percebidos. O aumento da concentração de *trans-2-nonenal* durante o armazenamento da cerveja está ligado ao processo de oxidação durante o processamento. O *trans-2-nonenal* é derivado da

oxidação do ácido linoleico no final da etapa de fervura. Ao ligar-se a compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, o *trans*-2-nonenal é protegido da atividade das leveduras, podendo estar presente no produto final. Posteriormente, principalmente quando o pH da cerveja é baixo ou o armazenamento ocorre a temperatura alta, este composto pode ser libertado através de hidrólise ácida. ¹⁹

Reações de Maillard: Estas reações ocorrem predominantemente durante a produção do mosto devido às altas temperaturas, no entanto algumas continuam durante o armazenamento da cerveja, mesmo em baixas temperaturas. São reações entre um açúcar simples e um aminoácido. Produzem α -dicarbonilos e em pH baixo, produzem-se melanoidinas, hidroximetilfurfural, furfural e furaneol. Estes α -dicarbonilos, na presença de O₂, ligam-se a aminoácidos e formam Aldeídos de Strecker que irão conferir sabor/aroma a “caramelo” e “torrado”. ¹⁹

Síntese e Hidrólise de Ésteres: Durante o envelhecimento da cerveja, os ésteres formados acima do seu equilíbrio químico hidrolisam-se a uma taxa característica. Ésteres de acetato de álcoois superiores como o acetato de isoamilo, hidrolisam mais rapidamente que os ésteres etílicos correspondentes, independentemente do teor alcoólico da bebida. Contribuem com notas frutais no perfil de sabor e aroma da cerveja, no entanto ao serem hidrolisados durante o envelhecimento, levam a uma redução da sua concentração. Em contrapartida, outros ésteres (3-metil butirato de etilo e 2-metil propianato de etilo) têm a sua concentração aumentada, dando origem ao sabor/aroma a vinho. ¹⁹

Degradação de Resinas do Lúpulo: α -ácidos, β -ácidos e iso- α -ácidos também sofrem processo oxidativo durante o envelhecimento da cerveja, sendo as iso-humulonas as mais suscetíveis à oxidação, ocorrendo uma diminuição do amargor da cerveja. Além deles, foi também observado o decréscimo na concentração de flavonóides e aumento na concentração de taninos, associados ao aumento da adstringência em cervejas. ¹⁹

De uma forma geral, os principais grupos de compostos formados durante o envelhecimento são os aldeídos, cetonas, ésteres e compostos de enxofre. (Tabela 2.1) ²⁴

Tabela 2.1 Principais compostos responsáveis por alterações no sabor e aroma, formados durante o armazenamento da cerveja (Adaptado de ²⁴).

Classe química	Compostos mais frequentes
Aldeídos	Acetaldeído/ (E)-2-nonenal / Furfural / 2-metilbutanal / Metional
Cetonas	(E)- β -damascenona/ 4-metil-2-pentanona
Ésteres	3-metil butirato de etilo / 2-metil propionato de etilo
Compostos de enxofre	DMS / 3-metil-3-mercaptoputilformato

2.2.3 Contaminação microbiológica

A cerveja é, do ponto de vista microbiano, um meio de crescimento relativamente pobre devido à presença de inibidores como compostos de lúpulo (aproximadamente 17 a 55 ppm de iso α -ácidos) que são especialmente tóxicos para as bactérias Gram-positivas, etanol (3,5 a 5% v/v), dióxido de enxofre, elevado teor de CO₂ (aproximadamente 0,5% p/p), baixo pH (3,8-4,7) e baixo teor de O₂ (<0,1ppm). ²⁵ No entanto, apesar do ambiente inóspito, alguns microrganismos não patogênicos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras selvagens, conseguem desenvolver-se na cerveja porque existem, no produto final, vestígios de substâncias nutricionais como glucose, maltose e maltotriose, açúcares esses que podem ser metabolizados por esses microrganismos presentes. Para além disso, o sistema de extração de cerveja e os componentes que o constituem, criam condições propícias ao crescimento dessas bactérias e de leveduras selvagens resultando na formação de turvações e de sabores e aromas indesejáveis ao produto. ²⁶

É efetuado um controlo microbiológico da cerveja à saída da indústria cervejeira para assegurar a qualidade microbiológica, mas após o acoplamento do barril a um sistema de extração podem ocorrer contaminações. ²⁷ A contaminação microbiana é encontrada ao longo de todo o sistema. Cada componente constitui um ponto fraco, mas os pontos mais críticos de contaminação num sistema de extração estão em ambas as extremidades: a torneira e o *click*. Os níveis mais elevados de O₂, que prevalecem nestes locais, fornecem condições aeróbicas que favorecem reações de oxidação, aceleram o processo de

envelhecimento da cerveja no interior do barril e ainda permitem o crescimento de bactérias ácido-acéticas, níveis moderados de enterobactérias e leveduras selvagens aeróbicas. No entanto, podem também crescer microrganismos anaeróbicos como bactérias ácido-láticas, *Pectinatus* e *Megasphaera* que sobrevivem a estas condições devido à formação de biofilmes.²⁷

Os biofilmes são comunidades microbianas, espacial e metabolicamente estruturadas, formadas por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies (sejam bactérias, fungos e/ou protozoários). Formam-se quando uma superfície sólida entra em contato com um meio líquido na presença de microrganismos. Substâncias e minerais orgânicos são transportados para a superfície e criam um filme condicionador onde os nutrientes são concentrados, permitindo a adesão dos microrganismos. As células imobilizadas crescem, reproduzem-se e produzem polímeros extracelulares (exopolímeros), que podem ser polissacarídeos fibrosos ou glicoproteínas globulares, formando uma matriz.²⁸ Os biofilmes podem-se formar ao longo do sistema de extração por adesão microbiana, através da fixação da matriz extracelular, ao longo da superfície. Essa matriz gera gradientes complexos em relação aos nutrientes e difusão de O₂, contém enzimas extracelulares usadas para fins nutricionais, que permite a transferência de moléculas de comunicação celular e protege as células incorporadas contra compostos tóxicos. Assim, a formação de biofilme confere muitas vantagens às células microbianas, como resistência física (contra a dessecação), resistência mecânica (contra as correntes de líquido nas tubagens) e proteção química (contra os produtos químicos, antimicrobianos e desinfetantes) que trazem desvantagens, não só devido à contaminação da cerveja ou alteração das suas propriedades organolépticas mas também pela redução da eficiência e da vida útil dos equipamentos, por corrosão microbiologicamente induzida o que causa prejuízos económicos e problemas de segurança alimentar. Para além disso, oferece vantagem também às bactérias anaeróbicas obrigatórias, permitindo que se formem em sistemas de extração através do consumo de O₂ por parte das bactérias aeróbicas e/ou anaeróbicas facultativas, criando um ambiente anaeróbico, propício ao seu crescimento.²⁹

As bactérias ácido-acéticas, colonizadores primários nos biofilmes, colonizam as superfícies, em locais específicos de acumulação de resíduos de cerveja (tubagem, torneiras e *clicks*) e consomem o O₂, fornecendo um microambiente anaeróbico e ácido.²⁶ Juntamente com *Enterobacteriaceae*, produzem exopolissacarídeos e formam uma matriz extracelular,

criando adesão nesses locais e permitem a colonização de leveduras e bactérias ácido-láticas. A presença de lactato, produzido pelas bactérias ácido-láticas, e as condições anaeróbicas, asseguradas pelas bactérias ácido-acéticas e leveduras, permitem a colonização de contaminantes estritamente anaeróbicos da cerveja, como *Pectinatus* e *Megasphaera*. Finalmente, a cerveja e a espuma permanentemente a passar pelo sistema fornece um suprimento constante de nutrientes e por isso, os biofilmes são considerados um reservatório de organismos que deterioram a cerveja (Fig 2.11).³⁰

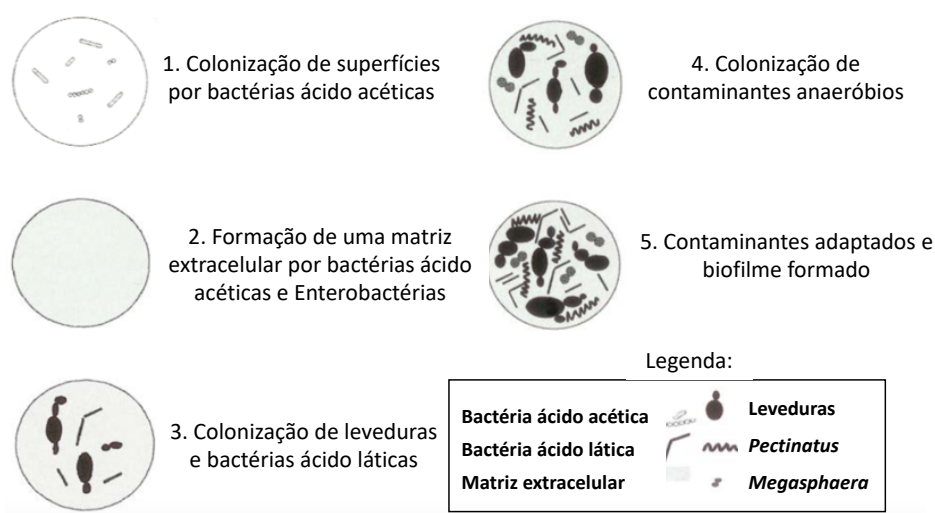


Figura 2.11 Desenvolvimento de biofilmes na cerveja (Adaptado de³⁰).

2.2.3.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias Gram-positivas nocivas à cerveja incluem *Lactobacillus* e *Pediococcus* que são bactérias ácido-láticas (LAB) com complexos requerimentos nutricionais e capacidades respiratórias limitadas. A multiplicação de algumas espécies é estimulada pela presença de CO₂.³¹ Causam turbidez, acidez e odores desagradáveis devido à formação de vários produtos metabólicos como diacetilo (2,3-butanodiona) e/ou pela dicetona vicinal relacionada (2,3-pentanodiona).¹⁴ Estas bactérias são, na sua generalidade, intolerantes aos ácidos do lúpulo, no entanto existem estirpes que são altamente resistentes aos componentes

do lúpulo por possuírem um mecanismo de resistência, como é o caso de *L. brevis* e *P. damnosus*, o que torna possível o seu desenvolvimento na cerveja.³¹

Lactobacillus são **anaeróbicas facultativas**, capazes de tolerar O₂ e resistir a um pH baixo. Algumas estirpes são ainda resistentes às resinas de lúpulo, sendo a de maior realce a *L. brevis*. Dependendo dos produtos formados no final do crescimento fermentativo, as *Lactobacillus* podem ser divididas em homofermentativas ou heterofermentativas (Fig 2.12). Nas homofermentativas, o principal produto do metabolismo do açúcar é o ácido lático e os açúcares são metabolizados por glicólise (ou via de Embden-Meyerhof). O piruvato, derivado da glicólise, é reduzido ao lactato pela ação da lactato desidrogenase ligada ao NADH.³² Nas heterofermentativas, há produção de uma mistura de produtos finais, incluindo lactato, glicerol, etanol e acetato. Utilizam a via da fosfoketolase, na qual o catabolismo da glucose ocorre via 6-fosfogluconato que, após uma reação de descarboxilação, forma a pentose, xilulose 5-fosfato. Além de ser uma alternativa à glicólise, fornece uma rota pela qual as pentoses podem ser catabolizadas. A fosfoketolase catalisa a clivagem do xilulose 5-fosfato para produzir, após a adição de outro grupo fosfato, uma molécula de tri-fosfato. A partir desses intermediários, formam-se glicerol, acetato, etanol e lactato. Para além disso, essa espécie utiliza citrato, piruvato, malato, arginina e tirosina da cerveja como substrato para a produção de ATP.³³

Pediococcus são igualmente **anaeróbicas facultativas**, podem tolerar pequenas quantidades de O₂ e crescer em condições microaerófilas. São tolerantes ao etanol e a maioria das estirpes é homofermentativa. Dentro deste grupo, a que requer maior atenção é *P. damnosus* pelo facto de ser resistente aos componentes do lúpulo e produzir elevadas quantidades de diacetilo.¹⁴

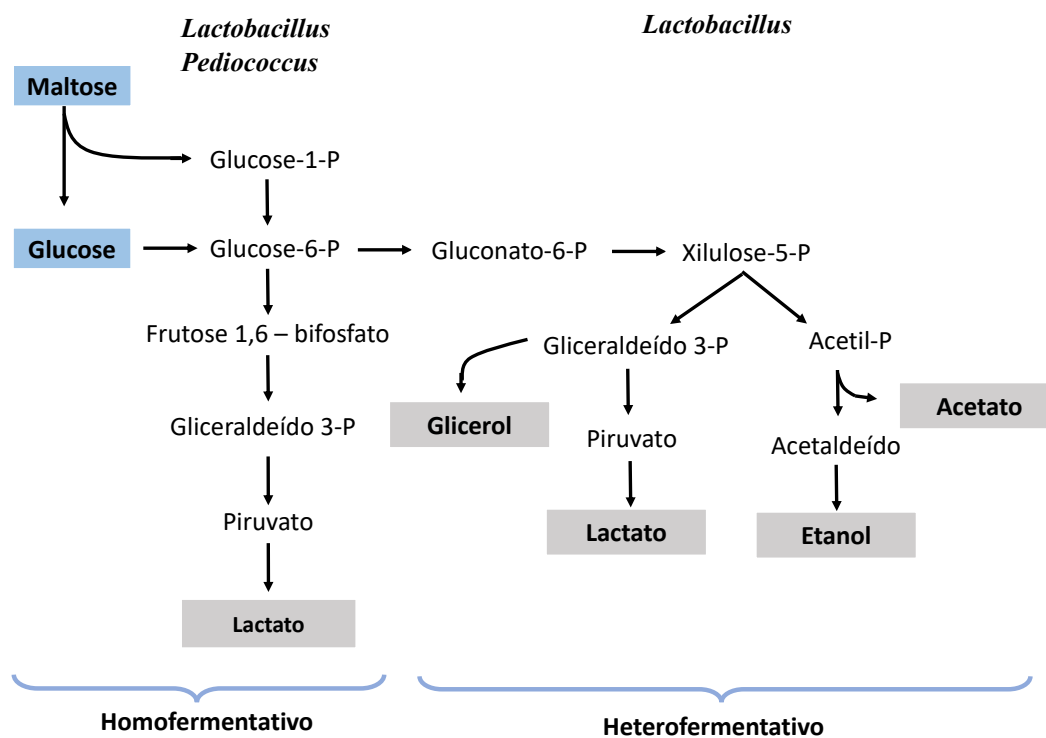


Figura 2.12 Metabolismo homo e heterofermentativo de LAB (Adaptado de ¹⁴).

2.2.3.2 Mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas ao lúpulo

Para além de todos os componentes que conferem à cerveja um poder bacteriostático e tornam a bebida num ambiente hostil ao desenvolvimento microbiano, os componentes do lúpulo são aqueles que merecem maior destaque. ³¹

O lúpulo, utilizado na fabricação da cerveja, contém polifenóis, resinas e óleos essenciais. Os α -ácidos, encontrados nas glândulas das resinas são insolúveis, mas durante a ebulição do mosto, isomerizam e resultam em produtos da isomerização solúveis, os iso- α -ácidos, responsáveis por acrescentar amargor à cerveja. ³⁴ Para além disso, estes ácidos possuem propriedades antibacterianas que inibem a proliferação de bactérias Gram-positivas, aumentando o prazo de validade da cerveja. ²⁶

Os iso- α -ácidos funcionam como ionóforos de prótons, dissipando o gradiente de prótons transmembranar, diminuindo o pH citoplasmático e esmagando a força motriz do próton. ³⁵ Isso prejudica a atividade enzimática e o transporte de nutrientes, interrompendo o

crescimento e levando à morte celular.²⁶ Além disso, participam em reações redox transmembranares em associação com o manganês (Mn^{2+}), causando stress oxidativo à célula bacteriana (Fig 2.13).³⁶

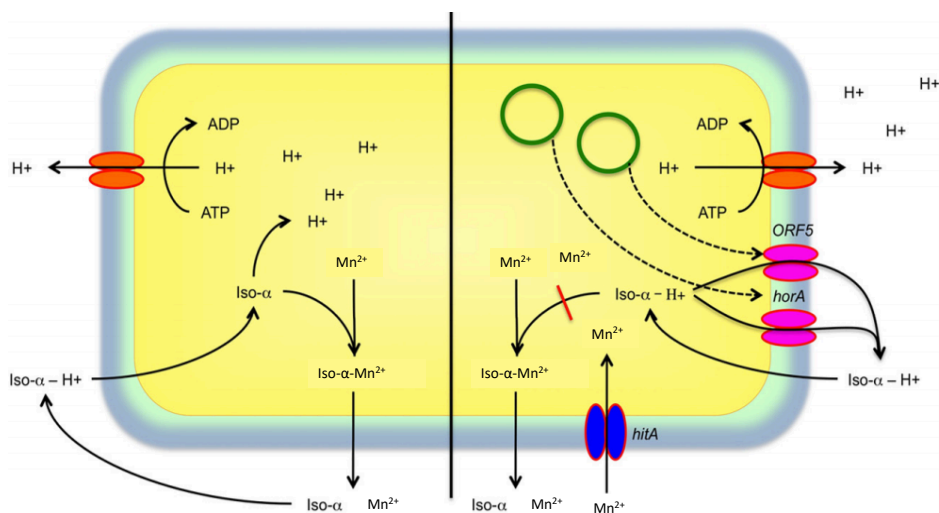


Figura 2.13 Mecanismo de resistência ao lúpulo em bactérias Gram-positivas.³⁷

No entanto, algumas bactérias Gram-positivas como *L. brevis* e *P. damnous* são capazes de deteriorar a cerveja por possuírem resistência aos componentes do lúpulo envolvendo múltiplos mecanismos de bacteriostase e, por isso, uma resposta celular complexa. Um fator chave na resistência ao lúpulo é a proteína transportadora HorA, dependente de ATP, codificada por plasmídeo, que purga os compostos de lúpulo da célula.²⁶ Foi demonstrado que outro transportador codificado por plasmídeo, ORF5, também confere resistência ao lúpulo. Além disso, as células resistentes regulam positivamente a expressão do transportador de cátion induzível por lúpulo HitA, o que pode facilitar o transporte de Mn^{2+} para as células stressadas por α -ácidos presentes do lúpulo, apesar da dissipação do gradiente de prótons.³⁸

2.2.3.3 Bactérias Gram-negativas

Vários gêneros de bactérias Gram-negativas são conhecidos por estarem envolvidos na deterioração da cerveja. Este tipo de bactérias é especialmente problemático devido ao facto de possuir resistência aos componentes do lúpulo.³¹

Gluconobacter e *Acetobacter*, são bactérias ácido-acéticas que convertem o etanol em ácido acético, resultando, conseqüentemente, num desagradável odor de vinagre, tornando a cerveja ácida.²⁵ Essas bactérias são resistentes aos ácidos do lúpulo e ao etanol, e podem contaminar a cerveja com a presença de O₂, sendo **aeróbicas obrigatórias**.³⁹ O etanol é primeiramente oxidado a acetaldeído, seguido de oxidação adicional em ácido acético, e as reações são catalisadas por enzimas citoplasmáticas ligadas à membrana, a álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respetivamente. Estas bactérias podem metabolizar vários açúcares presentes na cerveja e utilizá-los como fontes de carbono e energia, usando 3 vias alternativas. Em todas elas, a produção de energia ocorre como consequência da oxidação do NADPH via cadeia respiratória e da produção de ATP por fosforilação oxidativa. (Fig 2.14)^{40 41}

A via de Entner-Doudoroff (ED), converte glucose-6-fosfato em gluconato-6-fosfato. Este é então hidrolisado por uma aldolase para formar piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. A via de Warburg-Dickens (WD) ou ciclo de monofosfato de hexose é a via mais comum para o metabolismo da glucose e está presente em todas as espécies de bactérias ácido-acéticas. A glucose-6-fosfato desidrogenase transforma uma mole de glucose-6-fosfato numa mole de ribulose-5-fosfato com a formação de duas moles de NADPH. O gliceraldeído-3P, formado também por essa via, a partir de ribulose-5-fosfato, pode depois ser metabolizado na via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) ou glicólise formando o piruvato.^{40 41}

Os produtos finais dessas vias podem ser completamente oxidados pelas *Acetobacter* para produzir CO₂ e H₂O através do ciclo de Krebs. As *Gluconobacter*, como não possuem um ciclo funcional, devido à falta de α -cetoglutarato e succinato desidrogenases que impede a sua conclusão, ficam limitadas à oxidação de ácidos orgânicos.^{40 41}

Além da formação de ácido acético, o crescimento de *Gluconobacter* na cerveja leva à produção de grandes quantidades de dextranas e levanas, exopolissacarídeos produzidos pela metabolização da glucose, resultando numa elevada viscosidade da cerveja contaminada.⁴²

O sistema de extração é, frequentemente, contaminado por estas bactérias. A melhor proteção da cerveja e dos equipamentos é eliminar o O₂ e assegurar um controlo apertado na higienização ao longo de todo o sistema. ¹⁴

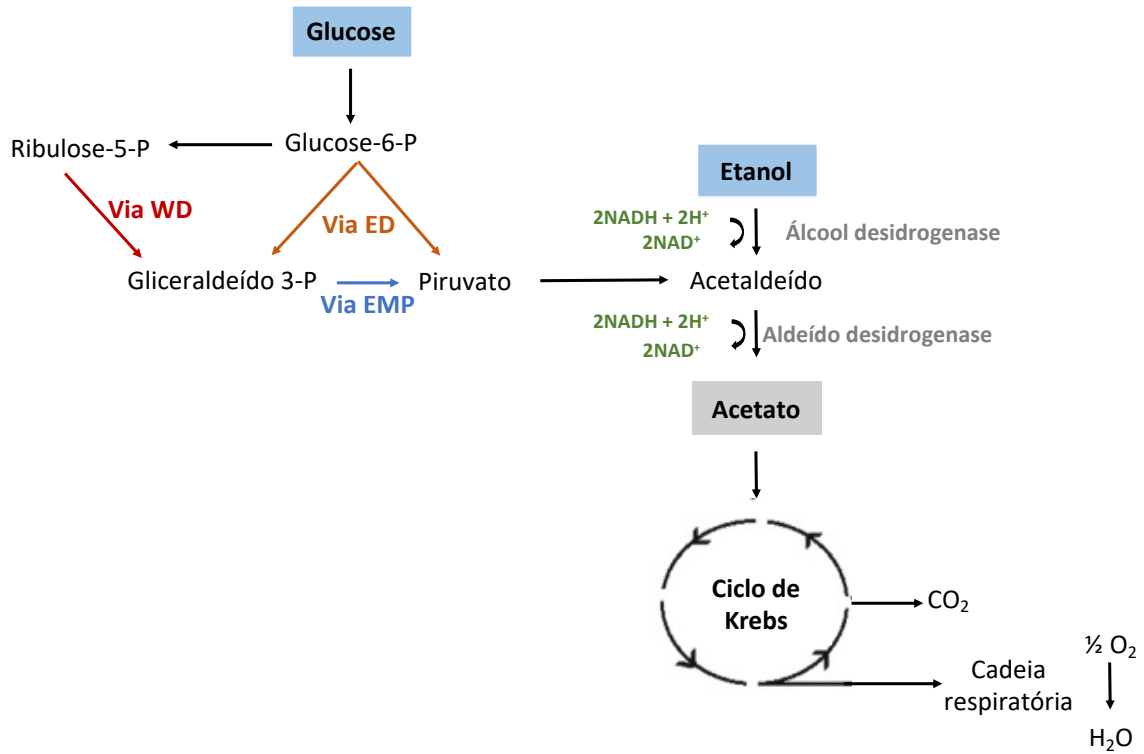


Figura 2.14 Metabolismo das bactérias ácido-acéticas (Adaptado de ^{40 41}).

Enterobacteriaceae (ou enterobactérias) são bactérias **anaeróbias facultativas**, capazes de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas. São tolerantes às resinas de lúpulo e podem fermentar uma variedade de açúcares, mas não podem utilizar etanol por isso, são incapazes de se desenvolver na cerveja. No entanto, como nos sistemas de extração as bactérias ácido-acéticas são frequentes, estas fornecem um microambiente anaeróbico e ácido, permitindo que as *Enterobacteriaceae* se formem e se acumulem em biofilmes, estando por isso, presentes em sistemas de extração. Uma infinidade de metabolitos bacterianos é responsável por alterações de sabor/aroma no produto final. Estes incluem acetato, acetaldeído, etanol, 2,3-butanodiol, diacetilo, acetoína, DMS e DMDS. Essa gama de produtos finais é um reflexo da versatilidade metabólica dessas bactérias (Fig 2.15). ¹⁴

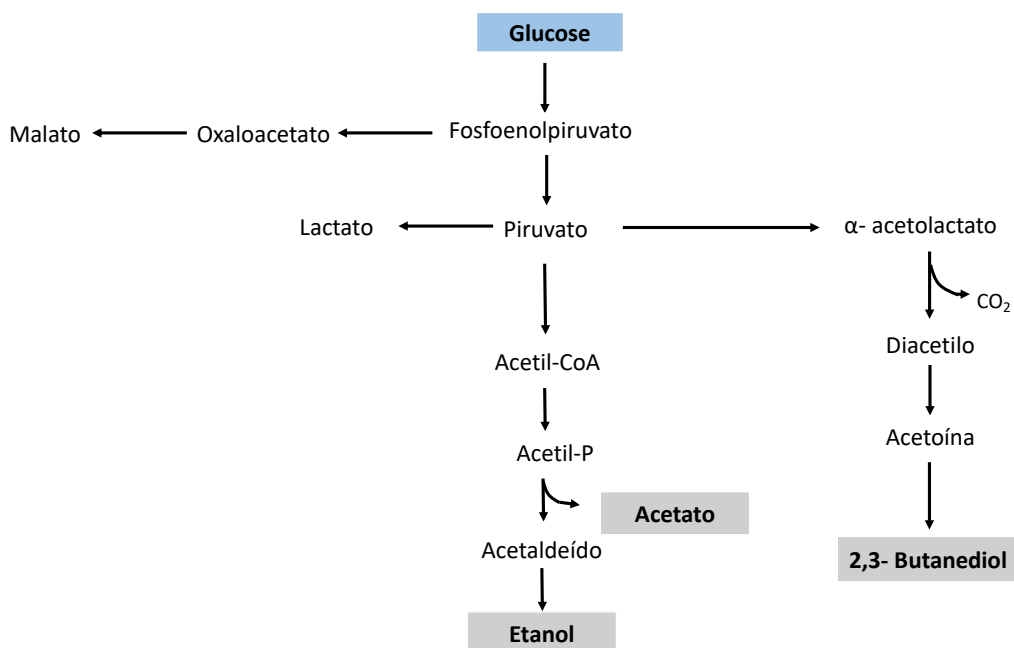


Figura 2.15 Metabolismo de *Enterobacteriaceae* (Adaptado de ¹⁴).

Zymomonas mobilis são bactérias **anaeróbias facultativas**, tolerantes ao O₂, resistente aos ácidos do lúpulo e capazes de se multiplicar em cervejas com pH acima de 3,4 e concentrações de etanol de 12-13% (v/v). A sua temperatura ótima de crescimento é relativamente alta, entre 25 e 30 °C. ⁴³ Essas bactérias podem utilizar açúcares como glicose e frutose, mas não são capazes de metabolizar maltose e maltotriose. São os únicos microrganismos conhecidos que utilizam a via ED anaerobicamente em vez da via EMP. Produzem etanol a partir de glicose, por essa via, em conjunto com as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (Fig 2.16). Etanol e CO₂ são os principais produtos do catabolismo quando as células crescem anaerobicamente com glicose. Possuem α-acetolactato descarboxilase, que produz acetoína diretamente, sem o intermediário do diacetilo. Além disso, forma também etanol, acetaldeído, dihidroxi-acetona, ácido acético, ácido láctico e glicerol. ^{14 44}

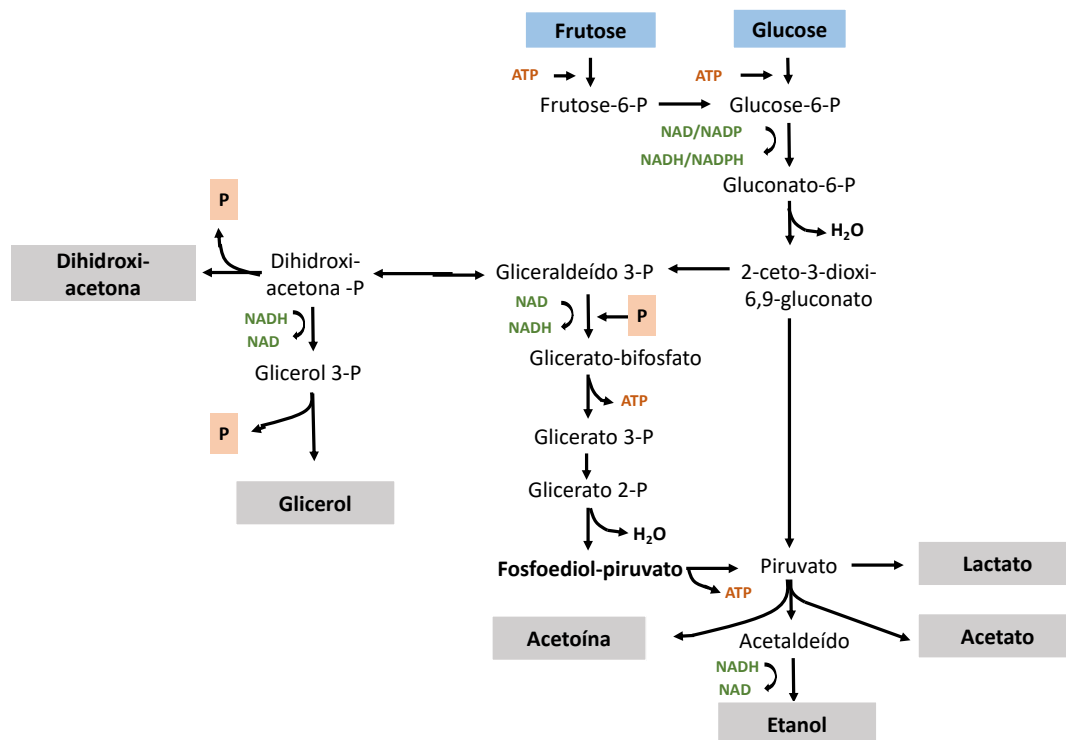


Figura 2.16 Metabolismo de *Zymomonas mobilis* (Adaptado de ⁴⁴).

Pectinatus são bactérias **anaeróbias obrigatórias** e podem tolerar quantidades muito reduzidas de O₂. Podem multiplicar-se em temperaturas de 15 a 40°C (ótima de 32°C), pH entre 3,5 a 6 (ótimo de 4,5) e em meios contendo até 4,5% p/p (aproximadamente 5,6% v/v) de etanol. ⁴⁵ O principal efeito de deterioração causado pelas espécies de *Pectinatus* é uma forte turbidez e um repulsivo cheiro a “ovo podre” resultante da combinação de diferentes ácidos gordos com sulfureto de hidrogénio ou ácido sulfídrico (limite de perceção de 4 µg/L), metil mercaptano (limite de perceção de 2 µg/L) e outros compostos de enxofre. ⁴⁶

Em contraste com outros contaminantes presentes na cerveja, *Pectinatus* é incapaz de utilizar a maltose, mas podem utilizar lactato. Os principais produtos finais metabólicos da glucose ou frutose são os ácidos propiónico, acético, diacetilo e 2,3-butanodiol. Durante a multiplicação destas bactérias são produzidas ainda, a partir da glucose, quantidades consideráveis de ácido láctico e succínico. Para a produção do ácido mais abundante, o ácido propiónico, *Pectinatus* utilizam a via do succinato (Fig 2.17). ^{47 48}

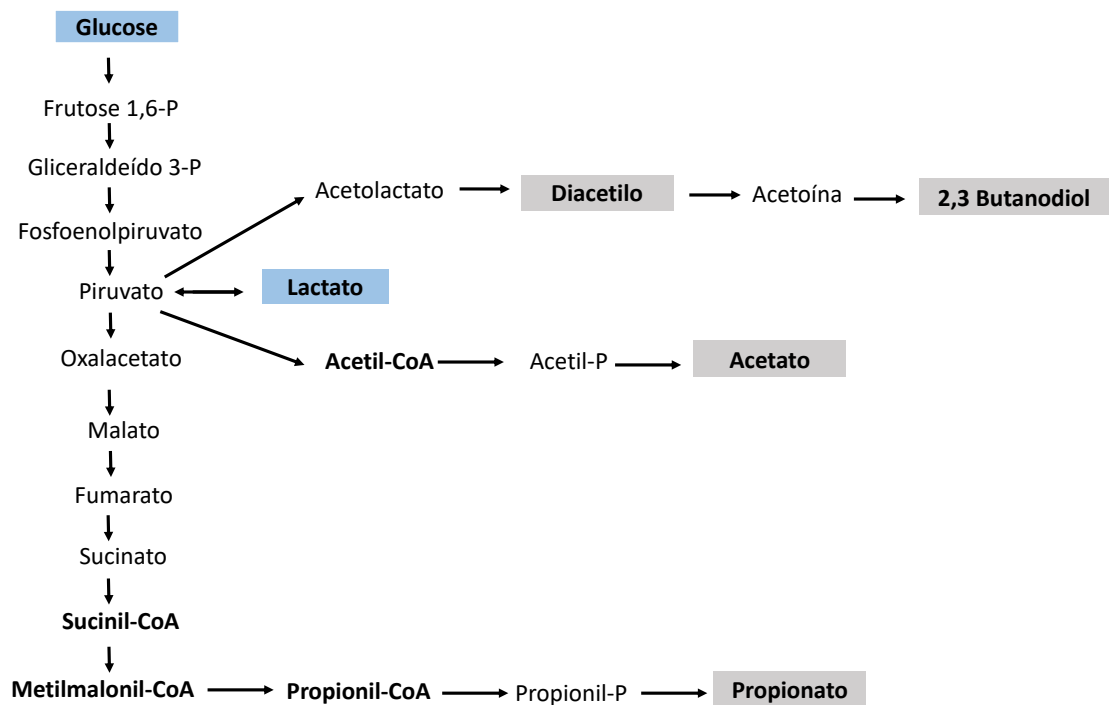


Figura 2.17 Metabolismo de *Pectinatus* (Adaptado de ⁴⁹).

Megasphaera são bactérias **anaeróbias estritas** sendo a deterioração por elas causada, restrita a um ambiente de baixo O₂. A sua multiplicação ocorre entre 15 e 37 °C (ótimo em 28 °C) e em valores de pH acima de 4,1, sendo inibidas em cervejas com uma concentração de etanol acima de 2,8 % p/p (aproximadamente 3,5 % v/v). ⁵⁰ Estas bactérias utilizam o lactato, produzido pelas bactérias do ácido láctico para produzir os seus metabolitos. A contaminação da cerveja, causada por esses microrganismos, resulta na produção de consideráveis quantidades de ácido butírico e propiónico, juntamente com baixas concentrações de ácidos acético, valérico, caproico e caprílico e acetaldeído (Fig. 2.18). ⁵¹

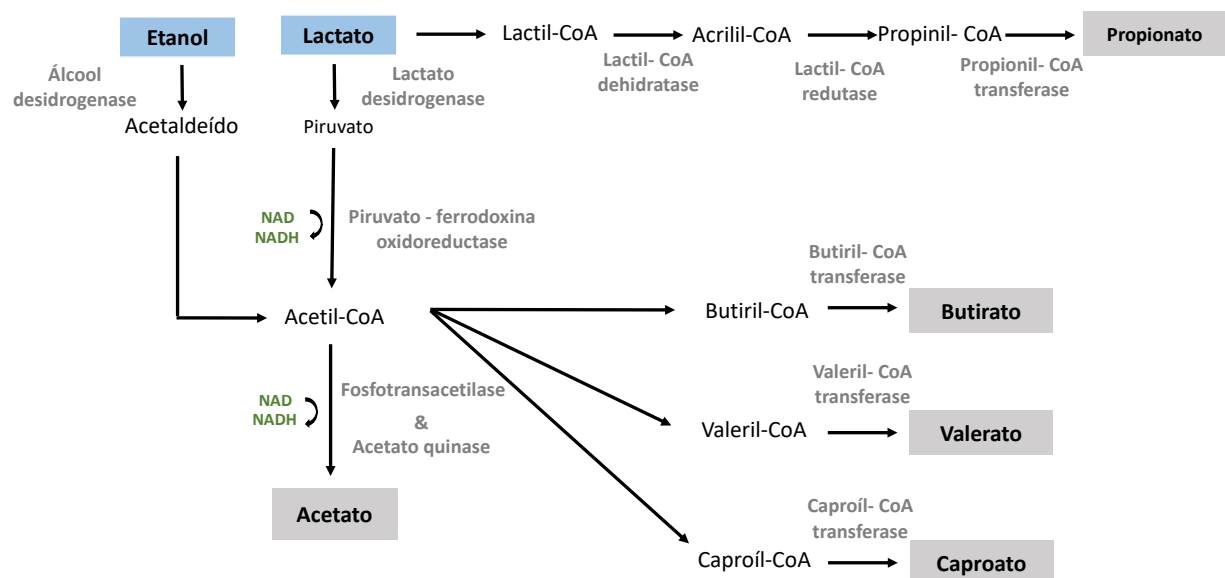


Figura 2.18 Metabolismo de *Megasphaera* (Adaptado de ⁵²).

2.2.3.4 Leveduras selvagens

As leveduras selvagens também podem contaminar a cerveja em sistemas de extração. Qualquer levedura diferente da levedura cervejeira utilizada como inóculo é considerada uma levedura selvagem.⁵³ As leveduras selvagens são divididas em *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo as *Saccharomyces*, consideradas as mais perigosas, uma vez que são mais semelhantes às linhagens de levedura de produção e têm a capacidade de colonizar a mesma gama de habitats, dificultando a sua diferenciação.⁵⁴ Geralmente, as leveduras selvagens são difíceis de detectar e, ao contrário das bactérias, não são suscetíveis à lavagem com ácido, sendo impossível erradicá-las do inóculo de leveduras utilizando um tratamento ácido. A única forma prática de assegurar um inóculo de leveduras livre das leveduras selvagens é assegurar condições de higiene ao longo do processo de produção da cerveja.⁵⁰ Embora a maioria das *Saccharomyces* selvagens detectadas sejam *S. cerevisiae*, outras espécies de *Saccharomyces* também têm sido relatadas, dentre as quais se destacam: *S. diastaticus*, *S. pastorianus*, *S. ellipsoideus* e *S. willianus*. A contaminação com esse tipo de levedura pode causar odores fenólicos à cerveja devido à capacidade destes microrganismos

de descarboxilar ácidos fenólicos, tais como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico. Outro efeito da contaminação de cervejas com estas leveduras é a super-atenuação do produto final. A atenuação do mosto diz respeito à conversão dos açúcares fermentescíveis em álcool pela levedura cervejeira. As leveduras contaminantes podem-se desenvolver juntamente com a levedura cervejeira e super-atenuar o mosto, aumentando o teor alcoólico. A produção e secreção de glucoamilases, permitem que as leveduras selvagens utilizem as dextrinas, que normalmente não são fermentadas pelas leveduras de cultivo.²⁵ As leveduras selvagens não-*Saccharomyces* incluem diversos géneros tais como *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Endomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Khuyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces* e podem causar diferentes tipos de deterioração na cerveja. As *Brettanomyces*, *Candida* e *Pichia*, podem apresentar sérios problemas no envelhecimento da cerveja através da produção de turvação, super-atenuação e sabores e aromas indesejáveis como acetato de etilo e butirato de isoamilo. *Brettanomyces*, em particular, é notório pela produção dos fenóis voláteis 4-etil-guaiacol e 4-etil-fenol, percecionados como aromas de fumo, medicamentos ou curral, com limites de perceção sensorial muito baixos. Muitas leveduras não-*Saccharomyces* não são tolerantes ao etanol, poucas são capazes de fermentar açúcares e muitas não podem crescer em condições anaeróbicas. No entanto, a cerveja em sistemas de extração pode proporcionar um ambiente semi-aeróbico no qual muitas leveduras não-*Saccharomyces* podem crescer e contaminar o sistema. Essas leveduras, além de competir com a levedura fermentativa durante a fermentação, conseguem-se multiplicar muito bem na cerveja filtrada, proporcionando um desagradável sabor de ácido acético. Nesse sentido, essas leveduras são contaminantes oportunistas que ocorrem onde a falta higiene e as más práticas se combinam para fornecer as condições ideais para o crescimento. A limpeza escrupulosa do sistema de extração e a prevenção de entrada de ar, minimizam os riscos.¹⁴

2.2.3.4 Off-flavours

Os *off-flavours* presentes na cerveja, resultantes da contaminação de microrganismos presentes na cerveja, estão descritos na tabela 2.2. A maioria dos compostos formados são produtos resultantes do metabolismo das bactérias e conferem à cerveja características muito particulares, tendo limites de percepção diferentes.

Tabela 2.2 *Off-flavours* da cerveja produzidos por microrganismos contaminantes.

Composto	Característica sensorial (<i>off-flavour</i>)	Microrganismo produtor	Limite de percepção sensorial (mg/L)
Ácido acético	Vinagre	<i>Gluconobacter</i> <i>Acetobacter</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Pectinatus</i> <i>Megasphaera</i> Leveduras selvagens	130
Acetaldeído	Maçã verde Solvente Vinho branco	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	5 – 15
Ácido butírico	Vômito de criança	<i>Megasphaera</i>	2 – 3
Diacetilo	Manteiga	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pectinatus</i> <i>Pediococcus</i>	0,04
Ácido sulfídrico	Ovo podre Fósforo queimado Enxofre	<i>Pectinatus</i>	0,004
Ácido láctico	Ácido Iogurte	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	400
DMS	Vegetais cozidos Milho cozido	<i>Enterobacteriaceae</i>	0,025
Ácido caprílico	Sabão Cera	<i>Megasphaera</i>	4 – 6
Ácido Valérico	Queijo	<i>Megasphaera</i>	1

2.2.3 Higienização

A limpeza do sistema de extração da cerveja deve ser rigorosa e a otimização do procedimento de limpeza é muito importante para prevenir o crescimento de microrganismos e evitar que os biofilmes se formem, preservando a qualidade do produto. Uma vez conectado ao sistema de extração, o barril é aberto e fatores prejudiciais, como a entrada de O₂, podem começar a afetar a cerveja. Para além disso, a torneira também promove a entrada de O₂ para o sistema e isso afetará a qualidade, o sabor e a estabilidade da cerveja. Para ajudar a manter um nível sanitário perfeito, procedimentos especiais de limpeza e desinfecção devem ser realizados. As linhas de cerveja devem ser limpas pelo menos de 6 em 6 semanas, tempo esse estipulado a partir de ensaios microbiológicos anteriormente realizados.^{17 55}

Os quatro parâmetros de limpeza: produto químico utilizado, a temperatura (de preferência quente, entre os 40-45 °C), a ação mecânica (utilização de escovilhões, esfregão e pano em locais específicos, de maior contaminação) e o tempo de contacto com o produto de limpeza (entre 15 a 30 minutos) estão intimamente relacionados e determinam a eficiência do procedimento de higienização.^{17 55}

Existem dois tipos de higienização, a alcalina e a ácida e utilizam diferentes reagentes/produtos. Na **higienização alcalina** é utilizado Pipeline Professional - Solução de limpeza ou TM Desana Max FP em saquetas, constituídos por uma mistura de hidróxido de potássio, hipoclorito de sódio e carbonato de sódio em concentrações similares. Esta deverá ser executada de acordo com o plano definido, as 6 semanas (higienização preventiva) ou sempre que solicitado (higienização corretiva). Neste procedimento, utilizam-se 12,5 cL de Pipeline Professional diluídos com, aproximadamente, 5 L de água ou 1 saqueta de TM Desana Max FP diluídos com, aproximadamente, 4,5 L de água. Na **higienização ácida** é utilizado ácido fosfórico alimentar a 80%. Neste caso, são utilizados 10 cL de ácido fosfórico, diluídos em 5 L de água. Esta higienização só se efetua anualmente, de preferência na primeira higienização preventiva de cada instalação. Deve ser feita primeiro a higienização alcalina e só depois a higienização ácida.⁵⁵

Primeiro, a linha é lavada com água limpa para eliminar qualquer cerveja do sistema. Em seguida, a linha é preenchida com o produto e deixa-se atuar durante pelo menos 15 minutos e não mais que 30 minutos porque a extensão do tempo de imersão para além do período recomendado pode danificar o equipamento de distribuição. Durante esse período, os

refrigeradores de cerveja devem ser desligados para evitar congelamento. A solução (Pipeline Professional ou TM Desana Max FP) contém um indicador de cor integrado. Tem uma cor púrpura com aspecto límpido, mas ao passar pela instalação começa a mudar de cor até voltar à cor inicial. A mudança de cor depende do estado de contaminação da tubagem. A cor bege ou acastanhada indica uma elevada contaminação microbiológica, verde representa levemente contaminada e roxo significa que a instalação está microbiologicamente impecável. A limpeza com o líquido garante que a tubagem fique higienizada, no entanto o *click* e a torneira, devem ser removidos e limpos separadamente antes de se fazer passar a cerveja pelo sistema. O detergente, utilizado na lavagem de ambas as peças, é composto por uma mistura de lauril éter sulfato de sódio (SLES), um surfatante que atua como desengordurante e óxido de laurildimetilamina, também conhecido como óxido de dodecildimetilamina, um surfatante não iónico à base de óxido de amina, com uma cauda de alquil em C₁₂. O *click* deve ser desmontado e limpo com o detergente utilizando um escovilhão para limpar o seu interior e o esfregão para o restante material. Para além disso, é necessário também lavar cada peça da torneira, utilizando o mesmo detergente e com o auxílio de um escovilhão para garantir a limpeza eficiente no interior da torneira e o esfregão para os restantes componentes. Após a lavagem e montagem, é aplicado, na superfície da torneira e do *click*, um desinfetante à base de álcool, constituído por uma mistura de etanol (75% p/p) e propan-2-ol (3-10% p/p).^{17 55}

Finalmente, após os 15-30 minutos, as linhas devem ser lavadas com água até que não seja possível detetar mais vestígios da solução de limpeza. Utilizam-se tiras indicadoras de pH, mergulha-se a tira na água do enxaguamento e faz-se a observação visual, comparando-a com a escala padrão. Se o pH da água estiver em conformidade (entre 5,5 a 8,5), engata-se o barril e faz-se passar cerveja pelo circuito e a linha estará pronta para ser novamente utilizada.^{17 55}

Para além deste procedimento de higienização, realizado por um técnico a cada 6 semanas, o objetivo de higiene só pode ser alcançado se, no ponto de venda, houver o cuidado de garantir a limpeza regular da parte externa da torneira e do *click* a cada troca de barril para evitar uma possível contaminação cruzada. Para além disso, durante o período de paragem de funcionamento, a conduta de cerveja deve ficar em carga com água para não haver acumulação de resíduos de cerveja ao longo da tubagem, levando à formação de

biofilmes. A limpeza e a lavagem do refrigerador também deve ser efetuada regularmente e o nível de água do refrigerador deve estar sempre a cobrir as serpentinas.⁵⁵

2.3 Objetivo

O principal objetivo da presente dissertação é o aumento do tempo entre higienizações, sem comprometer a qualidade da cerveja e a otimização do procedimento de higienização através da diminuição do tempo de permanência do técnico no ponto de venda. Isto trará enormes benefícios pois permitirá, uma melhor gestão das equipas de higienização, uma redução de efluentes e um menor número de higienizações por ano.

Para isso, inicialmente, far-se-á a identificação dos componentes do sistema de extração considerados como pontos críticos de contaminação, de seguida será feita uma avaliação comparativa entre os diferentes componentes e finalmente, identificar-se-ão os componentes com as melhores características com vista a escolher o modelo de sistema de extração que permita alcançar o objetivo do estágio com maior sucesso.

Como estratégia seguida, ao longo das 13 semanas, será avaliada, nos 14 sistemas de extração com as diferentes variáveis em estudo, a qualidade da cerveja através da monitorização do crescimento de microrganismos nocivos e não nocivos e identificação de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens, recorrendo a análise microbiológica e a avaliação organolética da cerveja, através de análise sensorial.

3. Metodologias

No presente trabalho foram instaladas três máquinas de extração de barril de tara retornável: a primeira com cinco saídas, a segunda com quatro e a terceira com cinco, perfazendo um total de 14 saídas (Fig 3.1).



Figura 3.1 Esquema das três instalações

Em cada uma dessas máquinas foram instaladas um conjunto de serpentinas (Fig 3.2) que são componentes metálicos, mergulhados num banho de água gelada no interior do refrigerador, e que permitem a refrigeração da cerveja, quando esta percorre o circuito interno das mesmas.¹⁸ Possuem tamanhos diferentes permitindo que se encaixem umas nas outras, sendo que as de maior dimensão ficam na extremidade e as de menor no interior. Cada serpentina está ligada a um único barril de cerveja e por isso, cada uma delas constitui um circuito independente. Assim, neste caso em concreto, como tínhamos 14 sistemas de extração montados, foram instaladas um total de 14 serpentinas.



Figura 3.2 Conjunto de serpentinas

Após a conclusão da instalação, foi realizada uma higienização alcalina, utilizando como produto de limpeza, TM Desana Max FP, seguindo o procedimento habitual. Para isso, diluiu-se 1 saqueta do produto com, aproximadamente, 4,5 L de água para cada duas torneiras. De seguida, a linha foi preenchida com o produto e deixou-se atuar durante 15 minutos. Durante esse período, os *clicks* e as torneiras, foram removidos, desmontados e limpos separadamente, recorrendo a um esfregão e um escovilhão, à exceção de um dos *click* e de duas das 14 torneiras em que a desmontagem não foi realizada propositadamente. No final desse procedimento, foi aplicado na superfície de todas as torneiras e *clicks*, sem exceção, *Suma alcohol* em spray, um desinfetante à base de álcool, constituído por uma mistura de etanol (75% p/p) e propan-2-ol (3-10% p/p).^{17 55}

Após o período de atuação do produto, as linhas foram lavadas com água até remover todos os vestígios da solução de limpeza e utilizaram-se tiras indicadoras de pH, mergulhando-se a tira na água do enxaguamento e comparou-se com a escala padrão (o pH da água deve estar entre compreendido entre 5,5 e 8,5).^{17 55}

No final da higienização foram engatados barris de 50 L de cerveja Super Bock original.

3.1 Recolha de amostras

Antes e após a higienização realizada às instalações, foram recolhidas amostras de água e feita análise microbiológica. Os resultados obtidos desta análise às águas serviram para comprovar a eficiência da higienização e assegurar a ausência de contaminação microbiológica na instalação.

Relativamente às amostras de cerveja, estas foram recolhidas semanalmente, uma vez por semana, ao longo de 13 semanas. Ao fim das 10 semanas, as instalações foram novamente higienizadas, à semelhança do que tinha acontecido no início do ensaio e após isso, foram engatados novos barris de cerveja e procedeu-se à recolha de amostras durante mais 3 semanas.

Foram recolhidas amostras de cerveja para a realização de dois tipos de análise: sensorial e microbiológica. Para a **análise sensorial**, recolheram-se para recipientes de vidro, 600 mL de cerveja de cada uma das 14 torneiras, tendo-se efetuado previamente uma purga de forma a garantir a saída de toda a cerveja da tubagem e da serpentina. Para a **análise microbiológica**, o controlo na amostragem exigiu um maior rigor. As condições de recolha

de amostras foram de extrema importância visto que se a colheita fosse inapropriada a amostra não seria representativa e os resultados não seriam significativos.⁵⁶ Neste sentido, antes de proceder à recolha, as condições do local de extração foram verificadas, assegurando que este não seria uma fonte de contaminação e foi efetuada a purga da cerveja contida nas tubagens e na serpentina, à semelhança do que tinha sido feito para a análise sensorial.

O ponto de amostragem, neste caso as 14 torneiras, foram desinfetadas com álcool a 70% e de seguida, flamejadas com o auxílio de um maçarico portátil. O processo de recolha de amostras foi realizado junto à chama para garantir assepsia do ar ambiente e as amostras foram recolhidas em recipientes de vidro previamente esterilizados no autoclave, garantindo as condições assépticas.

3.2 Análise microbiológica

Após a recolha, as amostras foram levadas para o laboratório e analisadas no próprio dia, de modo a evitar alterações na população microbiana presente inicialmente na matriz.

A metodologia desta análise envolveu várias etapas e consistiu em diversas técnicas: filtração por membrana, incubação de placas e quantificação de colónias de microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja, bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens.

3.2.1 Filtração por membrana

Esta técnica permite a deteção e quantificação de microrganismos viáveis numa amostra líquida que contenha menos de 1 UFC/mL. Foi utilizado este método porque era o mais apropriado para testar amostras de água e este tipo de amostras de cerveja (cerveja filtrada/produto acabado) que possuem reduzidas concentrações de células e assim permite testar maiores volumes de amostra que de outra forma resultariam na formação de poucas ou nenhuma colónias.⁵⁷

Por cada amostra de cerveja e/ou água recolhida, filtrou-se 100 mL, numa câmara de fluxo laminar, através de uma membrana estéril de ésteres mistos de celulose com porosidade de 0,45 µm. A amostra é colocada num copo descartável de 100 mL e a filtração é auxiliada por uma bomba de vácuo elétrica (Fig. 3.3). Após a filtração, a membrana foi transferida para uma placa de Petri, com a ajuda de uma pinça estéril, e colocada sobre o meio de cultura respetivo.

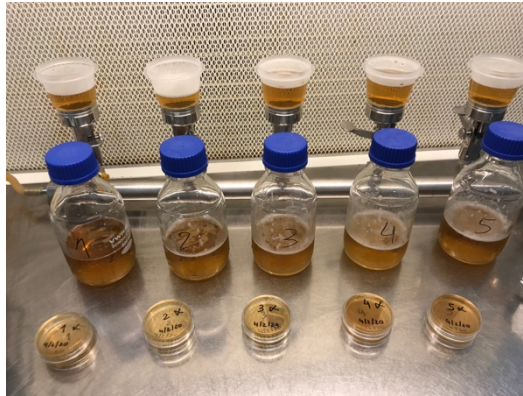


Figura 3.3 Filtração por membrana das amostras de cerveja.

3.2.1.1 Meios de cultura

Devido à grande diversidade de microrganismos presentes na cerveja, as amostras foram incorporadas em três meios diferentes, de forma a garantir a detecção dos microrganismos deteriorantes. O meio UBA (*Universal Beer Agar*) (Fig. 3.4C) que permitiu a detecção de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Zymomonas* e leveduras selvagens, o de Taylor com cobre (Fig. 3.4A) que permitiu detectar leveduras selvagens e o meio UBA com solução inibidora ABP (“Actidione, Bromocresol Green, Phenyl-Ethanol”), contendo o inibidor 2-feniletanol para a levedura (Actidione) e para as bactérias do mosto (Fig. 3.4B), permitindo assim a detecção das bactérias ácido-láticas.⁵⁸

Relativamente às amostras de águas, foi utilizado na sua análise apenas o meio UBA.

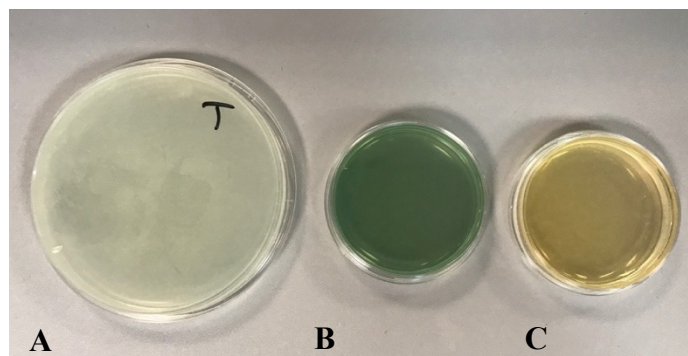


Figura 3.4 Meio de cultura (A) Taylor com cobre (B) UBA com ABP (C) UBA

3.2.2 Incubação de placas

A incubação de placas é um passo de extrema importância para a posterior análise de placas microbiológicas e varia consoante o meio de cultura utilizado e a(s) espécie(s) que estejamos a analisar. A incubação foi realizada em estufas termostaticamente controladas (a 27 °C) cuja atmosfera interior é constituída por ar. Deste modo, foram criadas condições ótimas para o desenvolvimento seletivo de microrganismos presentes nas amostras.

Nas amostras em que se utilizou o meio UBA, foram realizados dois tipos de incubação, um em aerobiose e outro em anaerobiose. A incubação realizada em condições anaeróbicas permitiu a deteção de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Zymomonas*, microrganismos esses que são nocivos para a cerveja (não para o consumidor). Para isso, as placas foram colocadas numa caixa de anaerobiose (Fig. 3.5B) e de seguida, na estufa de incubação durante 7 dias. Para a deteção de *Acetobacter* e leveduras selvagens, microrganismos não nocivos para a cerveja, as placas foram incubadas em aerobiose, sendo colocadas diretamente na estufa de incubação, durante 3 dias (Fig. 3.5A). Nas amostras em que foi utilizado meio de Taylor com cobre a incubação foi realizada em aerobiose, permanecendo no interior da estufa de incubação durante 5 dias e em meio UBA com ABP a incubação foi efetuada sob condições anaeróbicas, permanecendo numa caixa de anaerobiose no interior da estufa de incubação durante 7 dias.

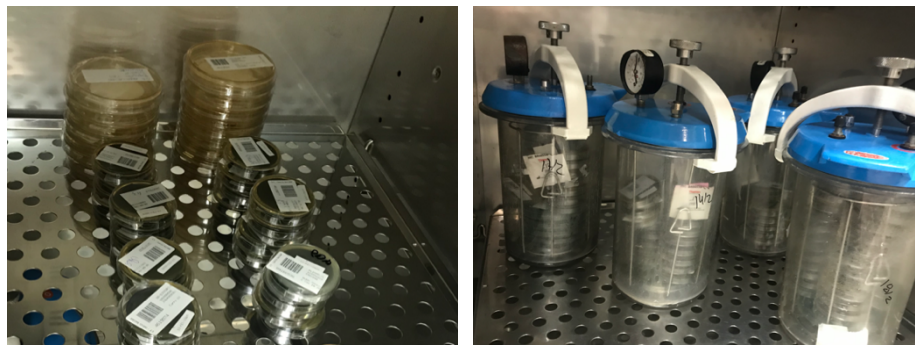


Figura 3.5 Incubação de placas na estufa em (A) aerobiose (B) anaerobiose

3.2.3 Análise de colónias de microrganismos

No final da incubação, procedeu-se à contagem de colónias formadas em cada placa, cujos resultados foram expressos em UFC/100 mL. Se o valor obtido de microrganismos não nocivos for < 1 , é considerado satisfatório, se estiver compreendido entre 1 e 100 é aceitável e não aceitável se for > 100 . Para os microrganismos nocivos não há valor aceitável, ou é satisfatório para valores < 1 ou não aceitável para ≥ 1 .

3.2.4 Análise por bioluminescência

Através da bioluminescência foi possível uma avaliação rápida do estado de contaminação de um dos conjuntos de serpentinas instalados numa das 3 máquinas de extração. Esta técnica consistiu no esfregação, recorrendo a uma zaragatoa, nas superfícies internas das serpentinas a analisar. Posteriormente, a zaragatoa foi colocada de novo no tubo de origem, fazendo pressão, de modo a libertar a solução que reagiu com a adenosina trifosfato (ATP). Deste modo, foi possível a leitura da luz emitida pela zaragatoa, através de um luminómetro onde o tubo (já com a zaragatoa), foi inserido, fornecendo os resultados em RLU (unidades de luz relativa) no mostrador do aparelho (Fig. 3.6). Este resultado foi confrontado com os valores de especificação estabelecidos para este tipo de amostra (até 100 RLU).⁵⁹



Figura 3.6 Luminómetro usado em análise por bioluminescência

3.3 Análise sensorial

Após a recolha, as amostras foram levadas para a sala de prova e analisadas no próprio dia, de modo a evitar alterações organoléticas na cerveja.

Para esta análise foram recrutados provadores treinados do painel sensorial interno da empresa, que realizaram uma apreciação às amostras baseando-se numa tabela, que apresentava os diversos aromas que poderiam ser sentidos (Anexo 1 e 2).

Para cada avaliador foi servido cerca de 30-50 mL de cada uma das 14 amostras de cerveja recolhidas, em copos de plástico transparente e água mineral para tomar entre as amostras evitando, assim, interferência na análise. Os copos foram colocados na cabine de prova e o resultado da apreciação foi registado, no boletim de prova, por cada provador sem que estes soubessem que amostras se encontravam em prova, apenas o tipo de cerveja, neste caso, Super Bock original (Fig. 3.7).



Figura 3.7 Cabine de prova para análise sensorial

O tipo de análise realizada à cerveja baseou-se no controlo organolético que consistiu na avaliação do aroma e gosto (*flavour*) do produto, visando estabelecer se o produto apresentava qualidade satisfatória. A escala utilizada para expressar as diferentes impressões sentidas foi a seguinte:

- +1 = Produto de ótica qualidade
- 0 = Normal para este tipo de produto
- 1 = Com defeitos aceitáveis para este tipo de produto
- 2 = Com defeitos não aceitáveis para este tipo de produto
- 3 = Com defeitos tão graves que requerem ação imediata.

No boletim a preencher pelos provadores (Anexo 3) foram descritas as impressões de aroma e gosto detetadas, especialmente quando atribuída uma pontuação igual ou inferior a -1, de forma a poder-se verificar alguma tendência no aumento ou diminuição nos aromas/sabores detetados. Após a prova, foi realizado o registo dos resultados informaticamente e feita, para cada amostra, a média dos resultados obtidos pelos diferentes provadores. Caso o valor obtido se encontre no intervalo de +1,0 e -0,9 considera-se o produto satisfatório. Para resultados compreendidos entre -1,0 e -1,4, considera-se o produto não suficientemente satisfatório. Por fim, se a avaliação se encontrar no intervalo de -1,5 a -3,0 o produto é considerado não satisfatório. ⁶⁰

4. Resultados e discussão

Com o objetivo de implementar um sistema de extração modelo que apresentasse as características ideais e os melhores componentes de forma a assegurar a extensão da qualidade da cerveja nos pontos de venda e, posteriormente, permitir um aumento do ciclo de higienização, foram realizados 5 testes diferentes, considerando vários componentes identificados como pontos críticos de contaminação: teste das torneiras, da (não) desmontagem de torneiras, da (não) desmontagem de *clicks*, dos tubos de arrefecimento e do tubo de FEP.

4.1 Análise microbiológica às águas de enxaguamento

Antes de engatar os barris e proceder à recolha das amostras da cerveja, dando assim início aos diferentes testes, foram recolhidas amostras de água, antes e após a higienização e feita análise microbiológica de forma a garantir a eficiência da higienização e consequente, ausência de contaminação na instalação.

Os resultados dessa análise, representados na tabela 4.1, permitiram comprovar que a higienização foi eficiente, na medida em que permitiu eliminar todos os microrganismos nocivos à cerveja e eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis os microrganismos não nocivos. Para além disso, os valores obtidos das amostras recolhidas antes da higienização, permitiram verificar que algumas instalações já apresentavam contaminação e por isso, nem todos os componentes utilizados neste ensaio seriam novos, podendo ter sido já anteriormente utilizados.

As amostras de água recolhidas antes da higienização da “torneira CMB”, “torneira Antoine com regulador de caudal”, “não desmonta *click*” e “tubo de FEP” apresentaram $n = 12$, $n \geq 300$, $n = 17$ e $n = 50$ microrganismos nocivos, respetivamente, após o procedimento de limpeza, esses microrganismos foram eliminados na sua totalidade.

Relativamente aos microrganismos não nocivos presentes em níveis não aceitáveis ($n \geq 300$) nas amostras recolhidas da “torneira CMB”, “torneira Antoine com regulador de caudal” e “tubo de FEP”, houve uma redução significativa ($n = 4$ para “torneira CMB” e $n = 3$ para “tubo de FEP”) ou até mesmo a eliminação total ($n = 0$ para “torneira Antoine com regulador de caudal”).

Tabela 4.1 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas águas de enxaguamento antes e após a primeira higienização.

Teste	Amostra	Antes Higienização (UFC/100mL)		Após Higienização (UFC/100mL)	
		N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.
Torneiras	CMB	≥ 300	12	4	0
	Teste	0	0	0	0
	Antoine c/regulador	≥ 300	≥ 300	0	0
	Mafridis	0	0	0	0
	Antoine s/regulador	3	0	2	0
(Não) desmontagem <i>clicks</i>	Desmonta	0	0	0	0
	Não desmonta	20	17	2	0
Tubos de arrefecimento	Tubo de inundação	0	0	0	0
	Tubo de contacto	0	0	0	0
(Não) desmontagem torneiras	Desmonta Mafridis	0	0	0	0
	Desmonta CMB	0	0	0	0
	Não desmonta Mafridis	0	0	0	0
	Não desmonta CMB	0	0	0	0
Tubo de FEP	Tubo de FEP	≥ 300	50	3	0

4.2 Análise microbiológica e sensorial à cerveja

Estes dois tipos de análise, a microbiológica e a sensorial, realizadas em amostras de cerveja retiradas uma vez por semana ao longo de 13 semanas (inicialmente 10 e depois mais 3), tiveram como objetivo o acompanhamento da evolução da contaminação e a identificação das alterações organoléticas na cerveja registadas ao longo desse período.

4.2.1 Teste das torneiras

A realização deste teste teve como objetivo a comparação de diferentes tipos de torneiras e a construção de uma matriz torneira vs tempo de higienização para cada uma delas. Para isso, foram instaladas, na mesma máquina de extração, 5 tipos de torneiras: CMB, Teste, Antoine com e sem regulador de caudal e Mafridis, que apresentavam características e

componentes internos diferentes. Relativamente à tubagem, que permite o transporte da cerveja do barril à serpentina e de seguida até à torneira, foram utilizados, em todas as instalações, tubos de PVC e por isso, o arrefecimento da cerveja foi assegurado único e exclusivamente pelas serpentinas, instaladas no interior do refrigerador.

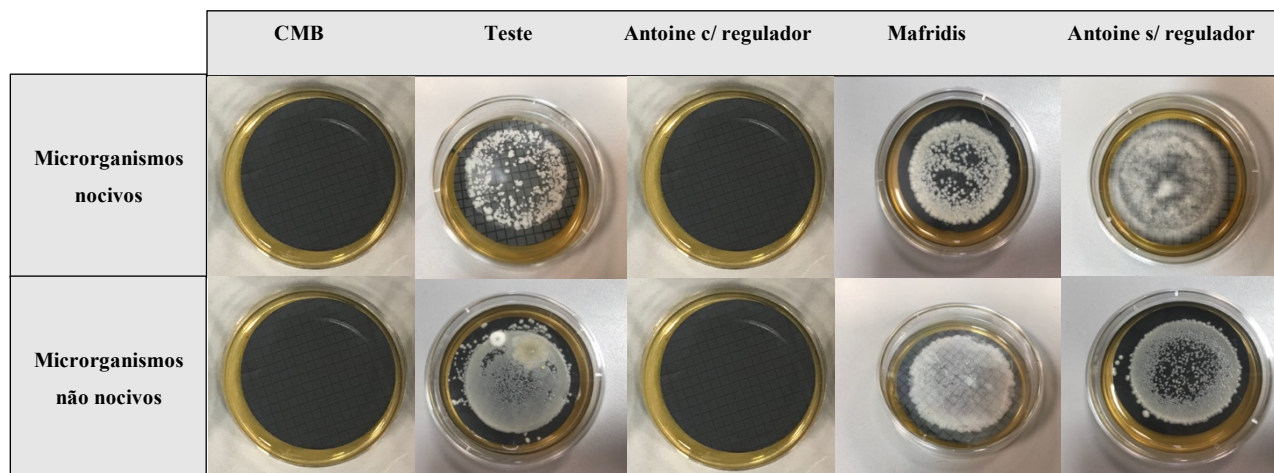
Análise microbiológica

A contagem de colónias de microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras incubadas em meio UBA, ao longo das primeiras 10 semanas de ensaio, representados na tabela 4.2, revelaram que duas das cinco torneiras testadas, mais concretamente a CMB e a Antoine com regulador de caudal, se destacaram pela positiva na medida em que, durante esse período, não apresentaram qualquer contaminação microbiológica quer por microrganismos nocivos, quer por não nocivos. Contrariamente a essas, as outras três: Teste, Mafridis e Antoine sem regulador de caudal revelaram contaminação microbiológica desde o momento em que se iniciou o ensaio. A torneira Teste e a Mafridis apresentaram $n \geq 300$ microrganismos nocivos e não nocivos e a Antoine sem regulador de caudal apresentou inicialmente $n = 100$ microrganismos não nocivos, estando no limite da escala do aceitável, mas revelou $n = 20$ nocivos, valor esse não aceitável para este tipo de microrganismos. Apesar desta última torneira apresentar valores de microrganismos não nocivos mais aceitáveis relativamente às outras duas, não assegura igualmente a qualidade da cerveja, devido ao valor elevado de microrganismos nocivos que apresenta logo no momento inicial ($n = 20$) e por isso, apenas as torneiras CMB e Antoine com regulador de caudal garantem a qualidade da cerveja durante, pelo menos, 10 semanas, conforme pode ser verificado pelas fotografias tiradas às colónias nas placas na 10^a semana de ensaio (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, nas primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Microrganismos não nocivos (UFC/100mL)										
Torneira	CMB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Teste	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine c/regulador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mafridis	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine s/regulador	100	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
		Microrganismos nocivos (UFC/100mL)										
Torneira	CMB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Teste	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine c/regulador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mafridis	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine s/regulador	20	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Tabela 4.3 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, à 10ª semana.



A contagem de colónias de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens das amostras incubadas em meio ABP com UBA e Taylor com cobre, respetivamente, referentes à 10ª semana de ensaio, estão representadas na tabela 4.4. Os resultados obtidos permitiram concluir que as 3 torneiras: Teste, Mafridis e Antoine sem regulador de caudal, que apresentaram contaminação microbiológica por microrganismos nocivos e não nocivos, em meio UBA, ao serem incubadas nestes outros dois meios, revelaram a presença, de bactérias ácido-láticas (microrganismos nocivos à cerveja) e leveduras selvagens (microrganismos não nocivos à cerveja) em valores elevados ($n \geq 300$). As restantes, CMB e Antoine sem regulador de caudal não apresentaram nenhum microrganismo, em nenhum destes meios, verificando assim o resultado obtido da incubação em meio UBA.

Tabela 4.4 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, à 10ª semana.

Torneira	Bactérias ácido-láticas (UFC/100mL)	Leveduras selvagens (UFC/100mL)
CMB	0	0
Teste	≥ 300	≥ 300
Antoine c/regulador	0	0
Mafridis	≥ 300	≥ 300
Antoine s/regulador	≥ 300	≥ 300

Análise sensorial

Os resultados obtidos da análise sensorial realizada às amostras retiradas das 5 torneiras ao longo das primeiras 10 semanas de ensaio, descritos na tabela 4.5, mostraram que a avaliação global média foi satisfatória em todas elas, tendo os valores médios ficado situados entre -0,5 e 0, não havendo por isso, em nenhuma delas, alterações significativas das características organolépticas da cerveja. Apesar de 3 das 5 torneiras, nomeadamente a Teste, a Antoine sem regulador e a Mafridis, apresentarem elevada carga microbiológica, tendo sido comprovada através da análise microbiológica realizada, a presença de bactérias ácido-

láticas que causam turbidez, acidez e odores desagradáveis devido à formação de vários produtos metabólicos como diacetilo e o ácido láctico ¹⁴ e ainda de leveduras selvagens, que causam odores fenólicos à cerveja devido à capacidade de descarboxilar ácidos fenólicos, tais como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, ²⁵ não houve formação considerável de *off-flavours*, em concentrações superiores aos limiares de percepção, por parte desses microrganismos presentes na cerveja que causassem alteração de aroma ou sabor e que iriam seguramente levar o provador a avaliar de forma mais negativa o produto em prova.

Tabela 4.5 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste das torneiras, das primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Avaliação global média										
Torneira	CMB	0	0	0	0	0	0	-0,2	0	-0,1	0	-0,2
	Teste	0	0	0	0	0	0	-0,3	0	-0,4	0	-0,3
	Antoine c/regulador	0	0	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0
	Mafridis	0	0	0	0	-0,2	0	-0,1	0	-0,2	0	0
	Antoine s/regulador	0	0	0	0	0	0	0	-0,4	0	-0,4	0

De todas as cinco torneiras testadas, a Mafridis é a torneira mais frequente nos pontos de venda e a que seria expectável apresentar um maior grau de contaminação e consequentemente, mais alterações nas características sensoriais da cerveja, num menor período de tempo. Isto porque possui um maior número de componentes internos, característica essa que permite uma maior acumulação de resíduos de cerveja nesses pontos específicos principalmente no principal componente que a caracteriza e pelo qual é regulada internamente, o pistão (Fig. 4.1). Para além disso, essa torneira contém um pequeno orifício externo, ligado ao pistão e aquando a abertura da torneira, esse orifício abre e permite que níveis de O₂ entrem no interior do sistema e prevaleçam nestes locais, fornecendo condições

aeróbicas que favoreçam reações de oxidação, acelerem o processo de envelhecimento da cerveja no interior do barril e permitam o crescimento de bactérias e leveduras selvagens.²⁷

As torneiras de corte, das quais fazem parte a CMB e as Antoine com e sem regulador de caudal, por possuírem um menor número de componentes internos e por serem reguladas internamente por uma esfera em vez de um pistão, não tendo esse orifício externo, garantem uma menor entrada de O₂ no sistema e uma menor adesão de microrganismos no seu interior e por isso, apresentaram melhores resultados microbiológicos comparativamente à Mafridis. Ainda assim, dentro das 3 torneiras de corte enumeradas, apenas a CMB e a Antoine com regulador de caudal asseguraram a qualidade microbiológica da cerveja ao longo das 10 semanas e por isso, seriam as torneiras ideais para substituir as Mafridis que estão instaladas nos diversos pontos de venda. Relativamente à torneira Teste é, como o próprio nome indica, uma torneira que se encontra em fase de testes e que apresenta características mistas entre a torneira de pistão e a torneira de corte, no entanto não mostrou ser eficaz, visto que obteve maus resultados microbiológicos e por isso, não constituirá uma boa alternativa às Mafridis.



Figura 4.1 Pistão de uma torneira Mafridis com contaminação.

4.2.2 Teste da (não) desmontagem de torneiras

O propósito da realização deste teste foi avaliar se a desmontagem das torneiras e a limpeza de todos os seus componentes individualmente, constituía um passo crucial e obrigatório ou se a última etapa de higienização, a aplicação do desinfetante à base de álcool constituído por uma mistura de etanol (75% p/p) e propan-2-ol (3-10% p/p) na superfície das torneiras, era suficiente, permitindo assim uma redução do tempo do procedimento de

higienização. Para isso, foram testadas 4 torneiras, duas de cada tipo: Mafridis e CMB. Duas delas foram desmontadas, todos os seus componentes foram limpos e montadas novamente e aplicado o álcool na superfície das mesmas, seguindo o procedimento atualmente implementado. As outras duas não foram desmontadas, tendo sido apenas pulverizadas com álcool em spray. Quanto à tubagem utilizada, foram instalados tubos de PVC em todas as instalações e por isso o arrefecimento da cerveja foi único e exclusivamente assegurado através da passagem da cerveja pelo circuito interno das serpentinas, que são parte integrante do sistema de refrigeração de qualquer máquina de extração.

Análise microbiológica

Os resultados obtidos da contagem de colónias presentes nas amostras incubadas em meio UBA, correspondentes às primeiras 10 semanas de ensaio, representados na tabela 4.6, mostraram que a amostra “desmonta CMB” foi a única com resultados microbiológicos favoráveis, não apresentando qualquer microrganismo nocivo e não nocivo ao longo desse período. Assim, foi possível comprovar que a desmontagem dessa torneira e a limpeza escrupulosa de todos os seus componentes foi crucial para evitar o aparecimento de contaminação durante as 10 semanas. A realização apenas da última etapa da higienização, ou seja, a pulverização de álcool na superfície da torneira do mesmo tipo sem efetuar a sua desmontagem e a limpeza de todas as peças, não foi suficiente para garantir a qualidade da cerveja, e por isso, a amostra “não desmonta CMB” apresentou uma elevada carga microbiana (≥ 300) ao longo de todo o ensaio.

A limpeza individual de cada um dos componentes garante a eliminação de resíduos de cerveja que se acumulam em locais específicos no interior da mesma e que, se não forem eliminados, permitem a formação de biofilmes. Estes conferem muitas vantagens às células microbianas, nomeadamente resistência contra as correntes de líquido nas tubagens e proteção química contra os produtos químicos, antimicrobianos e desinfetantes.²⁹ Por isso, a limpeza envolvendo ação mecânica é fundamental para eliminar essas comunidades microbianas que se formam e que de outra forma, aplicando somente o álcool na superfície, não conseguem ser eliminadas.

Relativamente à torneira Mafridis como não se observaram diferenças nos resultados microbiológicos entre a desmontagem e a não desmontagem, tendo-se registado, em ambas,

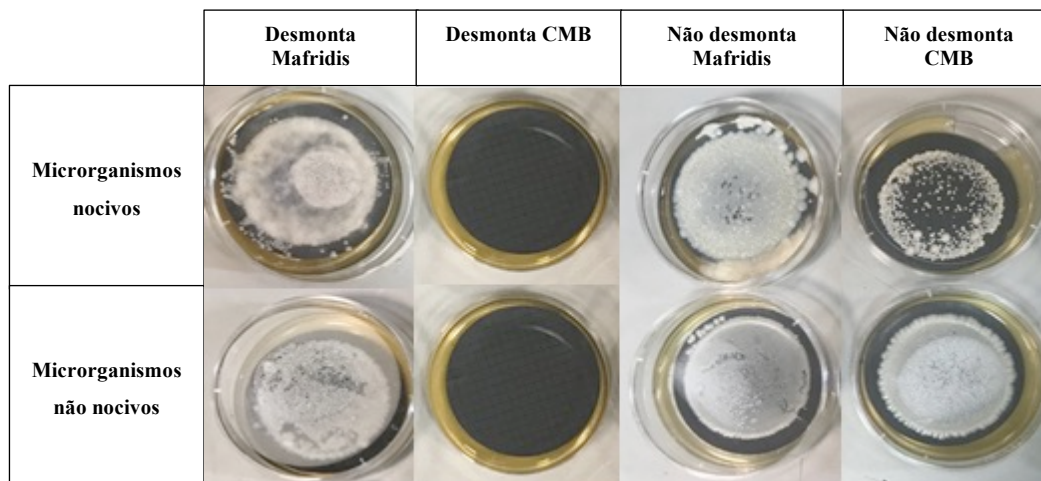
$n \geq 300$ microrganismos nocivos e não nocivos ao longo das 10 semanas, não foi possível avaliar o impacto da desmontagem neste tipo de torneira a partir desta análise. A Mafridis como é muito propícia ao aparecimento de contaminação, conforme foi verificado no teste das torneiras, mesmo garantindo a sua desmontagem e a limpeza de todos os seus componentes, a qualidade da cerveja não pode ser assegurada. O maior número de componentes internos que possui aumenta a probabilidade de acumulação de resíduos de cerveja em pontos específicos e consequentemente a formação de biofilmes, principalmente na peça pelo qual é regulada internamente, o pistão. Para além disso, contém um pequeno orifício externo que está ligado ao pistão e que abre, aquando a abertura da torneira, permitindo que níveis de O_2 entrem no interior do sistema e prevaleçam nestes locais, fornecendo condições aeróbicas que propiciam o desenvolvimento de microrganismos, nomeadamente bactérias e leveduras selvagens.²⁷

Assim, no final das 10 semanas, todas as instalações apresentavam contaminação ($n \geq 300$), à exceção da “desmonta CMB”, conforme demonstrado na tabela 4.7, através do registo fotográfico realizado às placas.

Tabela 4.6 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, nas primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Microrganismos não nocivos (UFC/100mL)										
Mafridis	Desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
CMB	Desmonta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
		Microrganismos nocivos (UFC/100mL)										
Mafridis	Desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
CMB	Desmonta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Tabela 4.7 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, à 10ª semana.



Os resultados da contagem de colónias de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens das amostras incubadas em meio ABP com UBA e Taylor com cobre, respetivamente, referentes à 10ª semana de ensaio, estão representadas na tabela 4.8. À exceção da “desmonta CMB”, que em meio UBA não apresentou contaminação ao longo das 10 semanas, todas as outras que demonstraram estar contaminadas quer por microrganismos nocivos quer não nocivos, obtiveram valores elevados ($n \geq 300$) de bactérias ácido-láticas (microrganismos nocivos à cerveja) e leveduras selvagens (microrganismos não nocivos).

Tabela 4.8 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, à 10ª semana.

	Torneira	Bactérias ácido-láticas (UFC/100mL)	Leveduras selvagens (UFC/100mL)
Mafridis	Desmonta	≥ 300	≥ 300
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300
CMB	Desmonta	0	0
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300

Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial realizada às amostras retiradas das 4 torneiras, 2 de cada tipo (Mafridis e CMB), ao longo das primeiras 10 semanas de ensaio estão representados na tabela 4.9.

Na “não desmonta CMB”, a avaliação global média foi satisfatória ao longo das primeiras 8 semanas, mas na 9ª e 10ª semana, o painel relatou uma clara evidência de contaminação por bactérias ácido-láticas, através da percepção de um aroma azedo e a diacetilo na cerveja, tendo avaliado a cerveja com -2. Apesar dos *off-flavours* resultantes do metabolismo dessas bactérias só terem sido percebidos numa fase tardia, a contaminação por esses microrganismos já existia, conforme ficou demonstrado através dos resultados microbiológicos, mas em concentrações abaixo do limiar de percepção e daí não terem sido detetadas pelo painel de provadores, à semelhança das leveduras selvagens, microrganismos esses que também estavam presentes mas não foram detetadas quaisquer impressões, relativas a compostos resultantes do seu metabolismo. Na “desmonta CMB”, que na análise microbiológica demonstrou não apresentar contaminação, obteve durante as 9 semanas uma avaliação satisfatória (valor médio igual a zero), tendo sido avaliada apenas à 10ª semana com -1 (não suficientemente satisfatória). Esta avaliação resultou de uma alteração no aroma da cerveja, percebida pelo painel, caracterizada pelo sabor a papel/cartão, que surge devido à formação de um composto, o *trans*-2-nonenal ou o aumento da sua concentração para valores acima do seu limiar de deteção (50 – 100 µg/L).¹⁹ Assim, à semelhança do que se verificou na análise microbiológica, a desmontagem deste tipo de torneira assegura uma extensão da qualidade da cerveja, podendo-se estender o seu ciclo de higienização, no limite, até às 10 semanas.

Relativamente à torneira Mafridis, o painel de provadores detetou a partir da primeira semana, tanto na amostra “não desmonta Mafridis” como na “desmonta Mafridis”, notas metálicas na cerveja, que se mantiveram até ao final das 10 semanas, tendo o produto sido avaliado como não satisfatório (valor médio entre -2 e -1,6). Essas percepções, caracterizadas pelo gosto de ferro ou cobre e, em alguns casos, percebido também como um sabor semelhante ao sangue, resultam de um composto formado, o sulfato de ferro (FeSO₄), devido ao contacto da cerveja com algum equipamento metálico do sistema de extração que

apresentasse algum grau de corrosão como por exemplo, as serpentinas por onde a cerveja passa para ser refrigerada ou do barril, onde está acondicionada, resultando na lixiviação de iões metálicos. ³¹ Apesar destas duas torneiras apresentarem também contaminação microbiológica por bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens, não houve uma produção considerável *de off-flavours*, acima do limiar de perceção que levassem o provador a identificá-los e por isso, apenas as notas metálicas foram percecionadas, colocando a hipótese de existir efetivamente um foco de corrosão que constituísse um foco permanente de contaminação microbiológica. As bactérias necessitam de micronutrientes metálicos para a sua função celular e o ferro é um microelemento essencial para o crescimento das bactérias utilizado como cofator de enzimas envolvidas em processos celulares fundamentais. Assim, a presença desse composto pode influenciar no crescimento de bactérias nas instalações, permitindo justificar o aparecimento de contaminação tão precocemente. ⁶¹

Tabela 4.9 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de torneiras, das primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Avaliação global média											
Mafridis	Desmonta	0	-2	-2	-2	-1,6	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
	Não desmonta	0	-2	-2	-2	-1,6	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
CMB	Desmonta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
	Não desmonta	0	0	0	0	-0,2	0	0	0	0	-2	-2	

4.2.3 Teste da (não) desmontagem de *clicks*

Este teste foi idêntico ao realizado com as torneiras, mas neste caso, o procedimento foi efetuado em *clicks*. Foram testados dois, um em que se procedeu à desmontagem e outro não e foram utilizados em ambas as instalações, tubos de PVC e torneiras Mafridis, garantindo que apenas o *click* constituía a única variável. O objetivo foi, à semelhança das torneiras, perceber o impacto da desmontagem dos *clicks* e avaliar se a última etapa de higienização,

a aplicação do álcool em spray na superfície destes componentes seria suficiente, permitindo assim eliminar o passo da desmontagem, realizado habitualmente durante o procedimento de higienização, sem comprometer a qualidade da cerveja.

Análise microbiológica

Os resultados obtidos da contagem de colónias presentes nas amostras incubadas em meio UBA, correspondentes às primeiras 10 semanas de ensaio, representados na tabela 4.10, demonstraram que a instalação “desmonta *click*” apresentou contaminação apenas à 10ª semana ($n \geq 300$), garantindo assim a qualidade da cerveja durante 9 semanas, enquanto que a “não desmonta *click*” apresentou contaminação ao longo das 10 semanas, tendo apresentado logo no momento inicial $n \geq 300$ microrganismos não nocivos e $n = 16$ microrganismos nocivos, mas após a primeira semana, os resultados da contagem de ambos os microrganismos foram elevados ($n \geq 300$).

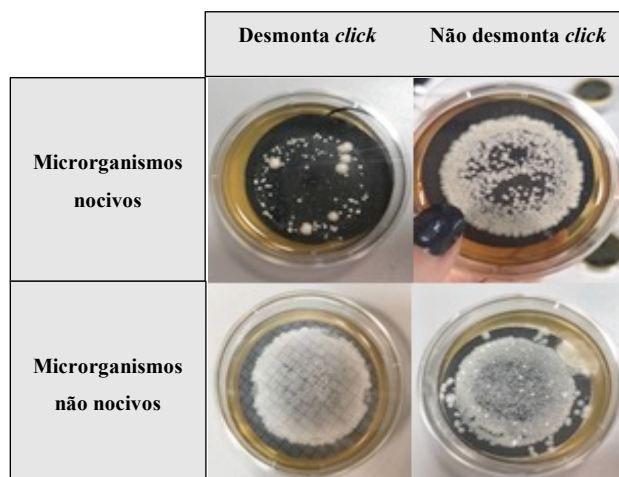
O *click*, para além de apresentar dois pontos de ligação (um onde está ligada a garrafa de CO₂ e o outro destinado à cerveja) que só por si já representam pontos críticos de contaminação, é ainda regulado internamente, à semelhança da torneira Mafrifis, por um pistão. Quando a alavanca do *click* é acionada para baixo após o acoplamento ao barril, o pistão sobe permitindo que a cerveja se desloque do interior do barril para a tubagem.^{17 18} Assim, a limpeza individual de cada um dos componentes garante a eliminação desses resíduos de cerveja acumulados nesses locais específicos e que, se não forem eliminados, permitem a formação de biofilmes, que conferem vantagens às células microbianas, nomeadamente proteção química contra os produtos químicos, antimicrobianos e desinfetantes.²⁹ Por isso, a limpeza envolvendo ação mecânica é fundamental para eliminar essas comunidades microbianas que se formam e que de outra forma, aplicando somente o álcool na superfície, não conseguem ser eliminadas.

Assim, apesar de no final das 10 semanas, ambas as instalações apresentavam contaminação, conforme demonstrado na tabela 4.11, a desmontagem do *click* garantiu a inexistência, até à 9ª semana, de contaminação quer por microrganismos nocivos quer por não nocivos e por isso, a execução da desmontagem do *click* é crucial durante o procedimento de higienização às instalações.

Tabela 4.10 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de *clicks*, nas primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Microrganismos não nocivos (UFC/100mL)											
<i>Click</i>	Desmonta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	≥ 300
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
		Microrganismos nocivos (UFC/100mL)											
<i>Click</i>	Desmonta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	≥ 300
	Não desmonta	16	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Tabela 4.11 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de *clicks*, à 10ª semana.



Os resultados da contagem de colônias de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens das amostras incubadas em meio ABP com UBA e Taylor com cobre, respectivamente, referentes à 10ª semana de ensaio, estão representados na tabela 4.12. Esses resultados demonstraram que apesar de ambas as instalações apresentarem contaminação à 10ª semana,

tanto por microrganismos nocivos como não nocivos, a “desmonta *click*” não revelou a presença de bactérias ácido-láticas, apenas de leveduras selvagens em elevado número (≥ 300), o que significa que os microrganismos nocivos que apresenta pertencem a outra espécie, as *Zymomonas*, igualmente detetáveis em meio UBA. Já a instalação “não desmonta *click*” apresentou $n \geq 300$ tanto de leveduras selvagens como de bactérias ácido-láticas.

Tabela 4.12 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de *clicks*, à 10^a semana.

<i>Click</i>	Bactérias ácido-láticas (UFC/100mL)	Leveduras selvagens (UFC/100mL)
Desmonta	0	≥ 300
Não desmonta	≥ 300	≥ 300

Análise sensorial

Os resultados obtidos da análise sensorial, representados na tabela 4.13, foram concordantes com os da análise microbiológica. Na instalação “desmonta *click*” a contaminação microbiológica surgiu apenas à 10^a semana e a avaliação global média da cerveja feita pelo painel de provadores, precisamente na amostra retirada nessa semana, foi de -1 (não suficientemente satisfatória). As impressões detetadas, referiam um aroma ácido e acético, resultante do produto metabólico das leveduras selvagens presentes e muito provavelmente de bactérias ácido-acéticas, frequentes em sistemas de extração.

Relativamente às amostras de cerveja recolhidas da instalação “não desmonta *click*”, a avaliação global média foi satisfatória ao longo das 8 semanas, estando compreendida entre -0,4 e 0, havendo alguns provadores que já nesta fase detetaram algumas notas negativas mas só a partir da 9^a semana é que o painel no geral percecionou de forma clara e evidente, um aroma ácido e a diacetilo na cerveja e observou ainda uma ligeira turvação, tudo isso resultante do metabolismo das bactérias ácido-láticas presentes. Assim, a avaliação global média da cerveja nessas duas últimas semanas foi de -2. Apesar dos *off-flavours* resultantes

do metabolismo das bactérias ácido-láticas só terem sido percecionadas numa fase tardia, a contaminação por esses microrganismos já existia, conforme se demonstrou através dos resultados microbiológicos, mas em concentrações abaixo do limiar de perceção e daí não terem sido detetadas nas primeiras 8 semanas pelo painel de provadores.

Tabela 4.13 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste da (não) desmontagem de *clicks*, das primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Avaliação global média											
<i>Click</i>	Desmonta	-0,2	-0,3	-0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
	Não desmonta	-0,2	0	-0,3	-0,2	-0,3	-0,3	0	-0,2	-0,4	-2	-2	

4.2.4 Teste dos tubos de arrefecimento

O objetivo com a realização deste teste foi perceber o impacto da temperatura da cerveja no desenvolvimento de microrganismos e na ocorrência de reações que alteram a qualidade e provocam alterações nas características organoléticas da cerveja. Para isso, foram instalados dois tubos de phyton feitos de polietileno, com um mecanismo de arrefecimento da cerveja incorporado, um por contacto e outro por inundação. Estes tubos garantem um maior decréscimo da temperatura da cerveja visto que no seu interior, circulará água refrigerada o que irá minimizar o ganho de calor da bebida depois que ela sai do refrigerador, mais concretamente do interior das serpentinas, até ao ponto de distribuição, a torneira. Assim sendo, fez-se a comparação entre estes dois tubos, o de contacto e o de inundação, que possuem um mecanismo de arrefecimento e o de PVC, que não possui qualquer mecanismo. As torneiras utilizadas nas 3 instalações foram do mesmo tipo, a Antoine com regulador de caudal.

Análise microbiológica

A contagem de colónias das amostras correspondentes às primeiras 10 semanas de ensaio, representados na tabela 4.14, demonstraram que o tubo de inundação, no momento inicial, deu resultados microbiológicos mais favoráveis que o tubo de contacto, apresentando apenas $n = 12$ microrganismos não nocivos e nenhum microrganismo nocivo. No entanto, ao fim da primeira semana, o tubo de inundação já apresentava à semelhança do tubo de contacto, uma elevada carga microbiana, com valores fora dos limites de aceitação, tanto para microrganismos nocivos como não nocivos ($n \geq 300$). Relativamente ao tubo de PVC, este apresentou resultados microbiológicos favoráveis, não apresentando qualquer contaminação ao longo das 10 semanas.

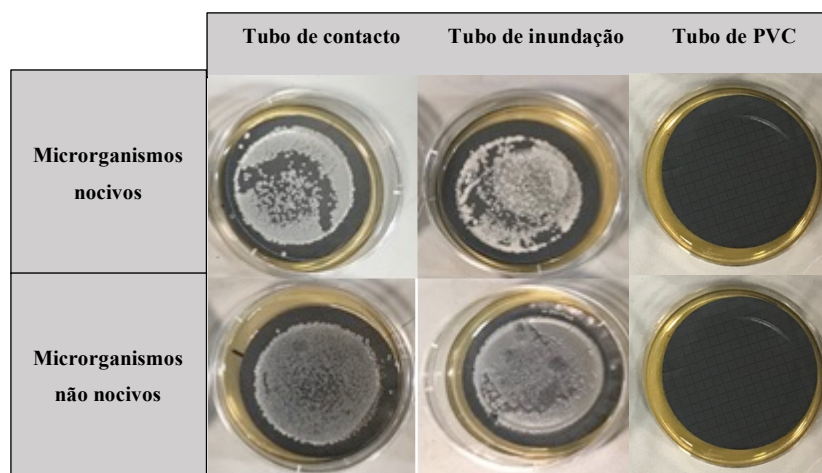
Os tubos de inundação e de contacto, por serem constituídos por polietileno e por um revestimento isolante com 13 mm de espessura, no mínimo, garantem um bom isolamento e evitam a entrada de O_2 para o interior do sistema constituindo uma alternativa aos tubos de PVC, assegurando uma menor adesão de biofilmes e um menor grau de contaminação das instalações.^{18 20} Para além disso, possuem um mecanismo de arrefecimento incorporado, garantindo uma maior diminuição da temperatura da cerveja, comparativamente aos tubos de PVC, que não possuem esse mecanismo. Por tudo isto, e ainda pelo facto da temperatura mais elevada ser um fator chave para o desenvolvimento de microrganismos, seria expectável que os resultados microbiológicos fossem melhores nos tubos de inundação e de contacto, comparativamente aos obtidos com o tubo de PVC e que a contaminação não surgisse tão cedo nas instalações onde esses tubos estavam instalados. Como tal não se verificou, suscitaram algumas dúvidas relativamente ao estado da instalação, podendo estar algum componente em mau estado, como por exemplo os barris ou as serpentinas e constituírem um foco permanente de contaminação, afetando negativamente os resultados. Para além disso, os tubos de contacto e inundação estavam instalados numa máquina diferente do tubo de PVC, o que representa também outra variável. Ao estarem instalados todos na mesma máquina permitiria tirar conclusões mais assertivas.

Assim, ao fim das 10 semanas de ensaio, as instalações que tinham os tubos de inundação e de contacto apresentavam contaminação microbiológica em número elevado ($n \geq 300$) e a que do tubo de PVC não apresentava contaminação, conforme demonstrado na tabela 4.15.

Tabela 4.14 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, nas primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Microrganismos não nocivos (UFC/100mL)										
Tubo	Inundação	12	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Contacto	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	PVC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Microrganismos nocivos (UFC/100mL)										
Tubo	Inundação	0	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Contacto	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	PVC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 4.15 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, à 10ª semana.



A contagem de colónias de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens das amostras incubadas em meio ABP com UBA e Taylor com cobre, respetivamente, referentes à 10ª semana de ensaio, estão representadas na tabela 4.16. Os resultados obtidos permitiram

concluir que, ao contrário do tubo de contacto que apresentou um valor de $n \geq 300$ tanto para bactérias ácido-láticas como para leveduras selvagens, o tubo de inundação teve igualmente $n \geq 300$ leveduras selvagens mas apenas $n = 15$ bactérias ácido-láticas e por isso, o valor de $n \geq 300$ microrganismos nocivos, obtido da contagem de colónias incubadas em meio UBA, comprova a existência de outras espécies de microrganismos nocivos à cerveja presentes, que não apenas bactérias ácido-láticas. Relativamente ao tubo de PVC, que não apresentou contaminação microbiológica, não tendo sido identificado qualquer microrganismo em meio UBA ao longo das 10 semanas de ensaio, apresentou valores igualmente nulos para ambos os microrganismos (bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens) quando incorporados nestes meios diferenciais.

Tabela 4.16 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, à 10ª semana.

Tubo	Bactérias ácido-láticas (UFC/100mL)	Leveduras selvagens (UFC/100mL)
Inundação	15	≥ 300
Contacto	≥ 300	≥ 300
PVC	0	0

Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial, representados na tabela 4.17, revelaram que a avaliação global média das amostras de cerveja recolhidas ao longo das 10 semanas, foi claramente melhor para o tubo de PVC do que para os tubos de inundação e de contacto. O tubo de PVC, apresentou ao longo de todo o ensaio, uma avaliação global média satisfatória, tendo os valores médios ficado situados entre -0,1 e 0, não havendo por isso alterações significativas das características organoléticas da cerveja. Relativamente aos tubos de inundação e contacto, os resultados obtidos foram idênticos entre si e estiveram compreendidos entre -2,5 e -1,6, à exceção do momento inicial, cuja avaliação global média foi satisfatória. Nas primeiras 8 semanas, o painel de provadores identificou notas metálicas na cerveja, provavelmente resultante da formação de sulfato de ferro (FeSO_4) que apresenta

esse descritor de aroma/sabor, devido ao contacto da cerveja com materiais metálicos que apresentem algum grau de corrosão.³¹ À 9ª e 10ª semana, para além dessa característica, os provadores detetaram ainda a presença de um aroma acético e notas avinagradas na cerveja, devido à existência de leveduras selvagens e a presença, bastante provável, de bactérias ácido-acéticas. As bactérias ácido-láticas, apesar de estarem presentes em ambas as amostras, estando em maior número no tubo de contacto, não foram percecionadas porque as concentrações de ácido láctico produzido, resultante do metabolismo dessas bactérias, estariam, muito provavelmente, abaixo do limiar de percepção sensorial.

Assim, as notas metálicas detetadas pelo painel de provadores nas amostras relativas ao tubo de inundação e de contacto vieram confirmar a hipótese colocada na análise microbiológica, da existência de um problema nessas duas instalações onde esses tubos estavam instalados. Os componentes identificados como possíveis focos de contaminação e os responsáveis pelas alterações organoléticas identificadas na cerveja foram as serpentinas e os barris engatados nessas instalações, visto serem ambos constituídos por materiais metálicos e no caso de estarem em mau estado, constituírem um foco de corrosão levando à formação de sulfato de ferro (FeSO₄) e conseqüentemente, à lixiviação de iões metálicos. Para além disso, como as bactérias necessitam de micronutrientes metálicos para a sua função celular e o ferro é um microelemento essencial para o seu crescimento, a presença desse composto pode ter influenciado no crescimento de bactérias nessas duas instalações, permitindo assim justificar a elevada carga microbiana observada para os tubos de inundação e contacto, comparativamente ao tubo de PVC.⁶¹

Tabela 4.17 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste dos tubos de arrefecimento, das primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
		Avaliação global média											
Tubo	Inundação	0	-2	-1,6	-1,7	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2,5
	Contacto	0	-2	-1,6	-1,7	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2,5
	PVC	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,1	0	0	0

4.2.5 Teste do tubo de FEP

Neste teste foi usado um tubo de propileno etileno fluorado (FEP) em vez dos tubos convencionais feitos de PVC. Este tubo, à semelhança dos de PVC, não possui qualquer mecanismo de arrefecimento incorporado, sendo o arrefecimento da cerveja assegurado através da passagem pelo circuito interno das serpentinas. O objetivo com a realização deste teste foi avaliar a eficiência deste material, de menor rugosidade, na menor adesão de microrganismos e conseqüentemente na menor contaminação microbiológica do sistema, assegurando a qualidade e as características organolépticas originais da cerveja durante mais tempo. Para isso, fez-se a avaliação comparativa entre este tubo de FEP com o de PVC, mantendo o mesmo tipo de torneira, a Mafridis.

Análise microbiológica

A contagem de colónias presentes nas amostras incubadas em meio UBA, correspondentes às primeiras 10 semanas de ensaio estão representadas na tabela 4.18. Desde o momento em que se deu início ao ensaio até ao final (10^a semana), a contaminação por microrganismos nocivos e não nocivos foi identificada e revelou ser elevada, com valores de $n \geq 300$ para ambos os microrganismos, tanto no tubo de FEP como no de PVC, conforme ficou registado, através de fotografias retiradas às placas, representadas na tabela 4.19.

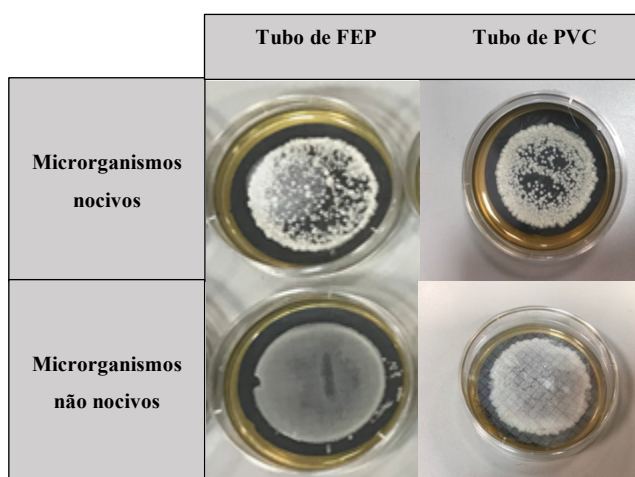
O tubo de FEP, por possuir uma menor rugosidade que o tubo de PVC, garante uma menor adesão de microrganismos e uma maior facilidade na remoção desses microrganismos durante o procedimento de higienização. Assim, seria expectável que os resultados microbiológicos fossem melhores no tubo de FEP, comparativamente aos obtidos com o tubo de PVC e que a contaminação não surgisse tão precocemente nas instalações onde esse tubo estava instalado. Como tal não se verificou, suscitaram algumas dúvidas relativamente ao estado da instalação, à semelhança do que aconteceu com o teste da (não) desmontagem das torneiras e dos tubos de arrefecimento, podendo estar algum componente em mau estado, como os barris ou as serpentinas e constituir um foco permanente de contaminação, permitindo justificar os resultados microbiológicos obtidos e dessa forma, não permitir tirar conclusões acerca da eficácia deste tubo. Para além disso, as torneiras utilizadas neste ensaio foram as Mafridis que são muito propícias a contaminação como foi verificado no teste das

torneiras e os tubos de FEP e PVC estavam instalados em máquinas diferentes, constituindo assim mais uma variável no ensaio.

Tabela 4.18 Microrganismos não nocivos e nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, nas primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Microrganismos não nocivos (UFC/100mL)										
Tubo	FEP	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
		Microrganismos nocivos (UFC/100mL)										
Tubo	FEP	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Tabela 4.19 Microrganismos nocivos e não nocivos presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, à 10ª semana.



A contagem de colónias de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens das amostras incubadas em meio ABP com UBA e Taylor com cobre, respetivamente, referentes à 10ª semana de ensaio, estão representadas na tabela 4.20. Os resultados revelaram a presença de bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens em número elevado ($n \geq 300$) em ambos os tubos.

Tabela 4.20 Bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens presentes nas amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, à 10ª semana.

Tubo	Bactérias ácido-láticas (UFC/100mL)	Leveduras selvagens (UFC/100mL)
FEP	≥ 300	≥ 300
PVC	≥ 300	≥ 300

Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial referentes aos dois tubos estão descritos na tabela 4.21. No tubo de FEP, o painel de provadores identificou, ao longo das 10 semanas de ensaio, à exceção do momento inicial, notas metálicas na cerveja, resultando numa avaliação global média compreendida entre -2,2 e -1,6. Essas perceções, são o resultado da formação de um composto, o sulfato de ferro (FeSO_4), devido ao contacto da cerveja com materiais metálicos, resultando na lixiviação de iões metálicos. Níveis excessivos de FeSO_4 , fazem com que a cerveja tenha um gosto a ferro enferrujado ou a cobre.³¹ Para além disso, a presença de ferro influencia no crescimento de bactérias visto que esse composto é um microelemento essencial e por isso, a elevada carga microbiológica identificada, pode ser justificada pela presença de algum componente do sistema de extração em mau estado que seja um foco de corrosão. Apesar de se ter verificado essa contaminação microbiológica, não foi percecionado qualquer descritor de aroma relativo a compostos representativo dessa mesma contaminação. As bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens, apesar de estarem presentes, segundo a análise microbiológica, produziram compostos em concentrações abaixo do limiar de perceção e por isso não foram identificados. Relativamente ao tubo de PVC, apesar da

contaminação microbiológica ter sido igualmente notória, apresentou ao longo de todo o ensaio, uma avaliação global média satisfatória, tendo os valores médios ficado situados entre -0,1 e 0, não tendo sido detetada qualquer alteração significativa nas características organoléticas da cerveja.

Assim, os aromas metálicos identificados vieram reforçar a ideia, que surgiu após a obtenção dos dados da análise microbiológica, da existência de um problema no barril ou em algum componente da instalação, provavelmente na serpentina e por isso, com este estudo, não foi possível concluir se o tubo de FEP seria uma alternativa viável de substituição ao tubo de PVC porque existe claramente um foco de contaminação.

Tabela 4.21 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes ao teste do tubo de FEP, das primeiras 10 semanas.

		Nº de semanas										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Avaliação global média										
Tubo	FEP	-0,2	-2	-2	-2	-1,8	-2	-2	-1,6	-2	-2,2	-2
	PVC	0	0	0	0	-0,2	0	-0,1	0	-0,2	0	0

4.3 Diagnóstico de contaminação

4.3.1 Análise de possíveis causas

Devido às notas metálicas percecionadas pelo painel de provadores na análise sensorial e aos valores de contaminação microbiológica identificados em algumas amostras de cerveja, contraditórios com o que seria expectável, decidiu-se realizar uma análise aprofundada sobre as possíveis causas de forma a tentar encontrar a origem da contaminação. Assim, colocaram-se duas hipóteses, a primeira seria o barril e a outra estaria relacionada com as serpentinas. Sendo ambos componentes metálicos, poderiam apresentar algum grau de corrosão constituindo assim um foco permanente de contaminação em determinada instalação.

4.3.2 Troca de barris

Após as 10 semanas e antes de proceder à substituição de novos barris para dar continuidade ao ensaio durante mais 3 semanas, fez-se duas trocas de barris, conforme demonstrado na figura 4.2. O barril 8 engatado na instalação 8 e cujos resultados das amostras revelaram, desde o momento inicial, elevada carga microbiana ($n \geq 300$), tanto para microrganismos nocivos como não nocivos, foi engatado na instalação 1, cujas contagens de colónias deram sempre nulas para ambos os microrganismos (nocivos e não nocivos). O mesmo foi feito para o barril 11 e 12.

De seguida, foram recolhidas amostras de cerveja e foi feita análise microbiológica usando como meio de incubação, UBA. Os resultados dessa análise à cerveja nesses 4 barris engatados em diferentes instalações demonstraram que aquelas que anteriormente apresentaram contaminação ao longo das 10 semanas, como foi o caso do barril 8 e 12, quando engatados noutra instalação, não apresentaram qualquer contaminação, ao contrário dos barris 1 e 11 que tinham dado sempre contagens nulas de microrganismos nocivos e não nocivos, apresentaram $n \geq 300$ microrganismos nocivos e não nocivos.

Assim, esta análise permitiu tirar duas conclusões: a primeira, é que existe efetivamente um problema, mas que não tinha origem no barril, mas sim na instalação, provavelmente nas serpentinas. A segunda, é que ficou comprovado que a cerveja, ao final das 10 semanas, no interior destes 4 barris afinal não estaria contaminada, e por isso a elevada carga microbiana observada deveu-se à passagem da cerveja por algum ponto crítico desses sistemas de extração e que constitui um foco permanente de contaminação

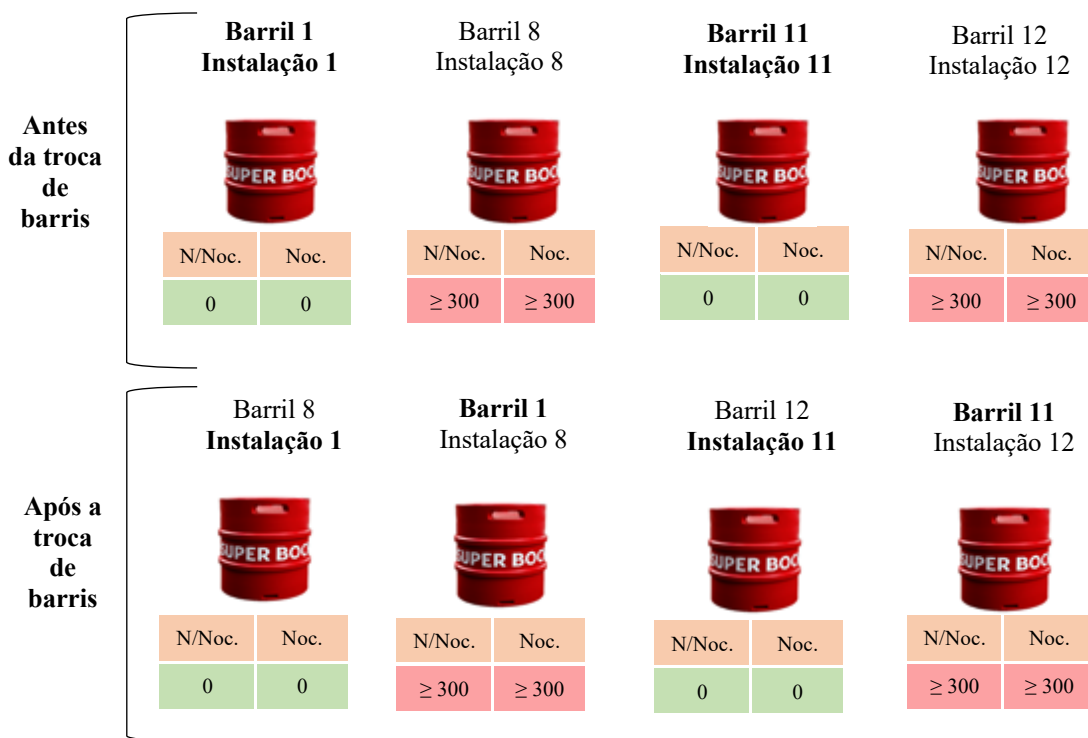


Figura 4.2 Esquema da troca de barris entre instalações

4.3.3 Substituição de barris

Após a troca de barris, decidiu-se higienizar novamente todas as instalações, à semelhança do que tinha sido feito na primeira higienização, e voltou-se a engatar novos barris para perceber se a contaminação surgiria nas mesmas instalações, reforçando a teoria de que a origem do problema estaria na instalação e não no barril.

Os resultados das amostras das águas retiradas antes e após a higienização, representadas na tabela 4.22, comprovaram que a limpeza às instalações foi eficiente, na medida em que permitiu a eliminação total de microrganismos nocivos e de não nocivos presentes nas instalações antes da higienização.

Tabela 4.22 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas águas de enxaguamento antes e após a segunda higienização.

Teste	Amostra	Antes Higienização (UFC/100mL)		Após Higienização (UFC/100mL)	
		N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.
Torneiras	CMB	12	0	0	0
	Teste	≥ 300	≥ 300	0	0
	Antoine c/regulador	22	0	0	0
	Mafridis	8	5	0	0
	Antoine s/regulador	≥ 300	1	0	0
(Não) desmontagem <i>clicks</i>	Desmonta	≥ 300	5	0	0
	Não desmonta	≥ 300	≥ 300	0	0
Tubos de arrefecimento	Tubo de inundação	≥ 300	≥ 300	0	0
	Tubo de contacto	≥ 300	20	0	0
(Não) desmontagem torneiras	Desmonta Mafridis	≥ 300	12	0	0
	Desmonta CMB	34	0	0	0
	Não desmonta Mafridis	≥ 300	29	0	0
	Não desmonta CMB	58	4	0	0
Tubo de FEP	Tubo de FEP	≥ 300	50	0	0

Após a higienização, engataram-se os novos barris de cerveja e retiraram-se amostras de cerveja para a análise sensorial e microbiológica.

Os resultados da análise microbiológica, representados na tabela 4.23, demonstraram que a contaminação surgiu precisamente nas mesmas instalações que no ensaio das 10 semanas realizado anteriormente. Na “torneira CMB”, “torneira Antoine com regulador”, “Desmonta *click*” e “Desmonta CMB”, os resultados foram satisfatórios tanto para os microrganismos nocivos como os não nocivos, ao contrário das restantes em que se obtiveram valores não aceitáveis para ambos os microrganismos ($n \geq 300$) ao longo das 3 semanas de ensaio.

Tabela 4.23 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja, referentes a todos os testes, nas 3 semanas após a segunda higienização.

Teste	Amostra		Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3	
			N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.
Torneiras	CMB	Clicks desmontados	0	0	0	0	0	0	0	0
	Teste		≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine c/ regulador	Torneiras desmontadas	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mafridis	Tubo PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Antoine s/ regulador		≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
(Não) desmontagem clicks	Desmonta	Torneiras desmontadas	0	0	0	0	0	0	0	0
	Não desmonta	Torneiras Mafridis Tubo PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
Tubos de arrefecimento	Tubo de inundação	Clicks desmontados	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Tubo de contacto	Torneiras Antoine c/ regulador	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
(Não) desmontagem torneiras	Desmonta Mafridis	Clicks desmontados	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Desmonta CMB	Torneiras desmontadas	0	0	0	0	0	0	0	0
	Não desmonta Mafridis	Tubo PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
	Não desmonta CMB		≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
Tubo de FEP	Tubo de FEP	Click desmontado	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	
		Torneira desmontada	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300
		Torneira Mafridis	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Relativamente aos resultados da análise sensorial, representados na tabela 4.24, o painel de provadores identificou notas metálicas, após a primeira semana, avaliando a cerveja com -2, precisamente nas amostras de cerveja recolhidas das mesmas instalações que no ensaio das primeiras 10 semanas.

Tabela 4.24 Controlo organolético das amostras de cerveja, referentes a todos os testes, nas 3 semanas após a segunda higienização.

Teste	Amostra		Avaliação global média			
			Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Torneiras	CMB	Clicks desmontados	0	0	0	0
	Teste		0	0	0	0
	Antoine c/ regulador	Torneiras desmontadas	0	0	0	0
	Mafridis	Tubo PVC	0	0	0	0
	Antoine s/ regulador		0	0	0	0
(Não) desmontagem clicks	Desmonta	Torneiras desmontadas	0	0	0	0
	Não desmonta	Torneiras Mafridis	0	0	0	0
Tubos de arrefecimento	Tubo de inundação	Clicks desmontados	0	-2	-2	-2
	Tubo de contacto	Torneiras Antoine c/ regulador	0	-2	-2	-2
(Não) desmontagem torneiras	Desmonta Mafridis	Clicks desmontados	0	-2	-2	-2
	Desmonta CMB	Torneiras desmontadas	0	0	0	0
	Não desmonta Mafridis		0	-2	-2	-2
	Não desmonta CMB	Tubo PVC	0	0	0	0
Tubo de FEP	Tubo de FEP	Click desmontado	0	-2	-2	-2
		Torneira desmontada				
		Torneira Mafridis				

Assim, os resultados da análise microbiológica e sensorial, tornam mais que evidente, a existência de um componente que esteja a afetar negativamente todo o sistema de extração e a comprometer a qualidade da cerveja. Mesmo após a segunda higienização realizada às instalações e a substituição de novos barris, a elevada carga microbiana e as notas metálicas surgiram nas mesmas instalações que no ensaio das 10 semanas e por isso, existe um componente que ainda não foi identificado, mas que se estiver em mau estado, constituirá um foco de contaminação permanente, impedindo, em alguns dos testes, de chegar às devidas conclusões.

4.3.4 Troca de serpentinas

Após ter sido comprovado que a contaminação tinha origem na instalação e tendo em conta que em muitas amostras de cervejas analisadas, o aroma metálico foi frequente, colocou-se a hipótese de as serpentinas estarem em mau estado, podendo apresentar algum grau de corrosão e constituírem um foco de contaminação. A cerveja ao passar pelo circuito interno das serpentinas para ser refrigerada, contacta com o material das mesmas e se estas estiverem corroídas internamente, os iões metálicos presentes no material irão afetar a cerveja e serão responsáveis pelas notas metálicas percecionadas.

Para isso, começou-se por averiguar se as serpentinas instaladas para este ensaio eram novas e verificou-se que nem todas seriam. Posto isto, decidiu-se efetuar a troca de um conjunto de 4 serpentinas de uma das 3 máquinas de extração. Retiraram-se as que estavam instaladas, efetuou-se a higienização dessa instalação e colocaram-se novas serpentinas.

Às serpentinas antigas, foi feita análise por bioluminescência, que consistiu no esfregaço, recorrendo a uma zaragatoa, nas superfícies internas das serpentinas. Os valores obtidos, representados na tabela 4.25, demonstraram que apesar de todas apresentarem contaminação microbiológica, apenas duas delas obtiveram resultados fora dos valores de especificação estabelecidos (≥ 100 RLU). No entanto, verificou-se uma enorme discrepância nos resultados das 4 serpentinas, que pode ser explicado pelo facto desta análise não ser muito objetiva porque depende de vários fatores nomeadamente da área de superfície atingida pela zaragatoa e do tempo de contacto.

Tabela 4.25 Análise por bioluminescência do esfregaço recolhido às 4 serpentinas

Serpentina	RLU
1	156
2	62
3	10
2	1965

Após a instalação das novas serpentinas, voltou-se a engatar os mesmos barris e foram retiradas amostras de cerveja para a realização da análise microbiológica e sensorial de forma a avaliar, comparativamente, o efeito da troca das serpentinas.

Os resultados da análise microbiológica, representados na tabela 4.26, demonstraram que, mesmo após a troca das serpentinas, a contaminação se manteve nas instalações 2, 3 e 4 que já apresentavam contaminação. A instalação 2 apresentou uma ligeira redução no número de nocivos, passando de $n \geq 300$ para $n = 3$, mas manteve $n \geq 300$ microrganismos não nocivos. A instalação 3 sofreu uma redução tanto de microrganismos nocivos (de $n \geq 300$ para $n = 6$) como não nocivos (de $n \geq 300$ para $n = 103$). Por último, a instalação 4 manteve a elevada carga microbiana em ambos os microrganismos ($n \geq 300$). Apesar de se verificar, em alguns casos, uma redução de microrganismos, todos os resultados obtidos destas 3 instalações são valores não aceitáveis tanto para microrganismos nocivos como não nocivos. Relativamente à instalação 1, que não apresentava qualquer contaminação com as serpentinas antigas instaladas, voltou a não apresentar qualquer microrganismo (nocivo e não nocivo) com as novas serpentinas instaladas.

Tabela 4.26 Microrganismos nocivos e não nocivos à cerveja presentes nas amostras de cerveja com as serpentinas antigas e as novas.

Instalação	Torneira		Click	Tubo	Serpentinas antigas (UFC/100mL)		Serpentinas novas (UFC/100mL)	
					N/Noc.	Noc.	N/Noc.	Noc.
1	Mafridis	Desmontada	Desmontado	PVC	0	0	0	0
2	Mafridis	Desmontada	Não desmontado	PVC	≥ 300	≥ 300	≥ 300	3
3	Antoine c/ regulador	Desmontada	Desmontado	Inundação	≥ 300	≥ 300	103	6
4	Antoine c/ regulador	Desmontada	Desmontado	Contacto	≥ 300	≥ 300	≥ 300	≥ 300

Na análise sensorial, a avaliação global dada pelo painel de provadores para as amostras de cerveja após a instalação das novas serpentinas, descrita na tabela 4.27, mostrou não haver alterações comparativamente às serpentinas antigas. A primeira e segunda instalação mantiveram a avaliação global média satisfatória (igual a 0) enquanto que as outras duas, a 3 e 4, foram avaliadas com -2 à semelhança das serpentinas antigas.

Tabela 4.27 Controlo organolético das amostras de cerveja com as serpentinas antigas e as novas.

Instalação	Torneira		Click	Tubo	Avaliação global média	
					Serpentinas antigas	Serpentinas novas
1	Mafridis	Desmontada	Desmontado	PVC	0	0
2	Mafridis	Desmontada	Não desmontado	PVC	0	0
3	Antoine c/ regulador	Desmontada	Desmontado	Inundação	-2	-2
4	Antoine c/ regulador	Desmontada	Desmontado	Contacto	-2	-2

Posto isto, os resultados obtidos da análise microbiológica e sensorial realizadas às amostras com as novas serpentinas, comparativamente às serpentinas antigas demonstraram que não se observaram melhorias significativas e por isso, não constituem o foco permanente de contaminação.

Assim, é possível concluir que existe um ponto crítico de controlo que nem faz parte da higienização nem do controlo de qualidade dos sistemas de extração, mas que afeta a qualidade microbiológica e organolética da cerveja. Independentemente da eficiência da higienização às tubagens, do procedimento de limpeza que se adote nas torneiras e *clicks* (com ou sem desmontagem) ou do tipo de tubo e torneira que se utilize, se a instalação não estiver em conformidade devido à existência desse tal ponto crítico, que não se conseguiu identificar, observar-se-á contaminação de forma permanente.

Para comprovar isso, foi feita uma análise comparativa a duas instalações (4 e 6), representadas na tabela 4.28, que estavam precisamente nas mesmas condições, e foi possível verificar que os resultados microbiológicos foram totalmente opostos. A instalação 4, na qual se observou contaminação, poderia sofrer alterações no tipo de torneira, no tubo ou até no procedimento de limpeza que os resultados da análise microbiológica apresentariam sempre uma elevada carga microbiana devido a esse tal ponto crítico no sistema.

Tabela 4.28 Resultados da análise microbiológica das instalações 4 e 6.

Instalação	Teste	Torneira		Click	Tubo	Análise Microbiológica	
						N/Noc.	Noc.
4	Torneiras	Mafridis	Desmontada	Desmontado	PVC	≥ 300	≥ 300
6	(não) desmontagem <i>clicks</i>	Mafridis	Desmontada	Desmontado	PVC	0	0

5. Conclusões

A metodologia desenvolvida permitiu concluir, com base nos resultados da análise microbiológica, que a cerveja em barril aquando acoplada a um sistema de extração, apresenta uma vasta variedade de organismos contaminantes à medida que o número de semanas aumenta. Relativamente à prova sensorial, esta foi fundamental para avaliar a qualidade da cerveja, tendo-se conseguido uma importante associação dos descritores sensoriais utilizados com a deterioração provocada pelos microorganismos.

As torneiras de corte, nomeadamente a CMB e a Antoine com regulador de caudal mostraram ser as mais eficazes na preservação da qualidade da cerveja, quer em termos microbiológicos quer sensoriais, ao longo de 10 semanas e por isso, constituem uma ótima alternativa às torneiras de pistão, as Mafridis, que estão instaladas num maior número de pontos de venda e que provaram ser mais propícias ao aparecimento de contaminação.

A desmontagem das torneiras e a limpeza escrupulosa de todos os seus componentes, demonstrou, na torneira CMB, ser crucial para evitar o aparecimento de contaminação durante pelo menos 10 semanas, não sendo suficiente assegurar apenas a última etapa de higienização, ou seja, a pulverização com um desinfetante à base de álcool na superfície dessa torneira. A acumulação de resíduos no interior destas torneiras formam os biofilmes que possuem resistência química, inibindo a ação desse desinfetante e só recorrendo à ação mecânica é que se garante a eliminação desses focos de contaminação. Relativamente à torneira Mafridis como não se observaram diferenças nos resultados microbiológicos entre a desmontagem e a não desmontagem, devido a esta ser muito propícia a contaminação, tendo-se registado, em ambas, contaminação microbiológica ao longo das 10 semanas e para além disso, ter sido detetado, na análise sensorial, aromas metálicos na cerveja que indicavam problemas nessas instalações, não foi possível avaliar o impacto da desmontagem.

A desmontagem dos *clicks* demonstrou ser essencial e por isso, esse passo não deve ser desprezado pelos técnicos que executam o procedimento de higienização às instalações. A pulverização apenas de desinfetante à base de álcool na superfície desses componentes provou não ser suficiente, não garantindo a qualidade da cerveja, porque os biofilmes que se formam em locais específicos no interior do *click* só serão removidos quando a ação mecânica for aliada à limpeza.

Assim, a desmontagem dos *clicks* e das torneiras mostrou ser essencial no procedimento de higienização e eficaz na preservação da qualidade da cerveja e por isso, não é possível reduzir o tempo do procedimento de higienização sem comprometer a qualidade da cerveja.

Os tubos de arrefecimento, apesar de possuírem características mais vantajosas que os de PVC e o tubo de FEP, apesar de possuir uma menor rugosidade, característica que lhe possibilita garantir uma menor adesão de microrganismos, apresentaram resultados que não foram conclusivos suscitando algumas dúvidas relativamente ao estado da instalação, reforçadas com a perceção de notas metálicas na análise sensorial.

A troca de barris efetuada entre instalações provou que o foco de contaminação não tinha origem nos barris, mas sim nas instalações e que a qualidade da cerveja no interior dos barris foi mantida mesmo após as 10 semanas. Relativamente à troca efetuada de um conjunto de serpentinas, que se apresentassem corrosão poderiam justificar os aromas metálicos percecionados, não se observaram diferenças significativas entre os resultados da análise sensorial e microbiológica mediante a troca de serpentinas, assim, estas também não constituíam o foco de contaminação, deixando em aberto qual a verdadeira causa dos resultados microbiológicos obtidos e as notas metálicas percecionadas.

Assim, é possível concluir que existe um componente da instalação, considerado como ponto crítico de controlo, mas cuja importância está a ser negligenciada, provocando assim alterações na qualidade microbiológica e organoléptica da cerveja.

6. Trabalho futuro

Em retrospecto, são apresentadas algumas sugestões para propostas de trabalho futuro de modo a compreender fenómenos cujas respostas ficaram em aberto.

- Investigar uma metodologia que permita identificar qual o ponto crítico que constitui o foco permanente de contaminação na maioria das instalações;
- Realização de testes bioquímicos tais como: teste da catalase, oxidase, de Gram e de KOH de forma a poder identificar, recorrendo a uma árvore de decisão, todas as espécies presentes nas amostras da cerveja para além das identificadas (bactérias ácido-láticas e leveduras selvagens);
- Realização de métodos de controlo físico-químico também seria importante para sustentar a análise sensorial e a microbiológica e poder relacionar a existência de compostos com as notas percebidas pela análise sensorial.

7. Referências bibliográficas

1. Super Bock Group. **Sobre nós.** [23/10/2019] Disponível em <https://www.superbockgroup.com/detalhe/about-the-group/>.
2. Super Bock Group. **As nossas marcas.** [23/10/2019] Disponível em <https://www.superbockgroup.com/todos-os-produtos/>.
3. Super Bock Group. **Onde estamos.** [23/10/2019] Disponível em <https://www.superbockgroup.com/onde-estamos/>.
4. Preedy V. **Beer in Health and Disease Prevention.** Academic Press. Londres. 2009: 223-224.
5. Junqueira I. Otimização das mudanças de produto e dos programas de higienização do Centro de Produção de Leça do Balio [Tese de mestrado]: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2016.
6. Cabrita J. **Curso de Produção de Cerveja.** Unicer. 1985.
7. Lewis M. J. **Beer and Brewing.** John Wiley & Sons, Inc. 2003;23:104-139.
8. Simpson, B. **Food Biochemistry and Food Processing.** John Wiley & Sons, Inc. EUA. 2012: 22-24.
9. Lodolo E. , Kock J. , Axcell B. , Brooks M. **The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing.** Fleet G. 2008;8:1018–1036.
10. Hartmeier W. , Reiss M. **Production of beer and wine.** Springer. 2011;10:49-65.
11. Super Bock Group. **Sobre as cervejas.** [23/10/2019] Disponível em <https://www.superbockgroup.com/detalhe/sobre-as-cervejas/>.
12. O'Rourke T. **The role of oxygen in brewing.** The Brewer International. 2002;3:45-47.
13. ProBrewer. **Brewery filter applications.** [12/11/2019] Disponível em <https://www.probrewer.com/library/filtration/brewery-filter-applications/>.
14. Briggs D. E. , Boulton C.A. , Brookes P.A. , Stevens R. **Brewing: Science and practice.** Woodhead Publishing Limited. 2004;86:606–648.
15. Stanga M. **Sanitation: Cleaning and Disinfection in the Food Industry.** Wiley-VCH. Alemanha. 2010: 68-73.
16. Direct Industry. **Estação de limpeza e enchimento.** [25/10/2019] Disponível em <https://www.directindustry.com/pt/prod/khs-gmbh/product-21322-1100267.html>.
17. Esslinger M. **Handbook of Brewing, Processes, Technology, Markets.** Wiley-VCH. Alemanha. 2009:339–397.

18. Santos, S. **Manual Formação TR**. Unicer. 2010.
19. De Schutter D. P. , Saison D. , Delvaux F. , Derdelinckx G. , Delvaux F. R. **The chemistry of aging beer**. Elsevier. 2008;95:375–388.
20. Thomas K. , Whitham H. **Proc. EBC Symposium**. Monograph XXV. 1996.
21. Tubing Food. **Tubos**. [22/11/2019] Disponível em <https://www.tubingfood.es/catalogo-productos/>.
22. Dalgliesh C. E. **Flavour stability**. European Brewery Convention. Surrey. 1977:623–659.
23. Hughes P.S. , Baxter E. D. **Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects**. The Royal Society of Chemistry. Londres. 2001: 54-69.
24. Siqueira P. B. **Estudo da cinética bioquímica e sensorial de diferentes tipos de cervejas brasileiras**. [Tese de mestrado]: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
25. Jespersen L. , Jakobsen M. **Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection**. International Journal of Food Microbiology. 1996;33:139–155.
26. Sakamoto K. , Konings W. N. **Beer spoilage bacteria and hop resistance**. International Journal of Food Microbiology. 2003;89:105–124.
27. Quain D. E. **Assuring the microbiological quality of draught beer**. Elsevier. 2015;54:335-354.
28. Characklis W.G. , Marshall K. C. **Biofilms**. John Wiley and Sons. EUA. 1990: 578-597.
29. Flemming H. C. , Wingender J. , Szewzyk U. , Steinberg P. , Rice S. , Kjelleberg S. **Biofilms: An emergent form of bacterial life**. Nature Reviews Microbiology. 2016;14:563–575.
30. Back W. **Sekundärkontaminationen im Abfüllbereich**. Brauwelt. 1994;16:686–695.
31. Priest F. G. , Stewart G. G. **Handbook of Brewing**. Taylor & Francis. Londres. 2006:686-699.
32. Priest F. G. **Brewing Microbiology**. Springer. EUA. 1996: 126-131.
33. Suzuki K. , Iijima K. , Ozaki K. , Yamashita H. **Study on ATP production of lactic acid bacteria in beer and development of a rapid pre-screening method for beer-spoilage bacteria**. Journal of the Institute of Brewing. 2005;111:328–335.

34. Durello R. S. , Silva L. M. , Bogusz S. **Química do Lúpulo**. Química Nova. 2019;42:900–919.
35. Behr J. , Vogel R. **Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;6074 – 6081.
36. Behr J. , Vogel R. **Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction**. Applied and Environmental Microbiology. 2010;76:142–149.
37. Bokulich N. A. , Bamforth C. W. **The Microbiology of Malting and Brewing**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2013;77:157–172.
38. Suzuki K. , Ozaki K. , Yamashita H. **Comparative analysis of conserved genetic markers and adjacent DNA regions identified in beer- spoilage lactic acid bacteria**. Letters in Applied Microbiology. 2004;39:240 –245.
39. Vaughan A. , O’Sullivan T. , Van Sinderen D. **Enhancing the microbiological stability of malt and beer - A review**. Journal of the Institute of Brewing. 2005;111:355–371.
40. Paradh A. D. **Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste**. Hill A. Cambridge. 2015: 230-254.
41. Guillamón J. M. , Mas A. **Acetic Acid Bacteria**. Molecular Wine Microbiology. 2011:227–255.
42. Hornsey I. **Brewing**. Royal Society of Chemistry. Londres. 2013: 111-115.
43. Hough J. S. , Briggs D. E. , Stevens R. , Young T. W. **Malting and Brewing Science: hopped wort and beer**. Springer. EUA. 1982; 389–914.
44. Viikari L. , Korhola, M. **Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis***. Applied Microbiology and Biotechnology. 1986;24:471–476.
45. Chelak B. J. , Ingledew W. M. **Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing – a review**. Journal of the American Society Brewing Chemists. 1987;45:123–127.
46. Lee S. Y. , Madee M. S. , Jangaard N. O. , Horiuchi E. K. **Pectinatus, a New Genus of Bacteria Capable of Growth in Hopped Beer**. Journal of the Institute of Brewing. 1980;86:28–30.
47. Haikara A. , Penttila L. , Enari T. M. , Lounatmaa K. **Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain**. Applied and Environmental Microbiology. 1981;41:511–517.

48. Haikara A. , Enari T.M. , Lounatmaa K. **The genus *Pectinatus*, a new group of anaerobic beer spoilage bacteria.** Proceedings of European Brewing Convention Congress. 1981;6:229–240.
49. Tholozan J. L. , Grivet J. P. , Vallet C. **Metabolic pathway to propionate of *Pectinatus frisingensis*, a strictly anaerobic beer-spoilage bacterium.** Archives of Microbiology. 1994;162:401–408.
50. Lewis M. J. , Young T. W. **Brewing.** Springer. EUA. 2001: 120-143
51. Lee S. Y. **SMMP Medium for Selective Isolation of *Megasphaera* and *Pectinatus*.** Journal of the American Society Brewing Chemists. 1994;52:115–119.
52. Prabhu R. **Acrylate metabolism in *Megasphaera Elsdenii*.** [Tese de mestrado]: Universidade de Mumbai; 2007.
53. Middlekauff J. E. **Handbook of Brewing.** CRC Press. EUA. 1994:480-499.
54. Boulton C. , Quain D. **Brewing Yeast & Fermentation.** Blackwell Science. 2006:510–585.
55. Super Bock Group. **Instrução de Trabalho - IT5002: Limpeza e Desinfecção das Instalações de Dispensing Tara Retornável.** Super Bock Group. 2017.
56. Andrews, W. **Manuals of food quality control.** Food and nutrition Sciences. 1992:1-182.
57. Goldman E. , Green L. **Practical Handbook of Microbiology.** CRC Press. Flórida. 2009: 658-660
58. EBC Analytica. **Microbiology: detection of contaminants.** [20/02/2020] Disponível em <https://brewup.eu/ebc-analytica/category/microbiology/detection-of-contaminants>.
59. Storgårds E. **Process hygiene control in beer production and dispensing.** [Tese de mestrado]: Universidade de Helsínquia; 2000.
60. EBC Analytica. **Sensory Analysis: Description Analysis.** [20/02/2020] Disponível em <https://brewup.eu/ebc-analytica/sensory/sensory-analysis-description-analysis-im/13.10>
61. Madigan M. , Martinko J. , Parker J. **Brock Biology of Microorganisms.** Pearson. Londres. 2003: 1051-1054.

8. Anexos

Anexo 1 – Tabela com a terminologia recomendada pela EBC para descrever sensações de aroma/gosto.

unicer		TERMINOLOGIA RECOMENDADA PELO EBC E ASB PARA DESCREVER IMPRESSÕES DE AROMA/GOSTO					RELATIVO:	FLU009.02
2200	AROMA	0 3	DL	DK	DK	DK	0 = AROMA; T = GOSTO M = IMPRESSÃO NA BOCA W = REQUENTADO; AI = "Amire-gol"	
2200	2200 Aromas Indefinidos							
2300	2300 Especiarias	01W	0310	0700	1000	DOCE		
	2306 Baunilha	01W	0311A caseira / fibrada / úmida	0710 SULFITICO	1010	DOCE	1011A mel	
	2307 Cravo da Índia	01W	0312 A griz de milho	0720 SULFIDRICO	1020		1021 A comida	
	2308 Canela	01T	0313 A ferrea	0711MS	1030		1033 Barifia	
2420	2420 QUIMICO	01T	0320 A MALTE	0722 M excetians	1040		1044 "Primeira"	
	2421 Thalictrum	01T	0330 A MOSTO	0723 A rife	1050		1051 Xerpe	
	2422 Sulfúrico	01T		0724 Lic			1056 Camurata doce	
	2423 Acetáldido	01A	CABANEIZADO, TIBERADO, GRULHADO	0725 Avelha				
	2424 Hidrocarbonetos	01T		0726 Borracha queimada	11		SALGADO	
	2425 Viniz	01T		0727 A carneides				
2440	2440 FRUTOS ESTRANHOS AO PRODUTO	01T	0410 CARAMELO	0729 Cereais	1100		SALGADO	
	2442 M. n. g.	01T	0411M. d. g.	0730 LEGUMES COZIDOS				
	2443 Banana	01T	0412 A. g. g.	0731A. g.				
	2444 Groselheira	01T	0421 Consta de rlo	0732 OMS	12		AMARGO	
	2445 M. d. g.	01T	0422 Consta de rlo	0733 Consta de rlo				
	2446 Pera	01T	0423 A. g. g.	0734 M. llo doce cozido	1200		AMARGO	
	2447 F. r. g. g.	01T		0735 Tomate cozido			1201 Demasiado amargo	
	2448 Marango	01T	050	0736 Cereais cozidos			1202 Insuficiente amargo	
	2449 Amarelo	01T	0500 ENDOCO	0740 LEVEDURA			1203 Duro, áspero	
	2450 Damasco	01T	0501 Avelha	0741A carne			1204 "Amire-gol"	
	2451 Damasco	01T	0502 Baunilha					
	2452 Toranja	01T	0503 A. g. g.	0800 ENVELHECIDA	13		SENSAÇÃO NA BOCA	
	2453 Lima	01T	0504 Clorofila	0810 A. g. g.	1310		ALCALINO	
	2454 Limão	01T	0505 Isoflorano	0810 A. g. g.	1320		"M. OLEUX"	
	2455 Laranja	01T	0506 Medicinal	0820 A. g. g.	1330		METALICO	
2460	2460 FLORES	01T	0600 SABÃO, GOBURA, DIACETILO, OLEO, BANDA	0826 Ombra	1340		ADSTRINGENTE	
	2463 Perfuma	01T	0610 ACIDOS GORROS	0828 A. g. g.	1350		A. P. O.	
2480	2480 FRESCO	01T	0611 Caprino	0829 Solvente saturado	1360		CARBONATAÇÃO	
	2481 R. g. g.	01T	0612 Oalejo	0842 A. g. g.	1370		REQUENTADO	
	2482 C. r. g. g.	01T	0514 Butirico					
2200	2200 RESINA, NOZES, VERDURA, ERVAS		0620 DIACETILO	0900 ACIDO			COBRO	
	2210 RESINA	01T	0630 RANCO	0910 ACETICO	1410		COBRO	
	2211A. g. g.	01T	0631 O. g. g.	0920 A. g. g.				
2220	2220 NOZES	01T	0632 A. g. g.	0920 A. g. g.				
	2221 Noz	01T	0640 A. g. g.	0920 A. g. g.				
	2222 Noz de C. g. g.	01T	0641 O. g. g.	0920 A. g. g.				
	2223 F. g. g.	01T	0642 O. g. g.	0920 A. g. g.				
2230	2230 ERVAS	01T						
	2231 Erva doce / menta / hortelã	01T						
	2232 Tipo g. g.	01T						

Anexo 2 – Tabelas com a terminologia simplificada para descrever as sensações de aroma/gosto.

	Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0111 Especiarias	Tapar / agitar copo Longos 'Sniff'	Spicy Especiarias
	0130 Butirato de etilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Frutos Tropicais Ananás
	0131 Acetato de isoamilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isoamyl acetate Banana
	0132 Hexanoato de etilo	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Ethyl hexanoate Maçã / Anis
	0150 Acetaldeído	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Acetaldehyde Maçã verde / Maçã esmagada / Solvente
	0162 Geraniol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Geraniol Rosas / Flores
	0171 Lúpulo em caldeira	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Kettle hop Lupulagem tardia Especiarias
	0173 Óleo de lúpulo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Hop oil Lúpulo
	0224 Amêndoa	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Almond Massapan / Amêndoas Amargas
	0231 Erva	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Freshly cut grass Relva cortada de fresco Folhas verdes esmagadas
	0310 Grãos	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Grainy Malte 'verde' / Áspero
	0423 Fumado	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Smoky Fumo / Bacon fumado / Carne fumada

	Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0500 Fenólico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Phenolic Especiarias - cravinho Herbal / Alho
	### Bromofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Bromophenol Iodo / Curto Circuito / TV
	0504 Clorofenol	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Chlorophenol Antisséptico / Hospital
	0611 Caprílico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Caprylic Queijo de cabra
	0613 Isovalérico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff'	Isovaleric Lúpulos velhos / Queijo Suor / Chulé
	0614 Butírico	Tapar / agitar copo Longo 'Sniff' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Butyric Vômito de bebé
	0620 Diacetilo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Diacetyl Manteiga rançosa
	0710 Sulfítico	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Sulphitic Dióxido de enxofre Fósforos queimados
	0721 H₂S	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	H ₂ S Ovos podres / Sulfídrico
	0722 Mercaptano	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Mercaptan Esgoto / Lixo / Vegetais podres
	0724 Luz	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Lightstruck Doninha
	0732 DMS	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	DMS Milho cozido / Vegetais cozidos

	Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	0736 Cebola	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Onion Cebola cozida / Tipo alho
	0810 Gato	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Catty Urina gato
	0820 Papel	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Papery Cartão / Oxidado
	830 Couro	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Leathery Couro
	0841 Terra	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Earthy Terra húmida
	0842 Mofo	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Musty - bolores Cave húmida / Mofo
	0910 Acético	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs'	Acetic Vinagre
	0920 Ácido	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Sour - Acre Acidez do limão
	930 Láctico	Tapar / agitar copo Longos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	
	1003 Baunilha	Tapar / agitar copo Curtos 'Sniffs' Tomar 20 - 25 ml, bochechar	Vanilla Leite creme Creme de nata / Gelado
	### Indol	Tapar / agitar copo Longos 'Sniffs'	Indole Fraída de Bebê / Fezes

	Composto	Referências Aroma / Gosto	Termos Associados
	1100 Sal	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Salty Sal
	1310 Alcalino	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Alkaline Detergente alcalino / Cáustico
	1330 Metálico	Tomar 20 - 25 ml e bochechar	Metallic Ferro / Sangue

Anexo 3 – Boletim de análise sensorial / controlo organolético a preencher pelo provador.



Análise Sensorial

ANÁLISE SENSORIAL

Série N°	Amostra N°	Ident.	Avaliação Global	Termo	P	Termo	P	AROMA / GOSTO

AVALIAÇÃO GLOBAL

- +1 Produto de óptima qualidade
- 0 Normal para este tipo de produto
- 1 Com defeitos aceitáveis p/ este tipo de produto
- 2 Com defeitos não aceitáveis p/ este tipo de produto
- 3 Com defeitos tão graves que requerem acção imediata

PESOS

- 1 Ligeiro
- 2 Moderado
- 3 Forte

Assinatura _____
 N° Mecan. _____
 Data _____