



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Estudo microbiológico na produção de Cerveja Artesanal para melhoria da sua qualidade

por

Inês Costa Chaves

Abril de 2023



CATOLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Estudo microbiológico na produção de Cerveja Artesanal para melhoria da sua qualidade

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade
Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Inês Costa Chaves

Supervisora: Doutora Diana Canas

Orientadora: Professora Doutora Paula Teixeira

Abril de 2023

Resumo

A cerveja é considerada uma das bebidas alcoólicas mais antigas produzidas e consumidas no mundo. Atualmente, dependendo do modo de produção, existem dois estilos de indústria, a de cerveja artesanal, e a de cerveja industrial, sendo que, ao longo dos últimos anos, a cerveja industrial tem vindo a perder cota de mercado para a cerveja artesanal.

O processo de produção de **cerveja artesanal** na **Fábrica de Cervejas Portuense** engloba as etapas de Moagem do Malte – Brassagem – Filtração – Ebulição – “Whirlpool” – Arrefecimento – Fermentação – Maturação – Centrifugação – Enchimento. A ausência de uma etapa de filtração esterilizante e/ou pasteurização antes do enchimento, torna este modo de produção mais suscetível a contaminações microbiológicas e conseqüente deterioração. Na fase quente da produção (desde a moagem do malte até ao “Whirlpool”), onde são aplicadas temperaturas elevadas, considera-se que o controlo é assegurado, mas o mesmo não acontece na fase fria (desde o arrefecimento até ao enchimento).

No estágio realizado, além do acompanhamento da produção cervejeira, foram realizadas análises microbiológicas a amostras colhidas de equipamentos e materiais utilizados na fase fria do processo, assim como à cerveja em tanque e à cerveja final, de modo a avaliar a qualidade da cerveja e a identificar potenciais pontos de contaminação. Para tal, foi analisada a presença de *Lactobacillus* e de *Acetobacter*, como bactérias indicadoras de qualidade, e a presença de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como indicadoras de higiene.

Os resultados mostraram que, apesar de existirem cervejas com elevada qualidade microbiológica, algumas apresentavam níveis de contaminação acima do esperado e, que esta contaminação poderia ocorrer em vários pontos do processo.

Palavras-chave: Cerveja Artesanal, Microbiologia, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Enterobacteriaceae*.

Abstract

Beer is considered one of the oldest alcoholic beverages produced and consumed in the world. Currently, depending on production process, there are two styles of industry, craft beer and industrial beer, and over the last few years, industrial beer has been losing market share to craft beer.

The craft beer production process at Fábrica de Cervejas Portuense contains the following steps: Malt Milling – Brassing – Filtration – Boiling – "Whirlpool" – Cooling – Fermentation – Maturation – Centrifugation – Filling. The absence of a sterilizing filtration and/or pasteurization step prior to filling makes this style more susceptible to microbiological contamination and wastage. In the hot phase of production (from the malt milling to the "Whirlpool"), where high temperatures are applied, control is considered to be ensured, but the same is not true in the cold phase (from cooling to filling).

In the internship carried out, in addition to monitoring the brewing production, a microbiological study was performed on the equipment and materials used in the cold phase of the process, as well to the beer in tank and to the final beer, in order to evaluate the quality of the beer and determine points of contamination. For this purpose, it was analyzed the presence of *Lactobacillus* and *Acetobacter*, as quality indicator bacteria, and the presence of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, as hygiene indicators.

The results showed that, despite the existence of high quality beers, some were contaminated and that the contamination could occur at various points in the process.

Keywords: Craft Beer, Microbiology, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Enterobacteriaceae*.

Agradecimentos

Para a realização deste projeto, que me permitirá terminar mais uma etapa da minha vida académica, tive o suporte de algumas pessoas. Desta forma, como reconhecimento de todo o apoio, gostaria de realizar alguns agradecimentos,

À Fábrica de Cervejas Portuense pela oportunidade de realizar um estudo de carácter fundamental numa empresa de prestígio. Gostaria de agradecer a receção amigável a todos os funcionários, por me terem feito sempre sentir “em casa” e, a disponibilidade dos responsáveis pela produção que, me permitiram aprender não só o processo prático de produção numa indústria, mas também o significado de “vestir a camisola”.

À professora Paula Teixeira por ter aceitado acompanhar-me neste tema desafiante e ter suportado a análise realizada, e aos colegas de laboratório na Universidade que sempre estiveram disponíveis para me ensinar e ajudar em tudo.

Aos meus pais, madrinha e avós por todo o apoio, confiança e carinho.

Às minha amigas da Universidade Católica pelos bons momentos proporcionados.

E, ao “Atropelo” por todas as memórias criadas, que deixarão saudades dos tempos académicos.

Índice

Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução	11
1.1 Cerveja	11
1.1.1 Cerveja Artesanal	11
1.2 Apresentação da empresa “Fábrica de Cervejas Portuense”	12
1.2.1 Fluxograma de produção	13
1.2.2 Sistema de desinfeção dos materiais e equipamentos	20
1.2.3 Possíveis pontos de contaminação	24
1.3 Microbiologia da cerveja	28
1.3.1 Bactérias deteriorantes da cerveja	28
1.4 Planeamento do estudo	33
2. Materiais e Métodos	34
2.1 Recolha de amostras	34
2.2 Meios de cultura e isolamento de colónias	34
2.3 Testes de confirmação de colónias	35
2.4 Amostras para identificação por sequenciação do gene 16S rRNA	37
3. Resultados e Discussão	39
4. Conclusões	59
5. Trabalho futuro	60
6. Bibliografia	61
7. Anexos	63
Anexo 1 - Resultados da amostragem de dia 10/05	63
Anexo 2 - Resultados da amostragem de dia 19/05	67
Anexo 3- Resultados da amostragem de dia 25/05	70

Anexo 4 - Resultados da amostragem de dia 31/05	73
Anexo 5 - Resultados da amostragem de dia 07/06	76
Anexo 6 - Resultados da amostragem de dia 15/06	79
Anexo 7 - Resultados da amostragem de dia 17/06	83
Anexo 8 - Resultados da amostragem de dia 24/06	86
Anexo 9 - Resultados da amostragem de dia 30/06	90
Anexo 10 - Resultados da amostragem de dia 06/07	97
Anexo 11 - Resultados da amostragem de dia 07/07	104

Lista de figuras

Figura 1 Produção da cerveja Nortada. Fonte: Nortada.	11
Figura 2 Fluxograma de produção da Cerveja Artesanal Nortada.	13
Figura 3 a) Caldeiras de produção: 1- Caldeira de brassagem; 2- Caldeira de filtração e ebulição. b) Tanques de produção.....	14
Figura 4 Tanques CCT (Tanques Cilíndrico-Cónicos) isotérmicos.....	16
Figura 5 Tanque BBT (“Bright Beer Tanks”).....	17
Figura 6 Enchimento do barril: a) “click” montado, mergulhado em solução de ácido peracético; b) desinfecção do barril; c) enchimento.	19
Figura 7 Disposição de 22 barris numa palete.	19
Figura 8 Esquema de montagem do sistema no tanque para programa CIP – circulação de água e solução de Mida Flow 110.	22
Figura 9 Esquema de montagem do sistema no tanque para limpeza CIP – circulação de solução de Mida Chriox 5.	23
Figura 10 Painel de controlo e interligação.	24
Figura 11 Fase fria do processo de produção da cerveja Nortada - possíveis pontos de contaminação. Trásfega com recurso a a) mangueiras, b) bomba e c) painéis.	24
Figura 12 Porta de um tanque.	25
Figura 13 Centrifugadora.....	25
Figura 14 Agulhas de enchimento: a- copo colocado para realizar a limpeza CIP; b- copo desmontado; c- copo retirado (agulha pronta a uso).	26
Figura 15 Mangueiras auxiliares da produção.	27
Figura 16 Barril de 30 L.	27
Figura 17 Contaminantes microbiológicos expostos às matérias-primas e às etapas de produção de cerveja. Adaptado de Ashtavinayak e Elizabeth (2016).	29
Figura 18 Árvore de decisão para identificação de bactérias aeróbias. Adaptado de Teixeira, 2014.	36
Figura 19 Pontos analisados no interior do barril. (Legenda: 1- interior encaixe; 2- mangueira (interior); 3- peça; 4- fundo centro; 5- fundo lateral).	49
Figura 20 Resultados da eletroforese para deteção de DNA bacteriano em amostras de Lactobacillus (MM - marcador de massa molecular).....	56
Figura 21 Resultados da eletroforese para deteção de DNA bacteriano em amostras de Acetobacter (MM - marcador de massa molecular).	56

Lista de tabelas

Tabela 1 Classificação das cervejas tendo em conta o tipo de fermentação. Adaptado de Breda et al. (2022).	12
Tabela 2 Escolas da cerveja e os seus Estilos. Adaptado de (Super Bock Casa da Cerveja, 2022).	12
Tabela 3 Atividade das enzimas na brassagem (limites de temperaturas de funcionamento e respetivas temperaturas ótimas), e resultado dessa atividade no mosto. Adaptado de Garcia (2019).	15
Tabela 4 Programa CIP (Clean-In-Place).	21
Tabela 5 Bactérias Gram-Positivas e sua deterioração na cerveja. Adaptado de (Guerreiro, 2018; Kordialik-Bogacka, 2022).	30
Tabela 6 Bactérias Gram-Negativas.	32
Tabela 7 Composição da solução para realização de PCR.	38
Tabela 8 Condições dos ciclos de PCR	38
Tabela 9 Diferentes níveis de contaminação e respetiva cor associada.	39
Tabela 10 Resultados microbiológicos do estado dos tanques prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	41
Tabela 11 Resultados microbiológicos do estado das torneiras de amostragem prontas a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	42
Tabela 12 Resultados microbiológicos do estado da centrifugadora pronta a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	43
Tabela 13 Resultados microbiológicos do estado da bomba pronta a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)	44
Tabela 14 Resultados microbiológicos do estado da enchedora pronta a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	45
Tabela 15 Resultados microbiológicos do estado do interior das garrafas vazias antes da lavagem com água em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)	46
Tabela 16 Resultados microbiológicos do estado das caricas prontas a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)	47
Tabela 17 Resultados microbiológicos do estado do click e do tubo do tanque prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	48
Tabela 18 Resultados microbiológicos do estado do interior dos barris prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).	50

Tabela 19 Resultados microbiológicos do estado do tubo na desinfecção com Mida San 318 DR prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)	51
Tabela 20 Resultados microbiológicos do estado do tubo na desinfecção com Mida San 318 DR prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)	52
Tabela 21 Resultados microbiológicos da cerveja em tanque em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).....	53
Tabela 22 Resultados microbiológicos da cerveja em barril em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).....	54
Tabela 23 Resultados microbiológicos da cerveja em garrafa em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado).....	55
Tabela 24 Resultados de sequenciação.....	58

1. Introdução

1.1 Cerveja

A cerveja é uma bebida produzida à base de malte, água, lúpulo e levedura e, é considerada uma das bebidas alcoólicas mais antigas produzidas e consumidas no mundo (Breda et al., 2022). De acordo com a Portaria n.º 1/96 de 3 de Janeiro de 1996, “entende-se por cerveja a bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Sacharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável”.

Na indústria cervejeira temos dois tipos de indústria, a de cerveja artesanal, e a de cerveja industrial. Ao longo dos últimos anos, a cerveja industrial tem vindo a perder cota de mercado para a cerveja artesanal (Nabiça, 2019).

1.1.1 Cerveja Artesanal

O termo cervejaria artesanal, em geral, aplica-se a pequenas empresas, normalmente independentes e que utilizam processos tradicionais, que enfatizam a qualidade, sabor e diversidade, em detrimento da produção em larga escala (López et al., 2020). Deste modo, o uso de matérias-primas de elevada qualidade, o tempo necessário de produção e a menor quantidade produzida, implicam que o seu preço seja superior ao da cerveja industrial (Nabiça, 2019).



Figura 1 Produção da cerveja Nortada. Fonte: Nortada.

A cerveja artesanal é caracterizada pela ausência de pasteurização e filtração esterilizante (Breda et al., 2022; Nabiça, 2019). Resulta numa ampla gama de estilos, devido à combinação complexa de diferentes tipos e variedades de ingredientes convencionais da cerveja (água, malte, lúpulo e levedura) com (ou sem) novos ingredientes (frutas, especiarias, ervas, etc.), em diferentes proporções e combinações, utilizando técnicas tradicionais e novas de

fabricação de cerveja. Tendo em conta o tipo de fermentação, a cerveja subdivide-se em dois principais grandes grupos, Ale e Lager (*Tabela 1*).

Tabela 1 *Classificação das cervejas tendo em conta o tipo de fermentação. Adaptado de Breda et al. (2022).*

Definição	Ale	Lager
Tipo de fermentação	Fermentação Alta	Fermentação Baixa
Levedura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
Temperatura	15-25 °C	5-10 °C

Além disso, existem ainda imensos estilos, tendo em conta o seu país de origem (Harrison e Jr., 2017). Dependendo do local, as características das matérias-primas utilizadas (principalmente da água e do malte) variam, alterando as características da cerveja final. Deste modo, existem quatro escolas, a Americana, a Alemã, a Belga e a Inglesa (*Tabela 2*).

Tabela 2 *Escolas da cerveja e os seus Estilos. Adaptado de (Super Bock Casa da Cerveja, 2022).*

Escola	Estilo
Alemã	Amber Ale; Amber Lager; Bock; Dark Lager; Pale Ale; Pale Lager; Pilsner; Wheat Beer
Belga	Amber Ale; Pale Ale; Strong Ale; Wheat Beer
Inglesa	Amber Ale; Brown Ale; Pale Ale; Porter; Strong Ale
Americana	Amber Ale; IPA; Pale Lager; Strong Ale

1.2 Apresentação da empresa “Fábrica de Cervejas Portuense”

A Fábrica de Cervejas Portuense localiza-se na cidade do Porto, onde produz a sua marca de cerveja artesanal, Cerveja Nortada. O projeto, iniciado em 2016, pretende acrescentar valor ao mercado cervejeiro português, com a produção e distribuição de uma cerveja regional e de qualidade superior. Atualmente, são produzidos mais de 500 mil litros/ano de cerveja e, na busca pela máxima qualidade, a empresa aposta no “Know-How” e experiência de equipa, equipamentos de excelência, utilização das melhores matérias-primas e controlo de qualidade rigoroso. Produz sete cervejas clássicas (icónicas), disponíveis no mercado ao longo de todo o ano, e ainda cervejas temporais, disponíveis em certas datas ou épocas festivas (Fábrica de Cervejas Portuense, 2022; Cerveja Nortada, 2022). Produz ainda para outras empresas cervejeiras, as denominadas “cervejas gipsy”.

Na unidade de produção, a cerveja “Lager” (escola Alemã), uma cerveja artesanal 100% malte, sem adição de adjuntos como milho ou trigo, e que tem um tempo de maturação de 3 semanas, é a mais produzida. O seu amargor e aroma são definidos pelo uso dos lúpulos, do tipo Perle e Mitterlfruth, respetivamente, que são adicionados no início da ebulição. É uma cerveja com 5% de teor alcoólico, com um IBU (International Bitterness Units - define o amargor da cerveja) de 18 e uma quantidade de CO₂ entre os 4.8 - 5 g/L.

1.2.1 Fluxograma de produção

O processo de produção de cerveja artesanal, descrito no fluxograma da *Figura 2*, realiza-se entre 3 pisos. O processo engloba as etapas de **Moagem do Malte – Brassagem – Filtração – Ebulição – “Whirlpool” – Arrefecimento – Fermentação – Maturação – Centrifugação – Enchimento**.

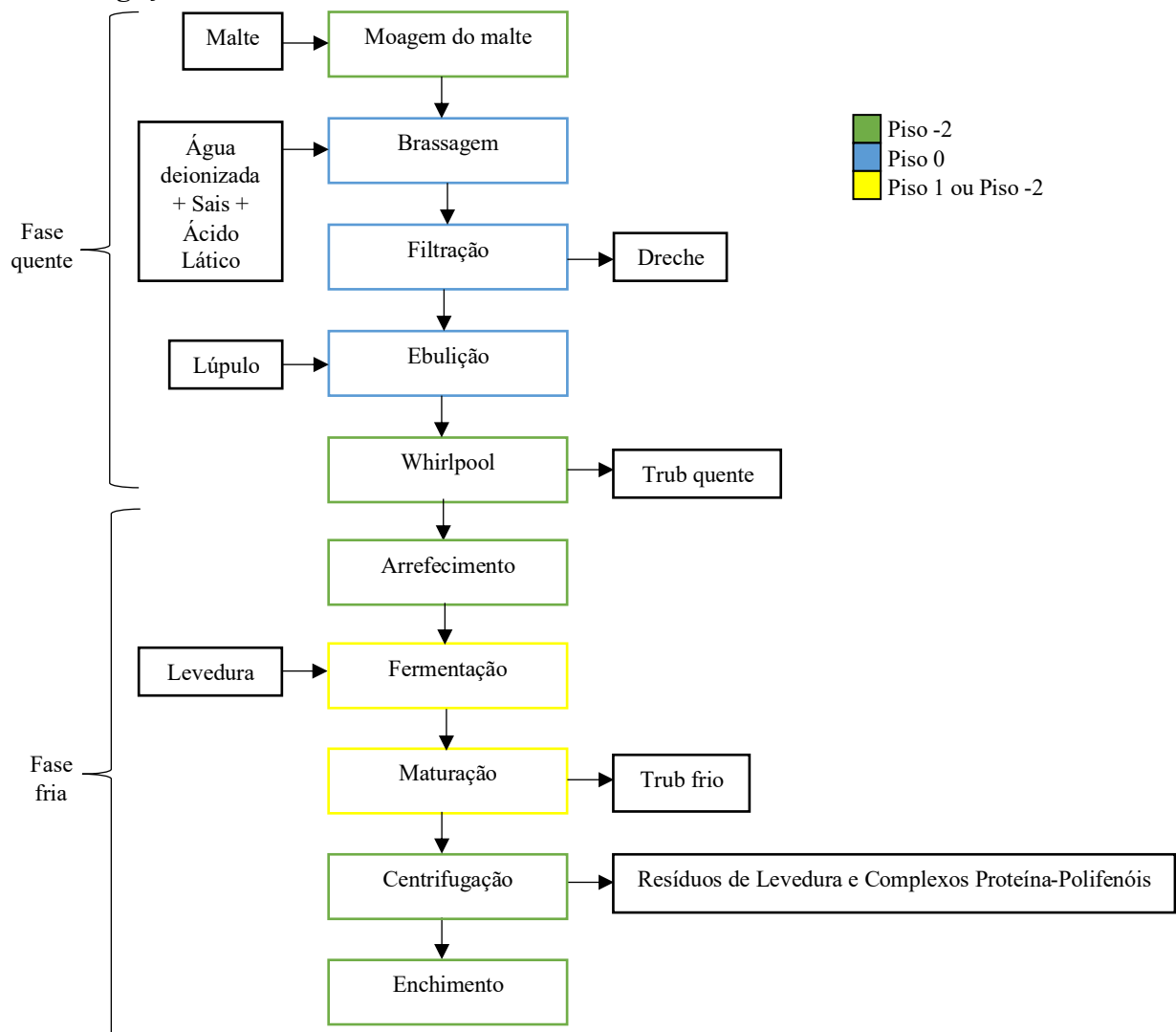


Figura 2 Fluxograma de produção da Cerveja Artesanal Nortada.

A etapa de Brassagem e Ebulição ocorrem na mesma caldeira - “mash-in tank” - (Figura 3 a – caldeira 1) e a etapa de Fermentação e Maturação ocorrem no mesmo tanque (Figura 3 b).



Figura 3 a) Caldeiras de produção: 1- Caldeira de brassagem; 2- Caldeira de filtração e ebulição. b) Tanques de produção.

Moagem do malte: São pesados e moídos os diferentes cereais maltados essenciais para o estilo de cerveja pretendido, mantendo a casca intacta (fundamental à etapa de filtração).

Brassagem: Os cereais moídos são transferidos para a caldeira “mash-in tank” (Figura 3a - caldeira 1), onde são misturados com água desmineralizada (obtida através do processo de osmose inversa), e se adiciona quantidades específicas de sais (Sulfato de Cálcio, Sulfato de Magnésio, Cloreto de Cálcio, Bicarbonato de Sódio e, em algumas produções, Carbonato de Cálcio), tendo em conta os parâmetros da água do país de origem da cerveja que se pretende produzir. Deste modo, e tendo em conta que a água é o principal componente da cerveja (correspondendo a cerca de 93%) (de Souza Campos Neto et al., 2017), consegue-se controlar as características do produto final, e garantir a maior qualidade na cerveja produzida.

Nesta etapa, os valores de pH e de temperatura são importantes para que as enzimas essenciais, provenientes do malte, degradem o amido, β -glucanos, pentosanos, lípidos e

proteínas (Garcia, 2019). Para tal, além de serem realizadas análises ao pH do mosto que, com o auxílio de ácido láctico, é ajustado para valores entre 5,3 e 5,4, realiza-se o aumento da temperatura do mesmo, por patamares, de modo a atingir a atividade máxima das diferentes enzimas. Na *Tabela 3* estão apresentadas as enzimas mais importantes, respetivas temperaturas ótimas, a sua atividade e resultado das mesmas no mosto.

Tabela 3 Atividade das enzimas na brassagem (limites de temperaturas de funcionamento e respetivas temperaturas ótimas), e resultado dessa atividade no mosto. Adaptado de Garcia (2019).

Enzimas	Temperaturas	Função/Atividade	Resultado da atividade
Fitase	30-53 °C (35 °C)	Hidrolisa o ácido fítico para fosfato inorgânico que, se liga ao cálcio e magnésio do mosto	Reduz o pH
β -glucanase	35-55 °C (45 °C)	Degradação dos β -glucanos	Evita viscosidade e turvação
Peptidase	45-53 °C (50 °C)	Hidrolisa proteínas em cadeias polipeptídicas	Reduz a turvação, e promove a estabilidade da espuma da cerveja
Protease	50-59 °C (58 °C)	Hidrolisa cadeias polipeptídicas em aminoácidos livres	
β -amilase	54-66 °C (63 °C)	Hidrólise do amido	Converte o amido em açúcares
α -amilase	66-71 °C (70 °C)		

Filtração: Após a brassagem, é realizada a trasfega do mosto para outra caldeira, denominada “lautering tank” (Figura 3a - caldeira 2), com fendas na sua superfície inferior, onde ocorre a filtração (a dreche fica retida na caldeira). O mosto obtido ao longo da filtração retorna à caldeira onde foi realizada a brassagem (“mash-in tank”), para se realizar a ebulição e, a dreche resultante é lavada com água quente, para extração do açúcar ainda contido. Esta “água de lavagem” é utilizada para correção do Grau Plato (° Plato) desejado no mosto.

O “° Plato” (unidade de medida de gravidade específica utilizada no setor cervejeiro), representa a concentração de sacarose, em massa, numa solução de água, constituindo, assim, uma aproximação da concentração mássica de açúcares no mosto (Rocha, 2015).

Inicialmente, a água de lavagem é muito rica em açúcares, possibilitando um acréscimo do ° Plato do mosto e, posteriormente, mais diluída, pode também ser adicionada para redução do ° Plato.

Finalizada a etapa de filtração, a dreche é armazenada em sacos, que seguem para alimentação animal.

Ebulição: O mosto é elevado à temperatura de ebulição. É-lhe adicionado certas quantidades de uma ou mais variedades de lúpulo, em um ou mais momentos distintos (num máximo de 3), tendo em conta a intensidade do amargor e dos aromas pretendidos na cerveja final. Os lúpulos de amargor, ricos em α -ácidos (compostos que quando isomerizados conferem amargor à cerveja), são adicionados no início da ebulição. Os lúpulos de aroma (conferem aroma e sabor à cerveja) são normalmente adicionados no final ou após a ebulição. Existem variedades de lúpulo capazes de ser utilizadas para os dois fins (Correia, 2019).

Nesta etapa, por evaporação, são eliminadas substâncias aromáticas não desejáveis (“off-flavours”).

Whirlpool: Após a ebulição, o mosto desce para o Whirlpool, localizado no piso inferior. Neste equipamento, através de força centrípeta, o trub quente - complexos proteico-polifenóis e outros resíduos indesejados - acumulam-se no centro do tanque, possibilitando assim a sua remoção do mosto, clarificando-o e estabilizando-o.

Arrefecimento: Na trasfega para o tanque de fermentação, o mosto é arrefecido através de um permutador de placas.

Fermentação: Ocorre, geralmente, em Tanques Cilíndrico-Cónicos (CCT) isotérmicos (*Figura 4*). Dependendo do volume de produção de cerveja pretendido, pode-se utilizar tanques de 1500 L ou de 6000 L. As leveduras adicionadas e as temperaturas de fermentação dependem da cerveja pretendida (Ale ou Lager).



Figura 4 Tanques CCT (Tanques Cilíndrico-Cónicos) isotérmicos.

É nesta etapa que os açúcares são convertidos em etanol e CO₂ pelo que, o ° Plato da cerveja é registado, diariamente, de modo a acompanhar a evolução da fermentação. Quando o valor se repete por 2 dias consecutivos (no caso de cervejas “gipsy” é 3 dias), por choque térmico (0 °C) e fecho da válvula de arejamento, conclui-se a fase da fermentação, iniciando-se, assim, a fase de maturação. Neste dia, agenda-se as purgas do tanque e o enchimento.

Maturação: Com o choque térmico, promove-se a sedimentação das leveduras e complexos proteico-polifenóis em suspensão (Trub-frio). Quando terminada, é realizada uma purga, ou seja, é retirada toda a matéria sedimentada, através do tubo baixo (os tanques têm inseridos na sua base 2 tubos, o do lado direito, que está inserido dentro do tanque até cerca de 1 metro - tubo alto - e o do lado esquerdo, que faz a ligação do fundo do tanque para o exterior - tubo baixo), com o auxílio de um balde de 25 L, que permite contabilizar a quantidade retirada, para posteriores cálculos de rendimento.

Centrifugação: Quando terminada a fase de maturação, é efetuada uma centrifugação que permitirá eliminar os complexos proteico-polifenóis formados e resíduos de levedura, clarificando a cerveja. Conforme a centrifugação vai avançando, a cerveja é transferida para um tanque limpo (BBT – “Bright Beer Tank” (*Figura 5*), ou CCT, caso os BBT não estejam disponíveis), onde é armazenada, até que se realize o enchimento.



Figura 5 Tanque BBT (“Bright Beer Tanks”).

Enchimento e Rotulagem: O enchimento é normalmente realizado com enchedora isobarométrica para garrafas de 33 cl e, com uma válvula de enchimento para barris de 20 e 30 L.

Antes do enchimento, tem de se verificar 2 parâmetros:

- A pressão do tanque – Deve estar a 3 bar. A leitura é realizada por barómetro existente na estrutura do próprio reservatório. **Caso esteja inferior**, procede-se à adição de azoto (N₂). **Caso esteja superior**, tem de se aliviar a válvula de pressão do tanque.

- O nível de CO₂ contido na cerveja – Deve estar entre os 4.8 e 5.0 g/L. A leitura é realizada com o auxílio do equipamento CarboQC (permite também verificar os níveis de O₂ contidos na cerveja). **Caso esteja inferior**, tem de se adicionar CO₂. **Caso esteja superior**, é injetado N₂ na cerveja e é aberta a válvula de pressão, promovendo a saída do CO₂ excedentário.

A verificação destes parâmetros deve ser realizada com antecedência, pois caso se adicione um gás, é necessário verificar o(s) parâmetro(s) 30 minutos depois (de forma a permitir a cerveja estabilizar). Se os valores ainda não estiverem dentro do que é pretendido, o processo repete-se.

A partir deste momento, o processo difere dependendo de se tratar de enchimento de barril ou garrafa.

No caso dos barris, tem de se desinfetar o aparelho que auxilia o enchimento (“click” - *Figura 6*), que é, então, desmontado e submerso em solução de ácido peracético 1 %, durante 30 min. Após os 30 minutos, o “click” é montado e é deixado na solução, enquanto a preparação para o enchimento não está concluída. Os rótulos são devidamente preenchidos e colados no barril e, é aplicada uma solução de ácido peracético 1% na zona de encaixe do “click”, deixando-a atuar por 15 minutos. O enchimento é realizado através da válvula contida no “click”, que permite a saída do gás contido no barril estéril, e conseqüente entrada da cerveja. No fim, quando retirado o “click”, aplica-se novamente a solução de ácido peracético 1%, não só para retirar vestígios de cerveja, mas também para garantir que não exista crescimento microbiológico nessa zona e, é colocada uma tampa.

O “click” é novamente mergulhado na solução desinfetante entre o enchimento de cada barril e, no final do processo de enchimento passa-se água quente para retirar resíduos de cerveja.

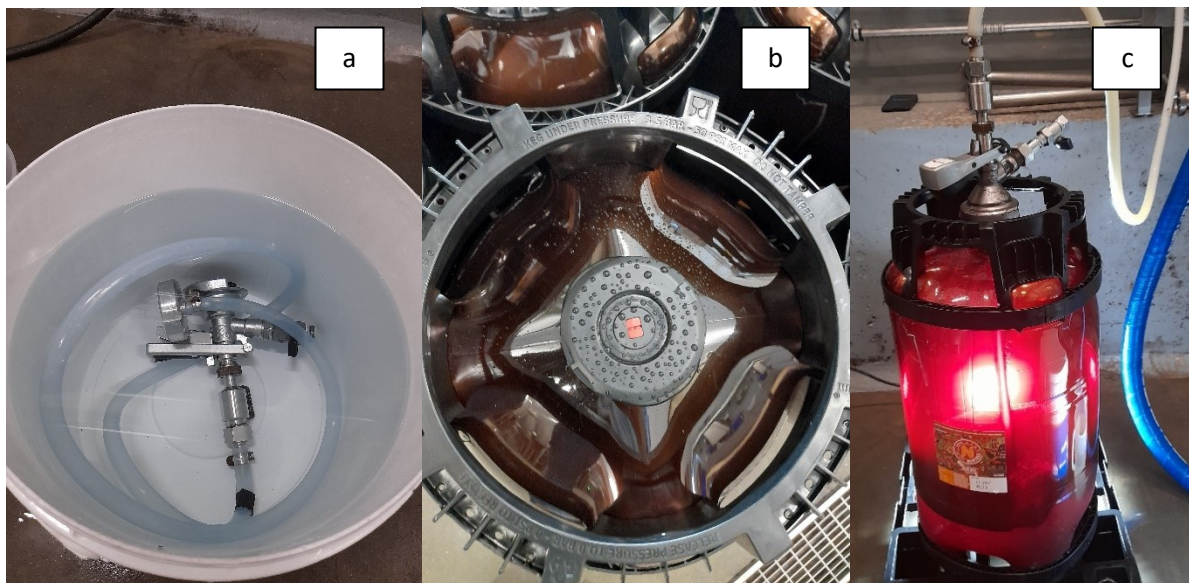


Figura 6 Enchimento do barril: a) “click” montado, mergulhado em solução de ácido peracético; b) desinfecção do barril; c) enchimento.

Os barris mais utilizados são os de 30 L e, quando cheios, são dispostos numa palete de acordo com a *Figura 7*.

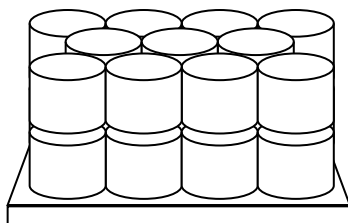


Figura 7 Disposição de 22 barris numa palete.

No caso das garrafas, o processo já é mais automático, devido ao uso de um sistema de enchimento que, coloca o rótulo na garrafa, lava-a com água, enche com cerveja (a cerveja é transferida do tanque para um tambor dentro do equipamento que, consegue encher 8 garrafas em simultâneo) e coloca a carga. Ao longo deste processo, os técnicos de produção, colocam as garrafas e as cargas no equipamento, verificam se todo o processo está a funcionar devidamente e, na fase final, retiram as garrafas para “uma boxe” que carrega 1008 unidades de 33 cl.

No controlo de qualidade dos níveis de CO₂ e O₂ da cerveja na garrafa, é utilizado o equipamento PFD Filling Device, que perfura a carga da garrafa e, permite a transferência direta da cerveja para o CarboQC. Além disso, é possível analisar o álcool e o extrato (açúcares), para verificar se se encontra dentro dos parâmetros esperados teoricamente.

A capacidade de cada ciclo produtivo é de 1500 L, e demora, em média, 8 horas desde a moagem até à entrada no tanque (quando o mosto é trasfegado para o tanque de fermentação, pode dar-se início a uma nova produção). Devido à existência de dois turnos de trabalho no departamento de produção, é possível realizar-se duas produções diárias.

1.2.2 Sistema de desinfeção dos materiais e equipamentos

No fluxograma de produção de **cerveja industrial**, incluem-se as etapas apresentadas, acrescentando a **filtração estéril** e a **pasteurização** antes do enchimento. A ausência destas etapas na produção de **cerveja artesanal**, torna esta cerveja mais suscetível a contaminações microbiológicas e a deterioração. Na fase quente da produção, onde são aplicadas temperaturas elevadas, considera-se que o controlo é assegurado, mas o mesmo não acontece na fase fria. Assim, é essencial um correto manuseamento do produto e dos equipamentos, garantindo um risco de contaminações mínimo.

De forma a diminuir o risco de contaminação nos equipamentos, é utilizado o sistema de limpeza CIP (Clean-In-Place – *Tabela 4*).

Tabela 4 Programa CIP (Clean-In-Place).

Programa CIP	Detergente	Ação	Concentração	Temperatura (°C)	Tempo de Contacto	Periodicidade
CCT e BBT	água	enxaguamento para limpeza dos resíduos maiores e diminuir a sujidade na soda		ambiente	até a água sair limpa, até assegurar que a linha está bem montada e a bomba a funcionar corretamente	assim que estiver vazio
	Mida Flow 110	alcalina (soda)- limpa matéria orgânica	33 mz com a bomba a recircular a 85 %	80	30 min	
	água	tirar os resíduos de soda e neutralizar o pH		ambiente	até o pH neutralizar	
	Mida Chriox 5	ácida- limpa matéria inorgânica, inclusive os cristais da soda	1 % *	ambiente	20 min	antes de cada utilização
SPX	água	enxaguamento, confirmação da correta ligação da linha e ajuste dos parâmetros do equipamento		ambiente	até a água sair limpa	antes e depois de cada utilização
	Mida Flow 110 (55 mz)	alcalina (soda)- limpa matéria orgânica	33 mz com a bomba a recircular a 85 %	80	20 min	
	água	tirar os resíduos de soda e neutralizar o pH		ambiente	até o pH neutralizar	
Enchedora	Mida Flow 110	alcalina (soda)- limpa matéria orgânica	33 mz com a bomba a recircular a 85 %	80	20 min	antes de cada utilização
	água	tirar os resíduos de soda e neutralizar o pH	torneira da água não completamente aberta para reduzir pressão até 2 bar	ambiente	até o pH neutralizar	
	água	lavar resíduos da cerveja	torneira da água não completamente aberta para reduzir pressão até 2 bar	ambiente	até enchedora estar livre de cerveja	depois de cada utilização

NOTA	Retirar vedantes e vedante porta	só colocar os vedantes das conexões quando necessário
*	CCT60	2500 mL em 250 L de água (pelo nível do tubo alto)
	CCT15	1000 mL em 100 L de água (pelo nível do tubo alto)

Normalmente, na limpeza dos equipamentos, a **soda** entra e sai do sistema pelo mesmo percurso que a cerveja realiza durante a produção, mas nos tanques, de modo a entrar em contacto com todos os pontos, é montado um sistema, como esquematizado na *Figura 8*. De modo a facilitar a limpeza de matéria orgânica, uma vez que a mesma pode não ser aplicada logo após o tanque se encontrar livre, normalmente, efetua-se uma limpeza com água. Quando possível, o sistema é montado e permite que a **soda** entre pelo tubo de arejamento, seja distribuída no interior do tanque, saia pelo tubo baixo e, em simultâneo, saia pela válvula de pressão e entre pelo tubo alto.

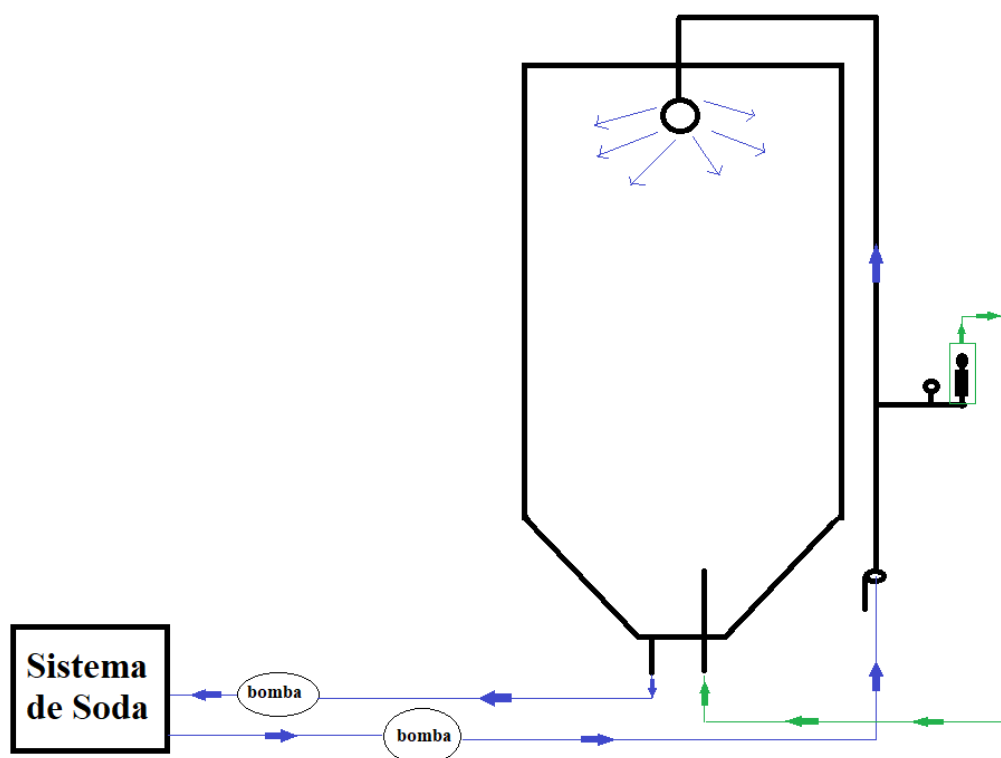


Figura 8 Esquema de montagem do sistema no tanque para programa CIP – circulação de água e solução de Mida Flow 110.

Posteriormente, passa-se água para retirar cristais residuais e neutralizar o pH. A limpeza ácida só se aplica antes da nova utilização do tanque. Nesta limpeza, a solução de Mida Chriox 5 e a água são inseridas pela porta e a recirculação ocorre como representado na *Figura 9*.

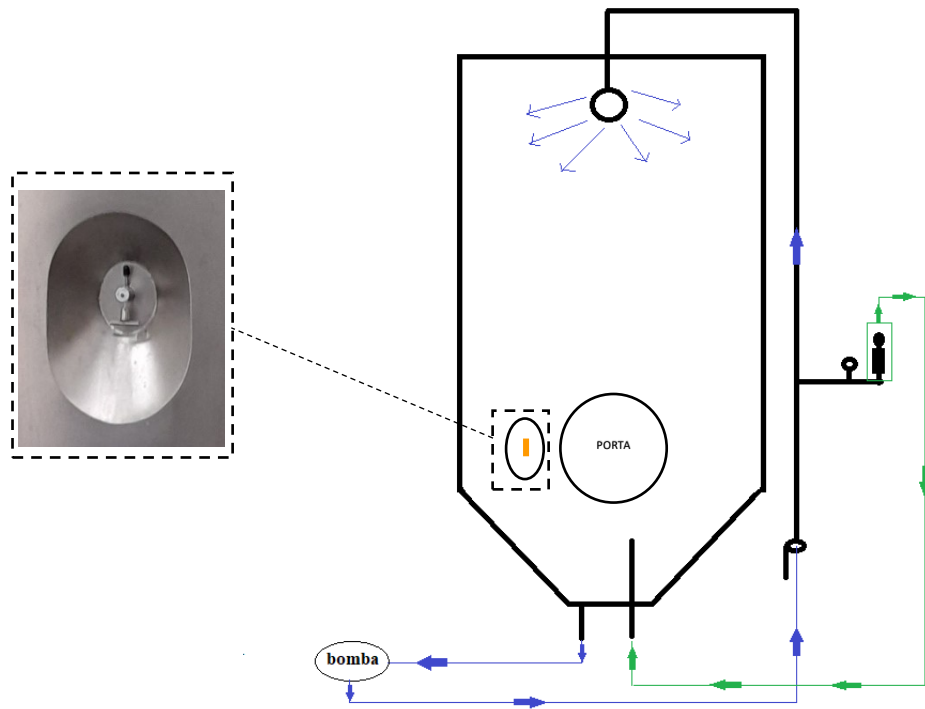


Figura 9 Esquema de montagem do sistema no tanque para limpeza CIP – circulação de solução de Mida Chriox 5.

Além da limpeza e desinfecção realizadas antes da utilização de cada tanque, são necessários cuidados durante o seu uso. A torneira de amostragem (representada a laranja na *Figura 9*), antes de cada utilização, é desinfetada com Mida San 318 DR, e é rejeitada a primeira cerveja que sai, de modo a limpar o desinfetante presente. Após se retirar a amostra, a torneira é preenchida com o desinfetante e são colocadas as tampas nas duas aberturas.

O tubo alto e o tubo baixo são também desinfetados antes de cada utilização com Mida San 318 DR, durante cerca de 15 minutos. Caso após a utilização fiquem vestígios de cerveja na entrada do tubo, os mesmos são retirados com água e efetua-se novamente a desinfecção do tubo.

Em relação às mangueiras e tubagens fixas (tubagens que permitem a trasfega de mosto e cerveja de uma zona para outra – incluindo “inter-pisos” -, com recurso a painéis de controlo

e interligação (*Figura 10*)), a sua limpeza e desinfeção é realizada em consequência da circulação da solução higienizante utilizada na desinfeção CIP de equipamentos.

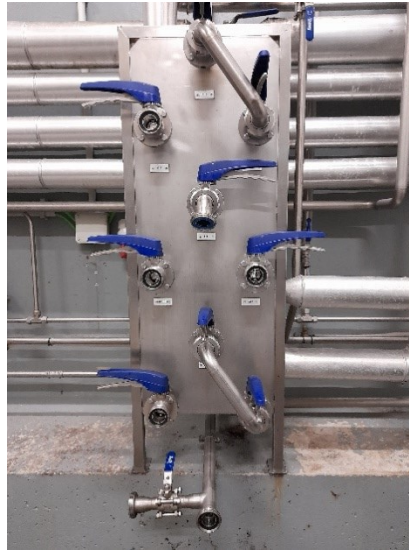


Figura 10 Painel de controlo e interligação.

Os vedantes de encaixe de tubos e equipamentos e outros materiais, como ferramentas, são mergulhados numa solução com detergente (Mida Foam 193).

Possíveis falhas no procedimento de limpeza, podem comprometer a qualidade da cerveja, uma vez que aumentam o risco de contaminação microbiológica.

1.2.3 Possíveis pontos de contaminação

Conforme anteriormente referido, os pontos críticos em termos de risco de contaminação pertencem à fase fria do processo de produção (*Figura 11*). Estes englobam equipamentos como, tanques (CCT e BBT), centrifugadora, enchedora, bomba, painéis de interligação, além de mangueiras, barris, garrafas e cápsulas.

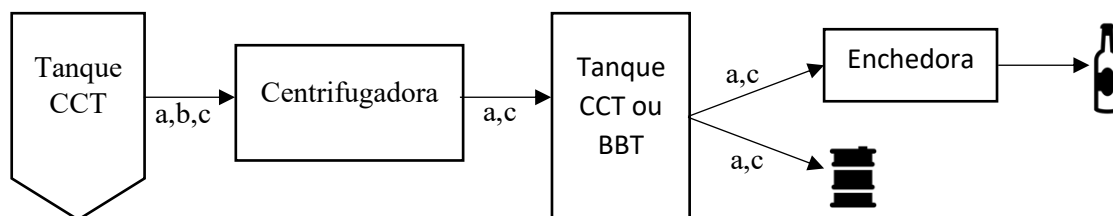


Figura 11 Fase fria do processo de produção da cerveja Nortada - possíveis pontos de contaminação. Trásfega com recurso a a) mangueiras, b) bomba e c) painéis.

Nos **tanques**, a limpeza CIP é realizada com recurso a um dispersor situado no topo do tanque, que gira e pulveriza a solução (nos tanques do piso 1 o dispersor não gira).

Este dispositivo permite uma distribuição homogénea das soluções de limpeza ao longo das paredes e fundo do reservatório. Há, no entanto, zonas “críticas” em que, com este método, não conseguimos assegurar uma completa higienização, tais como o topo do tanque e a parte inferior da zona da porta que, devido a estar mais interna em relação à parede do tanque, torna-se numa zona de difícil exposição aos higienizantes (*Figura 12*). Além disso, a borracha em torno da porta (vedante), e as torneiras de extração, também poderão ser pontos de contaminação se a desinfeção, antes de cada utilização, não for devidamente realizada.



Figura 12 Porta de um tanque.

A **centrifugadora** (*Figura 13*) é um equipamento constituído por muitas peças e, uma vez que não é passível de ser desmontada para limpeza e desinfeção pormenorizada, poderão ficar zonas com resíduos de uma anterior produção, que poderão constituir fonte de contaminação para produções seguintes.



Figura 13 Centrifugadora.

As **bombas** são utilizadas para trasfegas de cerveja e limpezas CIP de tanques. A limpeza CIP das bombas é realizada quando se faz a limpeza nos tanques. Tal como a centrífugadora, dado não serem alvo de desmontagem para limpeza e desinfecção, podem conter pontos críticos de contaminação no seu interior.

No caso da **enchedora**, poderão existir muitos pontos de contaminação - na lavagem das garrafas que é realizada apenas com água, no enchimento que é realizado com recurso a uma “agulha” que entra na garrafa (*Figura 14*) e, nas caricas, que não têm qualquer tipo de tratamento antes da sua colocação.

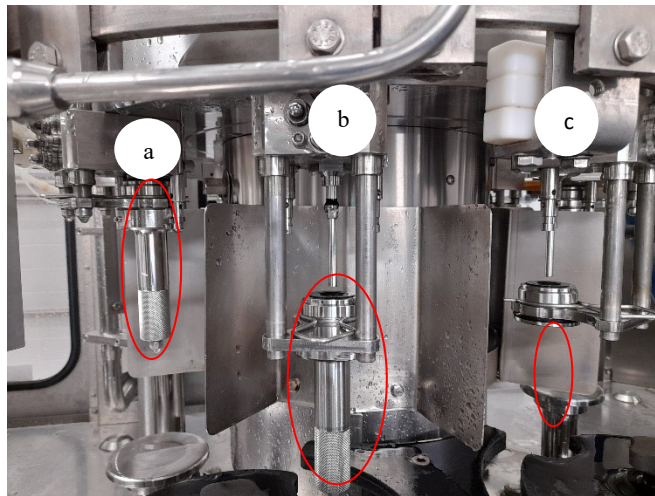


Figura 14 Agulhas de enchimento: a- copo colocado para realizar a limpeza CIP; b- copo desmontado; c- copo retirado (agulha pronta a uso).

As **tubagens** têm muitos pontos de curvatura pelo que, o programa de desinfecção pode não ser suficiente para garantir a segurança microbiológica.

As **mangueiras** (*Figura 15*) permitem a ligação não só entre equipamentos, mas também entre painéis e equipamentos. A sua utilização passa por vários lotes de produção, pelo que se um lote estiver contaminado e a sua desinfecção não for eficaz, poderá contaminar outros lotes.



Figura 15 Mangueiras auxiliares da produção.

Os **barris** (*Figura 16*) adquiridos vêm preenchidos com CO₂, sendo que durante o enchimento, o gás é substituído pela cerveja. Considera-se que a sua assepsia é assegurada, pelo que não é realizado qualquer tipo de desinfecção no seu interior.



Figura 16 Barril de 30 L.

No caso da desinfecção de **vedantes** recorre-se a detergente (Mida Foam) e, no caso das entradas onde encaixam as mangueiras, com uma solução de Mida San 318 DR.

O correto manuseamento destes equipamentos e uma desinfecção eficaz são fundamentais para a eliminação de microrganismos indicadores das condições de higiene e microrganismos que afetam a qualidade da cerveja.

1.3 Microbiologia da cerveja

Durante séculos a cerveja foi reconhecida como uma bebida microbiologicamente estável, devido a fatores como, a presença de etanol, a presença de compostos do lúpulo com características conservantes, a elevada concentração de CO₂ e a reduzida concentração de O₂. No entanto, muitos microrganismos são resistentes a essas condições e, a sua presença pode causar alterações na cerveja (Dragone et al., 2008). Entende-se por contaminante qualquer organismo, que não foi deliberadamente introduzido e, que sobrevive e reproduz-se nesse ambiente (Guerreiro, 2018).

As cervejas de referência produzidas na Fábrica de Cervejas Portuense, em geral, têm um teor alcoólico superior a 5%, um pH entre 4 e 5, cerca de 2° Plato em açúcares residuais, além da presença de CO₂ e componentes amargos do lúpulo.

1.3.1 Bactérias deteriorantes da cerveja

As contaminações microbiológicas podem ocorrer nas diferentes etapas do processo, incluindo a adição de matérias-primas contaminadas. Na *Figura 17* são identificadas as possíveis contaminações bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas) nas diversas etapas do processo.

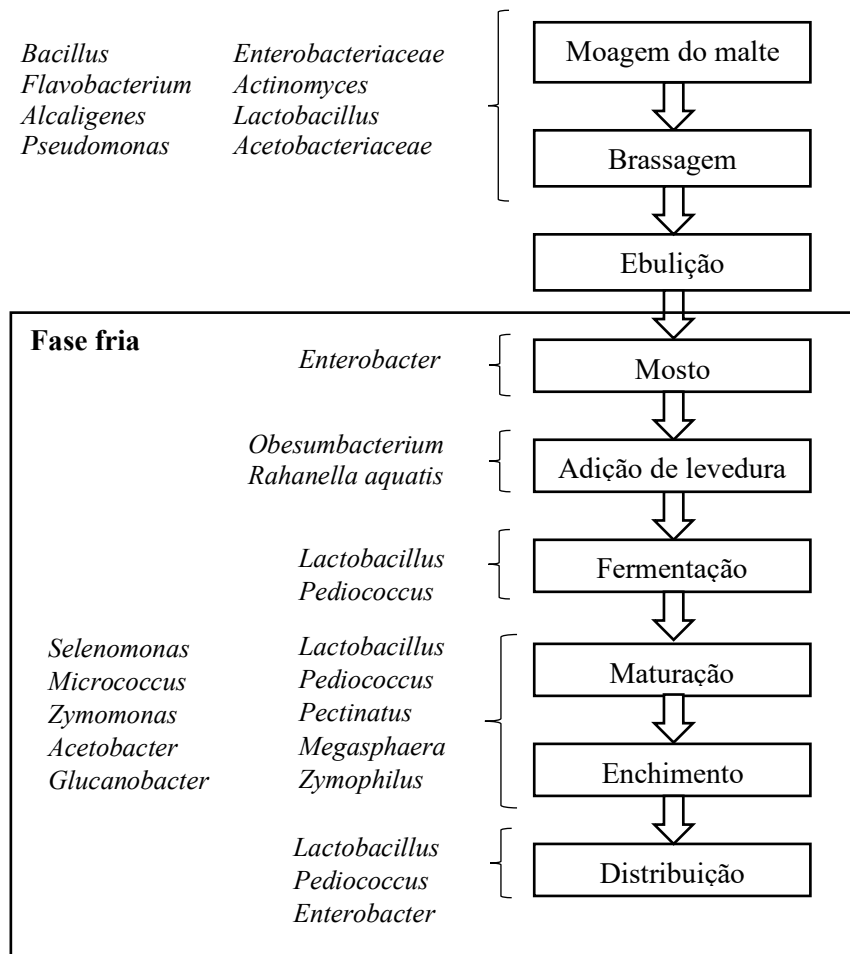


Figura 17 Contaminantes microbiológicos expostos às matérias-primas e às etapas de produção de cerveja. Adaptado de Ashtavinayak e Elizabeth (2016).

Bactérias Gram-positivas

Na Tabela 5 estão apresentadas as principais bactérias Gram-Positivas que provocam deterioração na qualidade da cerveja.

Segundo (Dragone et al., 2008), cerca de 70% das contaminações da cerveja são causadas por bactérias ácido láticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Tabela 5 Bactérias Gram-Positivas e sua deterioração na cerveja. Adaptado de (Guerreiro, 2018; Kordialik-Bogacka, 2022).

Espécies Relevantes	Deterioração	Observações
<i>Bacillus cereus</i>	"Off-flavour" ácido provocado pela produção de ácido láctico	Produção de endósporos que podem sobreviver à ebulição do mosto
<i>Bacillus coagulans</i>		
<i>Levilactobacillus Brevis</i>		
<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	"Off-flavour" ácido provocado pela produção de ácido láctico	
<i>Lactocaseibacillus</i>		
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Sabor "amanteigado" devido à produção de acetil	
<i>Lactobacillus curvatus</i>		
<i>Lactobacillus lindneri</i>	Turbidez "sedosa"	
<i>Lactobacillus malefermentans</i>		
<i>Lentilactobacillus parabuchneri</i>		
<i>Secundilactoobacillus collinoides</i>		
<i>Secundilactoobacillus paracollinoides</i>		
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>		
<i>Pediococcus damnosus</i>	Sabor ácido devido à produção de acetil	
<i>Pediococcus dextrinicus</i>		
<i>Pediococcus inopinatus</i>		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Aroma típico frutados	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		

Das bactérias produtoras de ácido láctico, as espécies contaminantes da cerveja mais comuns são *Levilactobacillus brevis* e *Fructilactobacillus lindneri*.

A espécie *L. brevis* é a mais comum na cerveja. É tolerante ao lúpulo, cresce a um pH entre os 4 e os 5 e a uma temperatura entre os 15 e os 45 °C, com uma temperatura ótima de crescimento aos 30 °C. É um microrganismo heterofermentativo obrigatório e anaeróbio facultativo (Dragone et al., 2008; Kordialik-Bogacka, 2022).

A espécie *L. lindneri* é a segunda mais comum em contaminações de cerveja. O seu crescimento ótimo ocorre acima dos 30 °C, a um pH entre os 4.6 e os 5.2. Tem uma elevada tolerância ao lúpulo (45 IBU) e suporta concentrações de etanol superiores a 7%, sendo muito tolerante ao tratamento térmico. É um microrganismo microaerófilo e, tal como a espécie *L. brevis*, é heterofermentativo (Kordialik-Bogacka, 2022).

No género *Pediococcus*, a espécie contaminante mais comum é *Pediococcus damnosus*, uma bactéria microaerófila e homofermentativa. Cresce a um pH de 5,5 e a uma temperatura entre os 8 e 30 °C, atingindo o seu crescimento ótimo no intervalo entre os 22 e 25 °C (Kordialik-Bogacka, 2022).

A espécie *Bacillus cereus*, bactéria formadora de endósporos, é responsável por provocar graves infecções clínicas (Abel-Santos, 2015; Guerreiro, 2018). É uma bactéria anaeróbica facultativa, que consegue crescer num intervalo de temperaturas entre os 8 e 55 °C. Não tolera meios ácidos, desenvolvendo-se em valores de pH entre 5 e 9,2. Os endósporos produzidos são resistentes ao calor, radiação e desinfecção (Parihar, 2014; ASAE, 2022).

Bacillus coagulans é uma bactéria anaeróbica facultativa. A sua temperatura de crescimento ótimo é entre os 35 e 50 °C e o pH entre os 5.5 e os 6.5. Algumas estirpes são consideradas bactérias termófilas, sendo capazes de crescer entre os 60 e 65 °C. Apesar de produzir ácido láctico, não produz gases provenientes das fermentações dos açúcares (Konuray e Erginkaya, 2018).

Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas (*Tabela 6*), mais importantes em termos de estabilidade microbiológica da cerveja são as pertencentes aos géneros *Pectinatus* e *Megasphaera* (bactérias anaeróbicas). No entanto, as bactérias dos géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, e algumas espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (como *Rahnella* e *Shimwellia*) também são relevantes (Ashtavinayak e Elizabeth, 2016; Dragone et al., 2008; Kordialik-Bogacka, 2022).

Tabela 6 Bactérias Gram-Negativas.

Gênero	Espécies Relevantes	Deterioração	Observações
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	"Vinagre"/sabor azedo devido à produção de ácido acético	
	<i>A. Pasteurianus</i>	Turbidez Formação de um filme superficial devido a ser estritamente aeróbio	
<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>G. liquefaciens</i>	"Off-flavour" a "Vinagre"/azedo, devido à produção de ácido acético Turbidez Formação de um filme superficial devido a ser estritamente aeróbio	
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	"Off-flavour" a "Vinagre"/azedo, devido à produção de ácido acético	
	<i>G. cerevisiae</i>	Turbidez Formação de um filme superficial devido a ser estritamente aeróbio "Endurecimento", devido à produção de levana, um polissacarídeo	
<i>Komagataeibacter</i>	<i>K. hansenii</i>	"Off-flavour" a "Vinagre"/azedo, devido à produção de ácido acético Turbidez Formação de um filme superficial devido a ser estritamente aeróbio	
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	"Off-flavours" e aroma "Amanteigado", sulfúrico e azedo, devido à produção de diacetil, dimetilsulfeto, acetoina, ácido láctico e 2,3-butanodiol	
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>	Sabor e aromas estranhos devido à produção de 2,3-butanodiol, dimetil sulfeto e dimetil dissulfeto	
	<i>E. agglomerans</i>		
	<i>E. cloacae</i>		
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	Sabor fenólico devido à produção de 4-vinilguaiaacol	
	<i>K. terrigena</i>		
<i>Rahnella</i>	<i>R. aquatilis</i>	Aromas e sabores "frutados", "leitosos" e sulfurosos devido à produção de dimetilsulfeto, acetoina, acetaldeído, ácido láctico e 2,3-butanodiol	
<i>Shimwellia</i>	<i>S. pseudoproteus</i>	Sabor e aromas estranhos devido à produção de 2,3-butanodiol, dimetil sulfeto e dimetil dissulfeto	Contaminante enterobacteriano mais comum
<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i>	Sabor "sujo"/"pútrido" e aroma "fecal" devido à produção de sulfeto de hidrogênio e ácido butírico	
	<i>M. paucivorans</i>		
	<i>M. sueciensis</i>		
<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiiphilus</i>	"Off-flavour" devido à produção de propionato e acetato	
	<i>P. frisingensis</i>	Aroma a "ovos podres" devido à produção de ácidos acético, butírico, proprónico, capróico, isovalérico e valérico, além de acetoina, sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano	
	<i>P. haikarae</i>		
<i>Propionispira</i>	<i>P. raffinosivorans</i>	Sabor indesejado	
	<i>P. paucivorans</i>	Turbidez	
<i>Selenomonas</i>	<i>S. lactifex</i>	Sabor indesejado	
		Turbidez	
<i>Zymomonas</i>	<i>Z. mobilis</i>	Sabor sulfuroso e aroma de "maçã podre" devido à produção de acetaldeído e sulfeto de hidrogênio	
	<i>subsp. Mobilis</i>	Turbidez	

As bactérias pertencentes ao gênero *Pectinatus* conseguem proliferar num meio com um teor alcoólico abaixo dos 5,5% (w/v) e sobrevivem a grandes intervalos de temperatura (entre os 15 e os 40 °C) e pH (entre os 3,5 e os 8). No entanto, o seu crescimento ótimo ocorre a um pH entre os 6.5 e os 7.0, e a uma temperatura entre os 30 e 32 °C para a espécie *Pectinatus cerevisiiphilus* e *Pectinatus frisingensis* e, entre os 20 e 30 °C para a espécie *Pectinatus*

haikarae. A contaminação com estes microrganismos ocorre, essencialmente, durante o verão, nos equipamentos de engarrafamento e tampas e, sendo que têm uma taxa de proliferação lenta, poderão ser apenas detetados quando o produto sai da fábrica (Kordialik-Bogacka, 2022).

As bactérias pertencentes ao género *Megasphaera* são menos prevalentes que as pertencentes ao género *Pectinatus*. Crescem a um pH igual ou superior a 4,1 e a uma temperatura entre os 15 e os 37 °C, sendo o seu crescimento ótimo a 28 °C. A espécie mais importante em termos de deterioração cervejeira é a *Megasphaera cerevisiae*. Estas bactérias são inibidas a concentrações de etanol superiores a 2,1% (w/v) (Dragone et al., 2008; Kordialik-Bogacka, 2022).

As bactérias ácido-acéticas responsáveis por um maior número de contaminações na cerveja são as pertencentes aos géneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. O seu crescimento ótimo é entre os 25 e 30 °C a um pH entre os 5 e os 6 (muitas estirpes conseguem reproduzir-se a um pH acima de 4). São muito resistentes aos compostos do lúpulo e a elevadas concentrações de etanol (>10% v/v). As contaminações com *Gluconobacter* podem levar à turvação e ao aumento da viscosidade, devido à capacidade de sintetizar dextrano e levana, que podem causar “Ropiness” (desenvolvimento de polissacarídeo de características pegajosas produzidas por certas bactérias) na cerveja (Ashtavinayak e Elizabeth, 2016; Kordialik-Bogacka, 2022).

As bactérias pertencentes ao género *Zymomonas* são catalase-positivas, anaeróbias facultativas e são tolerantes ao etanol (> 10% v/v). O seu crescimento ótimo ocorre a um pH de 3.4 e a uma temperatura entre os 25 e os 30 °C (Kordialik-Bogacka, 2022).

Todas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, à exceção da *Shimwellia pseudoproteus* e da *Rahnella aquatilis*, não crescem na cerveja final uma vez que, o seu crescimento é inibido pela concentração de etanol (> 2% v/v) e pelo meio ácido (pH < 4.8) (Kordialik-Bogacka, 2022). *Rahnella aquatilis* é resistente aos compostos do lúpulo (Rodhouse e Carbonero, 2017).

1.4 Planeamento do estudo

O presente estudo teve como objetivo analisar as condições dos equipamentos e materiais, na fase fria do processo antes do seu contacto com a cerveja, de forma a perceber se o procedimento de desinfeção e manuseamento utilizados eram adequados e suficientes.

Para além da amostragem em certos pontos considerados críticos, analisou-se também a cerveja em tanque, em barril e em garrafa, de modo a analisar a sua qualidade.

Pretendia analisar-se a presença/ausência de bactérias pertencentes aos géneros *Lactobacillus* e *Acetobacter* como indicadores de qualidade da cerveja comercializada, e de *Enterobacteriaceae*, como indicador de higiene e segurança alimentar (boas práticas de higiene).

2. Materiais e Métodos

2.1 Recolha de amostras

A recolha das amostras foi realizada próxima de chama, fornecida por um maçarico portátil, de modo a garantir a assepsia do local. No caso dos pontos críticos considerados em equipamentos, cápsulas e garrafas, a amostragem foi realizada momentos antes do seu contacto com a cerveja, de modo a analisar as condições com que os mesmos são utilizados. A recolha de amostras foi realizada com recurso a zaragatoas, posteriormente armazenadas em solução de Ringer até à sua análise. No caso da recolha de cerveja para análise, à exceção da cerveja de garrafa, utilizaram-se frascos estéreis para a recolha. Todas as amostras foram analisadas no dia de recolha, tendo sido refrigeradas até se proceder à sua análise.

2.2 Meios de cultura e isolamento de colónias

De modo a detetar a presença de bactérias pertencentes ao género *Lactobacillus*, *Acetobacter* e à família *Enterobacteriaceae*, foram utilizados, respetivamente, os seguintes meios de cultura: MRS (de Man, Rogosa and Sharpe), GYC (Glucose Yeast Extract) e Rapid'Enterobacteriaceae. Os meios de MRS e Rapid'Enterobacteriaceae foram preparados como descrito no rótulo e, o meio GYC foi preparado por adição de ingredientes, de acordo com a seguinte formulação: 40 g/L de glucose, 20 g/L de agar para bactérias, 10 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de carbonato de cálcio. O meio MRS foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min e, os meios Rapid'Enterobacteriaceae e GYC foram aquecidos com recurso a placas de aquecimento, até levantarem fervura (para garantir a completa dissolução do ágar).

Para o isolamento de colónias utilizou-se o método de sementeira por incorporação, método apropriado para amostras de cerveja não filtrada, de cerveja fermentada, de cerveja maturada e de cerveja em garrafa (Rocha, 2015). No caso das placas para isolamento de *Enterobacteriaceae* colocou-se uma camada *overlay*. Para as amostras realizadas em

equipamentos e materiais, os resultados foram analisados com uma diluição de 10^{-1} (devido ao armazenamento das zaragatoas de recolha em solução de Ringer, não foi possível analisar numa diluição de 10^0) e, para as amostras de cerveja, os resultados foram analisados para as diluições de $10^0, 10^{-1}$ e, em alguns casos, 10^{-2} . Aplicou-se um 1 mL de amostra em cada placa de Petri e, após a inoculação, as placas de Petri foram invertidas e incubadas numa estufa a 25 °C, durante 5 dias no caso das placas de GYC e Rapid'Enterobacteriaceae, e durante 7 dias no caso das placas de MRS.

2.3 Testes de confirmação de colónias

No fim do período de incubação, efetuou-se a contagem das colónias presentes em cada placa de Petri e, no caso das placas de MRS e GYC, selecionaram-se algumas para realização de testes de confirmação, com base na árvore de decisão da *Figura 18*.

Para identificação das bactérias pertencentes ao género *Acetobacter*, utilizaram-se os testes bioquímicos básicos de catalase, oxidase e coloração Gram, pela respetiva ordem, sendo que, quando o resultado não era o pretendido para a confirmação, os seguintes testes já não se realizavam. Além disso, foi tida em atenção, a contagem e recolha de colónias superficiais, devido a serem bactérias estritamente aeróbias.

Para a identificação de *Lactobacillus*, apenas se realizaram os testes bioquímicos básicos de catalase e coloração Gram.

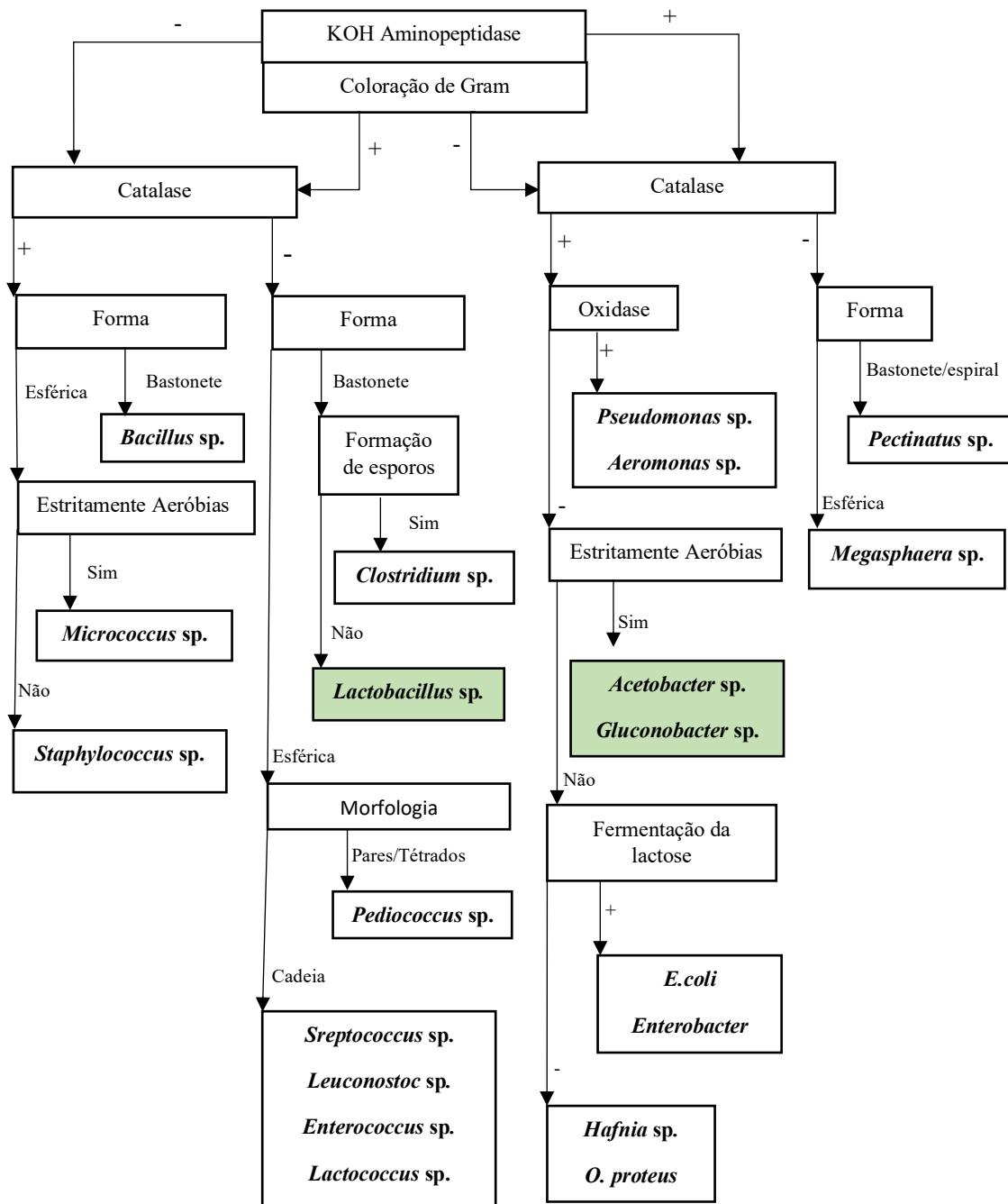


Figura 18 Árvore de decisão para identificação de bactérias aeróbias. Adaptado de Teixeira, 2014.

Deste modo, conhecendo o número de colônias confirmadas na seleção realizada, calculou-se a respectiva percentagem e estimou-se o número de colônias totais confirmadas. Com este valor, calculou-se o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) através da seguinte fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\sum c}{V \times (n1 + 0,1n2) * d}$$

Considerando,

$\sum c$ – a soma de todas as colónias nas placas de duas diluições sucessivas

V – volume em ml do inóculo

n1- nº de placas na 1ª diluição

n2 – nº de placas na 2ª diluição

d – a taxa de diluição correspondente à primeira diluição

Os resultados obtidos estão descritos em Anexo, de acordo com o dia da realização das amostragens.

2.4 Amostras para identificação por sequenciação do gene 16S rRNA

Congelamento de amostras para armazenamento

No fim dos testes básicos bioquímicos, as colónias bacterianas confirmadas foram isoladas através da técnica de riscado, e colocadas novamente em estufa, às condições de crescimento para confirmar a pureza do isolado. Posteriormente, com recurso a uma zaragatoa, foi realizada uma extração para meios próprios para congelamento, previamente autoclavados.

Para *Acetobacter*, o meio foi preparado de acordo com a seguinte composição: 3 g de meio TSB + 70 mL de água + 30 mL de glicerol.

Para *Lactobacillus*, o meio foi preparado de acordo com a seguinte composição: 2,05 g de meio MRS broth + 21 mL de água + 9 mL de glicerol. Deste modo, as amostras foram congeladas e armazenadas até se pretender realizar a extração do DNA.

Extração de DNA

Para a extração de DNA foram selecionadas 10 amostras de cada isolado. Fez-se as bactérias crescerem em meio líquido, de modo a lhes causar menos stress e, após o período de incubação, utilizou-se o “GRS Genomic Kit – BroadRange” para extração de DNA. No final do procedimento, o *pellet* obtido foi armazenado novamente no congelador.

As amostras obtidas foram amplificadas por PCR. Para tal preparou-se uma solução de acordo com a *Tabela 7*, com volume necessário não só para o número de amostras a analisar no

dia, mas também tendo em conta o volume para o controlo negativo, para o controlo positivo e “volume de erro”, equivalente a 1 amostra.

Tabela 7 Composição da solução para realização de PCR.

Solução	Volume (µl) por amostra
st. UP H ₂ O	34,75
10x Taq Buffer with KCl	5
MgCl ₂ (25 mM)	5
dNTP'S (10 mM)	1
Primer 27F (100 µM)	0,5
Primer 1492R (100µM)	0,5
TAQ polymerase (1 U/ µl) ^a	1,25
Total Volume	48

^a TAQ DNA polimerase, recombinante (1 U/ µl) CAT# EP0404 Thermofisher Scientific.

Distribuiu-se 48 µl da solução em tubos estéreis de 0,2 ml e, no fim, adicionou-se 10 µl de DNA a analisar.

As condições introduzidas no equipamento para a realização do PCR estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 Condições dos ciclos de PCR

ciclos	Programa "16S"
1	"Start Cycle": 94 °C por 5 min "Denaturation": 94 °C por 30 seg
30	"Annealing": 55 °C por 30 seg "Extension": 72 °C por 1,30 min
1	"Final Extension": 72 °C por 1,30 min
∞	"Storage": 12 °C

Eletroforese

O processo de eletroforese permitiu verificar a presença/ausência do gene 16S nas amostras.

Para tal, dissolveu-se 2 g de agarose em 100 ml de solução tampão TAE (40 %), aqueceu-se no microondas até a solução ficar translúcida e adicionou-se 5 µl de solução corante SYBR Green. Após encaixar o pente no molde, verteu-se o gel cuidadosamente, de modo a não

formar bolhas e deixou-se solidificar durante 1 hora. Posteriormente, o mesmo foi removido, colocado na tina cuidadosamente, e submerso em solução tampão.

Carregou-se o gel com 5 µl de amostra de DNA e 3 µl de corante ((Loading buffer) e aplicou-se, de seguida, a técnica do “up&down” para homogeneizar. Nos extremos do gel aplicou-se Ladder Buffer. Por fim, encaizou-se a tampa, ligou-se o voltímetro e, após a corrida, visualizou-se e capturou-se imagens do gel sob luz ultravioleta com GelDoc XR System-BioRad.

3. Resultados e Discussão

O limite máximo de contaminação para cada um destes microrganismos é definido por cada empresa do setor cervejeiro, uma vez que é um fator que influencia, principalmente, a qualidade da cerveja produzida.

Desta forma, tendo em conta que a *Fábrica de Cervejas Portuense* ainda não tem esses critérios definidos, para análise de resultados, foram definidos três níveis de contaminação, de acordo com o número de unidades formadoras de colónias (UFC) bacterianas, tendo como referência o estudo de López et al. (2020). Cervejas que tivessem entre 1-50 UFC/mL foram consideradas como tendo um nível baixo de contaminação (nível 1), cervejas que tivessem entre 50-100 UFC/mL foram consideradas como tendo um nível médio (nível 2) e, cervejas que excedessem os 100 UFC/mL foram consideradas com um nível alto de contaminação (nível 3). Quando não se detetaram colónias foi considerado o nível 0. A mesma metodologia foi utilizada para análise dos resultados a equipamentos e materiais, para melhor comparação dos valores. Os resultados foram analisados em Logaritmo de UFC por ml, e associou-se cores aos níveis para facilitar a análise (*Tabela 9*).

Tabela 9 Diferentes níveis de contaminação e respetiva cor associada.

Nível	0	1	2	3
UFC/mL	0]0-50[[50-100]	>100
Log(UFC/mL)	—	<1,7	1,7- 2,0	>2,0

A ausência de colónias bacterianas não confirma a ausência de microrganismos, uma vez que podem estar presentes em concentrações não detetáveis pelo método.

Constrangimentos sentidos

Ao longo do trabalho, existiram alguns constrangimentos que influenciaram os resultados finais obtidos. A colheita de algumas amostras nem sempre foi possível nas datas programadas, devido a alterações imprevistas no planeamento de produção da empresa.

Foram realizadas amostragens antes do dia 10 de maio, no entanto, como nas recolhas iniciais apenas se analisou a presença de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* e, até à data, não se realizaram testes de confirmação (oxidase, catalase e Coloração Gram), os dados não foram colocados no presente estudo, por constituírem resultados incompletos e não fidedignos.

Não menos importante, e por isso entender ser necessário evidenciá-lo antes da apresentação dos resultados obtidos, que os resultados de sequenciação de DNA realizados em laboratório externo concluíram não ser possível com este trabalho quantificar a presença de *Acetobacter*. Isso por, nas amostras sequenciadas em que se esperava confirmar a presença de bactérias desse género, ter-se confirmado apenas a presença de outros géneros de bactéria (*Sphingomonas*, *Staphylococcus*).

Assim, na apresentação dos resultados obtidos, sempre que se referir “*Acetobacter*”, há uma elevada probabilidade de os mesmos corresponderem à presença de bactérias de outros géneros, entre os quais *Sphingomonas* e *Staphylococcus*.

Análise aos tanques

Para análise das condições dos tanques, foram tidos em consideração como pontos críticos, a parte inferior da porta e a borracha isolante da mesma. A entrada do tubo, por onde a cerveja entraria, foi também analisada, de modo a verificar as suas condições. A parte do topo do tanque, apesar de ser considerada um ponto crítico, não foi analisada, devido à dificuldade em realizar a sua amostragem.

Os resultados podem ser observados na *Tabela 10*.

Tabela 10 Resultados microbiológicos do estado dos tanques prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Tanque	Log(UFC/mL)								
		<i>Lactobacillus</i>			<i>Acetobacter</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>		
		porta	borracha	tubo	porta	borracha	tubo	porta	borracha	tubo
19/mai	CCT 21	n.d	n.d	n.d	≅1,86	n.d	n.d	<1,60	n.d	n.d
25/mai	CCT 9	—			n.d	n.d	n.d	<1,60	<1,60	<1,60
30/jun	CCT 3	n.d	n.d	n.d	≅ 1,78	≅ 1,85	≅ 1,60	n.d	n.d	n.d
06/jul	CCT 9	n.d	n.d	n.d	<1,60	n.d	2,15	n.d	n.d	n.d
06/jul	CCT 7	n.d	n.d	n.d	≅ 1,95	≅ 1,70	≅ 1,60	n.d	n.d	n.d
07/jul	CCT 4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Não foram detetadas bactérias pertencentes ao género *Lactobacillus* em nenhuma das amostras recolhidas, o que indica que o tratamento de desinfecção consegue eliminar estas bactérias. A ausência de resultados no dia 25 de maio é justificada pelas placas de MRS não terem solidificado, possivelmente, porque o agar poderá ter-se depositado no fundo do frasco. No entanto, as placas foram colocadas em estufa, sem serem invertidas, mas não se verificou crescimento de nenhuma colónia.

As bactérias pertencentes ao género “*Acetobacter*” foram as mais preocupantes, por se encontrarem em maior número e em todos os pontos de controlo. Nos dois dias em que não foram detetadas colónias, poderá ter existido um maior cuidado na desinfecção, como a passagem de um pano com desinfetante nas zonas da porta e borracha e a uma aplicação devida de desinfetante na entrada do tubo.

Em relação às bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, as contaminações detetadas foram diminutas, pelo que não se exclui a hipótese de terem ocorrido no momento de amostragem, apesar de todos os cuidados.

Para mitigar o risco de contaminação por “*Acetobacter*” e *Enterobacteriaceae*, dever-se-á realizar uma limpeza mais pormenorizada destes pontos, antes da realização da limpeza CIP, retirando a borracha isolante e colocando-a submersa em solução de ácido peracético 1 % por 30 minutos, e retirando a matéria orgânica que fica contida nas paredes do tanque na parte inferior da porta.

Análise ao tubo de amostragem

Ainda nos tanques, decidi analisar-se as torneiras de amostragem, porque se retiraram algumas das cervejas através delas para análise. Para tal, efetuou-se o procedimento habitual de recolha, e realizou-se amostragens em dois momentos, antes da aplicação do desinfetante Mida San 318 DR, e após a aplicação (*Tabela 11*).

Tabela 11 Resultados microbiológicos do estado das torneiras de amostragem prontas a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Tanque	Recolha	Log(UFC/mL)		
			<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
10/mai	BBT 2	após	n.d	2,32	2,94
31/mai	BBT 2	antes	<1,60	<1,60	<1,60
	BBT 2	após	n.d	n.d	n.d
	BBT 1	antes	2,38	2,72	2,28
	BBT 1	após	n.d	<1,60	<1,60

No dia 10 de maio, apenas se analisou a amostragem após a aplicação do desinfetante. Os resultados permitiram observar que o procedimento aplicado não era suficiente para garantir a eliminação de todos os microrganismos.

Deste modo, no dia 31 de maio, entendeu-se ser importante analisar o estado da torneira antes e depois da aplicação do desinfetante, para perceber o modo de atuação. Perante os resultados obtidos, e apesar de no tanque BBT 2 a desinfeção ter sido eficaz, o mesmo não acontece no tanque BBT 1. Tal pode acontecer devido à concentração microbiológica ser superior, e o desinfetante só conseguir atuar na camada superficial.

A técnica aplicada aparenta ser eficaz para *Lactobacillus*, mas de eficácia duvidosa para “*Acetobacter*” (ou *Sphingomonas* e *Staphylococcus*) e *Enterobacteriaceae*.

Análise à spx (centrifugadora)

Na centrifugadora realizaram-se amostragens na entrada (parte inicial do tubo por onde entra a cerveja), no seu filtro, na torneira de amostragem e na entrada do tubo de saída. A análise à torneira de amostragem, devido à impossibilidade de introduzir a zaragatoa, foi realizada através da recolha de água da limpeza contida na mesma.

Tabela 12 Resultados microbiológicos do estado da centrifugadora pronta a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Log(UFC/mL)											
	<i>Lactobacillus</i>				<i>Acetobacter</i>				<i>Enterobacteriaceae</i>			
	entrada	filtro	saída	torneira de amostragem	entrada	filtro	saída	torneira de amostragem	entrada	filtro	saída	torneira de amostragem
19/mai	n.d	n.d	n.d	—	n.d	n.d	n.d	—	≈0,78	n.d	n.d	—
30/jun	n.d	n.d	n.d	—	2,15	2,08	n.d	—	n.d	<1,60	n.d	—
07/jul	n.d	>4,18	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Nas 3 amostragens realizadas detetou-se sempre a contaminação de um dos pontos críticos analisados.

A 19 de maio detetou-se a presença de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* na entrada da centrifugadora. A 30 de junho, os resultados para “*Acetobacter*” acusaram contaminação elevada na entrada e na saída deste equipamento. A 7 de julho, apesar de as colónias não terem sido confirmadas pelos testes bioquímicos, detetou-se uma contaminação elevada no filtro por *Lactobacillus*.

Estes resultados vêm corroborar a ideia inicial de a centrifugadora, devido à sua estanquidade e conseqüente dificuldade de limpeza, constituir um ponto crítico para a assepsia do processo produtivo.

Análise à bomba

De modo a verificar a eficácia da limpeza CIP nas bombas, antes de estas serem utilizadas, retiraram-se amostras nas zonas em que é possível o acesso, ou seja, na sua entrada e na sua saída.

Tabela 13 Resultados microbiológicos do estado da bomba pronta a uso em Log(UFC/mL).
(n.d – não detetado)

Dia	Amostra	Log(UFC/mL)		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
07/jun	Entrada	n.d	<1,60	n.d
	Saída	n.d	n.d	n.d
07/jul	Entrada	n.d	n.d	n.d
	Saída	n.d	n.d	n.d

Os resultados das amostragens realizadas demonstram que, em geral, a desinfecção efetuada é adequada. Apenas se detetou uma contaminação de nível 1 por “*Acetobacter*”.

Neste equipamento o método de desinfecção utilizado pode considerar-se eficaz, provavelmente por a solução desinfetante pressurizada incidir sobre uma superfície de reduzida área.

Seriam necessários mais testes para averiguar a possibilidade da contaminação detetada no dia 7 de junho poder ter ocorrido no momento da recolha da amostra.

Análise à enchedora

Para analisar as condições de uso da enchedora, foram realizadas amostragens às 8 agulhas de enchimento, que entram dentro da garrafa até estas ficarem completas de cerveja, e à capsuladora, por ser uma zona em que a desinfecção CIP não consegue atuar.

Tabela 14 Resultados microbiológicos do estado da enchedora pronta a uso em Log(UFC/mL).
(n.d – não detetado)

		Log(UFC/mL)		
Dia	Amostra	<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
17/jun	Agulha 1	n.d	—	n.d
	Agulha 2	n.d	—	n.d
	Agulha 3	n.d	—	n.d
	Agulha 4	n.d	—	n.d
	Agulha 5	n.d	—	n.d
	Agulha 6	n.d	—	n.d
	Agulha 7	n.d	—	n.d
	Agulha 8	<1,60	—	<1,60
	Capsuladora	n.d	—	2,77
30/jun	Agulha 1	n.d	n.d	<1,60
	Agulha 2	n.d	2,41	n.d
	Agulha 3	n.d	2,04	n.d
	Agulha 4	n.d	≅1,85	n.d
	Agulha 5	n.d	n.d	<1,60
	Agulha 6	n.d	2,53	n.d
	Agulha 7	n.d	2,15	n.d
	Agulha 8	n.d	2,52	<1,60
	Capsuladora	n.d	2,7	>3,18

No dia 17 de junho, não se consideraram os resultados obtidos para “*Acetobacter*”, uma vez que o número de colónias nas placas, nas amostragens realizadas em todos os pontos críticos, era incontável, não se podendo concluir que a contaminação veio da amostra.

Relativamente à amostragem realizada no dia 30 de junho, obtiveram-se resultados positivos para “*Acetobacter*” em praticamente todos os pontos analisados e, na capsuladora, registou-se também a presença de um elevado número de *Enterobacteriaceae*.

Tal, pressupõe deficiências no procedimento de higienização da linha de engarrafamento. Este facto, torna-se ainda mais preocupante se tivermos em consideração que, os resultados positivos para “*Acetobacter*” podem, na realidade, constituir resultados positivos para *Staphylococcus*, bactérias presentes na microbiota natural humana (Ehlers e Merrill, 2022).

Análise ao interior de garrafas vazias

Para analisar a assepsia do interior das garrafas utilizadas no enchimento, selecionou-se, aleatoriamente, garrafas contidas numa paleta que seriam das primeiras a serem utilizadas no enchimento seguinte.

Tabela 15 Resultados microbiológicos do estado do interior das garrafas vazias antes da lavagem com água em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Garrafas	Log(UFC/mL)		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
25/mai	1	—	n.d	n.d
	2	—	n.d	n.d
	3	—	n.d	n.d
	4	—	n.d	<1,60
	5	—	n.d	<1,60
17/jun	6	n.d	—	n.d
	7	n.d	—	n.d
	8	n.d	—	n.d
30/jun	9	n.d	n.d	n.d
	10	n.d	n.d	n.d
	11	n.d	2,04	n.d
	12	n.d	n.d	n.d
	13	n.d	<1,60	<1,60
	14	n.d	n.d	n.d
	15	n.d	n.d	n.d
	16	n.d	<1,60	n.d

Não foi detetada a presença de *Lactobacillus* nas amostragens realizadas.

A presença de “*Acetobacter*”, apenas em algumas amostras recolhidas no mesmo dia (30 de junho), pode resultar de um armazenamento incorreto das garrafas entre enchimentos, como por exemplo, o selamento deficiente de um lote de garrafas aberto no enchimento anterior, em que o ar poderá constituir uma possível fonte de contaminação.

Análise a caricas

As caricas fornecidas à empresa, são armazenadas e, quando necessárias, é colocada uma certa quantidade num balde de auxílio à sua colocação no equipamento. Normalmente, o

balde encontra-se fechado, mas detetou-se situações em que a necessidade de dar atenção a outros pontos, levou ao esquecimento dessa etapa. As cargas analisadas foram recolhidas do balde e os resultados das suas análises estão apresentados na *Tabela 16*.

Tabela 16 Resultados microbiológicos do estado das cargas prontas a uso em Log(UFC/mL).
(n.d – não detetado)

Dia	Carica	Log(UFC/mL)		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
30/jun	1	n.d	>3,18	<1,60
	2	n.d	2,73	n.d
	3	n.d	≈1,70	<1,60
	4	n.d	n.d	n.d
	5	n.d	n.d	n.d
	6	n.d	n.d	n.d
	7	n.d	n.d	n.d

Não foram detetados *Lactobacillus* nas amostras recolhidas.

A presença de resultados positivos para “*Acetobacter*” e *Enterobacteriaceae*, pode estar associada não só ao armazenamento das cargas, mas também ao seu manuseamento quando colocadas no balde, pelo que é recomendável implementar medidas que mitiguem este risco. Entre essas ações de melhoria, aumentar o número de desinfecções periódicas do balde de armazenamento, e aprimorar as condições de higiene durante o manuseamento das cargas. É também recomendável despistar a possibilidade de parte das cargas estarem já contaminadas aquando da sua receção na empresa.

Enchimento barril

No enchimento de barril foram analisadas não só as condições do “click” (interior, exterior e mangueira), mas também a zona de encaixe do barril, e o tubo do tanque de onde a cerveja iria sair.

Tabela 17 Resultados microbiológicos do estado do click e do tubo do tanque prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

		Dia	10/mai		31/mai		07/jun	15/jun	24/jun	07/jul
Local										
Log(UFC/mL)	<i>Lactobacillus</i>	interior	n.d	n.d	n.d	n.d	<1,60	n.d	n.d	n.d
		exterior	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
		mangueira	—	—	—	—	n.d	n.d	n.d	n.d
		encaixe	—	—	—	—	n.d	n.d	<1,60	n.d
		tubo tanque	n.d		n.d		n.d	n.d	n.d	n.d
	<i>Acetobacter</i>	interior	<1,60	n.d	n.d	n.d	<1,60	n.d	n.d	n.d
		exterior	<1,60	n.d	n.d	n.d	<1,60	<1,60	n.d	n.d
		mangueira	—	—	—	—	<1,60	n.d	<1,60	n.d
		encaixe	—	—	—	—	n.d	≈1,78	n.d	n.d
		tubo tanque	>3,18		2,54		<1,60	<1,60	2,36	n.d
	<i>Enterobacteriaceae</i>	interior	n.d	≈1,95	<1,60	2,89	n.d	n.d	n.d	n.d
		exterior	n.d	≈1,95	<1,60	2,89	n.d	n.d	n.d	n.d
		mangueira	—	—	—	—	n.d	n.d	n.d	n.d
		encaixe	—	—	—	—	n.d	<1,60	n.d	n.d
		tubo tanque	>3,18		n.d		n.d	<1,60	n.d	n.d

Nos dias 10 e 31 de maio, foram utilizados dois “clicks” no enchimento e, como o planeamento da amostragem ainda não estava bem definido, existem dados em ausência. Além disso, não se diferenciou o interior e o exterior do “click”, sendo que a zaragatoa passou nas duas zonas.

Destaca-se os resultados positivos para “*Acetobacter*”, principalmente, no tubo do tanque. Isto significa que, a solução Mida San 318 DR não é eficaz, ou necessita de um tempo de atuação superior. Relativamente desinfeção do “click”, poder-se-á aumentar a concentração da solução de ácido peracético 1%, uma vez que este é preparado através de diluição.

A não deteção de bactérias no dia 7 de julho, indicia que os cuidados de desinfeção foram reforçados, provavelmente por os resultados obtidos nas amostragens anteriores demonstrarem essa necessidade.

Análise do barril vazio

Para a amostragem do interior dos barris, previamente ao seu corte, aplicou-se uma solução de álcool 70% Vol. no seu exterior e na face de corte.

Foram tidos em conta diversos pontos, identificados na *Figura 19*, de acordo com a denominação atribuída.

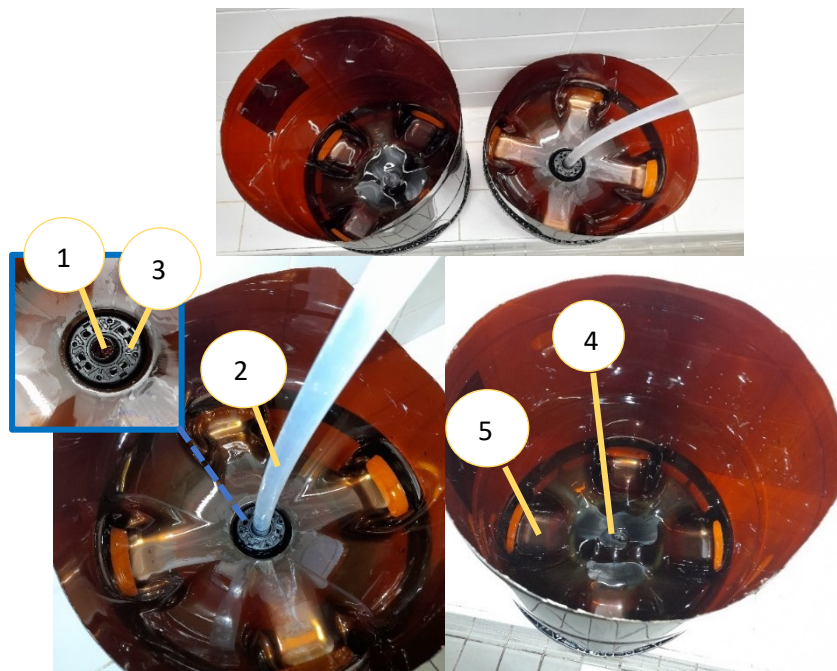


Figura 19 Pontos analisados no interior do barril. (Legenda: 1- interior encaixe; 2- mangueira (interior); 3- peça; 4- fundo centro; 5- fundo lateral).

Tabela 18 Resultados microbiológicos do estado do interior dos barris prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

		Dia	15/jun		07/jul	
		Barril	1	2	1	2
Log(UFC/mL)	<i>Lactobacillus</i>	interior encaixe	n.d	n.d	n.d	n.d
		mangueira	n.d	n.d	n.d	n.d
		peça	n.d	n.d	n.d	n.d
		fundo centro	n.d	n.d	n.d	n.d
		fundo lateral	n.d	n.d	n.d	n.d
	<i>Acetobacter</i>	interior encaixe	n.d	n.d	n.d	2,46
		mangueira	n.d	n.d	n.d	2,6
		peça	n.d	n.d	n.d	n.d
		fundo centro	n.d	n.d	2,80	n.d
		fundo lateral	n.d	<1,60	2,57	n.d
	<i>Enterobacteriaceae</i>	interior encaixe	n.d	n.d	n.d	n.d
		mangueira	n.d	n.d	n.d	n.d
		peça	n.d	n.d	n.d	n.d
		fundo centro	n.d	n.d	n.d	n.d
		fundo lateral	n.d	n.d	n.d	n.d

Apenas se detetaram resultados positivos para “*Acetobacter*”. Para tal ter ocorrido, ou o barril não é comprado nas condições estéreis que a marca garante, ou existiram contaminações no momento da amostragem. Não foram detetados *Lactobacillus*, nem *Enterobacteriaceae*.

Apesar de os barris terem sido analisados numa câmara de fluxo laminar, o seu corte foi realizado no exterior, devido à dificuldade do seu manuseamento dentro da mesma. Tal, poderá ter contribuído para as contaminações por “*Acetobacter*” acima evidenciadas.

Análise da atuação de desinfetantes

A análise da atuação de desinfetantes foi realizada nos tubos dos tanques, por ser uma zona que necessita de desinfecção antes de cada utilização.

A amostragem foi realizada com zaragatoa em torno de toda a entrada do tubo, não sendo possível garantir que essa recolha tenha sido sempre realizada na mesma superfície específica, ao longo dos diferentes tempos.

Ação do desinfetante Mida San 318 DR

Tabela 19 Resultados microbiológicos do estado do tubo na desinfecção com Mida San 318 DR prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

		Dia	24/jun		06/jul		
		Tanque	BBT 1	BBT2	CCT1	CCT3	CCT4
Log(UFC/mL)	<i>Lactobacillus</i>	0 min	≅ 1,85	n.d	n.d	<1,60	n.d
		5 min	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
		10 min	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
		15 min	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	<i>Acetobacter</i>	0 min	>3,18	≅ 1,85	n.d	2,05	2,18
		5 min	n.d	n.d	≅ 1,90	2,11	n.d
		10 min	2,20	n.d	≅1,70	≅1,70	2,20
		15 min	2,08	n.d	≅1,95	≅ 1,85	2,23
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0 min	2,84	<1,60	n.d	<1,60	n.d
		5 min	<1,60	n.d	n.d	n.d	n.d
		10 min	<1,60	n.d	n.d	n.d	n.d
		15 min	n.d	<1,60	n.d	n.d	n.d

Pode-se constatar que este desinfetante não é eficaz para “*Acetobacter*”, dado terem-se verificado contaminações muito significativas em praticamente todas as amostragens. Deverão ser equacionadas outras formas de desinfecção mais eficazes para estas bactérias.

Os resultados obtidos para *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* demonstram que esta solução desinfetante é eficaz no controlo destas bactérias, sendo recomendável a sua atuação por um período de 15 minutos.

O resultado positivo para *Enterobacteriaceae* ao fim dos 15 minutos no tanque BBT 2, pode ter resultado de uma contaminação no momento de recolha da amostra.

Ação do desinfetante Mida Chriox 5 (1 %)

Tabela 20 Resultados microbiológicos do estado do tubo na desinfecção com Mida Chriox 5 (1 %) prontos a uso em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Tanque	Log(UFC/mL)											
		<i>Lactobacillus</i>				<i>Acetobacter</i>				<i>Enterobacteriaceae</i>			
		0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min	0 min	5 min	10 min	15 min
06/jul	CCT6	n.d	n.d	n.d	n.d	≅1,78	<1,60	n.d	≅1,70	n.d	n.d	n.d	n.d
	CCT10	<1,60	n.d	n.d	n.d	>3,18	<1,60	≅ 1,90	≅ 1,85	2,11	n.d	n.d	n.d

Relativamente a esta solução desinfetante, os resultados apontam também para a sua eficácia no controlo de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae*, ao fim de 5 minutos de atuação. No entanto, para confirmar o tempo de atuação atrás indicado, seria necessário realizar mais amostragens.

A existência de resultados positivos para “*Acetobacter*” em mais de 85% das amostras realizadas, demonstram que, tal como com Mida San 318 DR, esta solução desinfetante a 1% não é eficaz no controlo destas bactérias. Deveria equacionar-se a sua aplicação a uma maior concentração, ou testar novas soluções desinfetantes

Análises à cerveja

Foram realizadas análises à cerveja, de modo a perceber a sua qualidade. Começou por analisar-se cervejas em tanque e, posteriormente, cerveja de barril e de garrafa, de forma a verificar o estado de contaminação e sua evolução.

Cerveja em Tanque

As amostragens foram realizadas através do tubo de amostragem ou do tubo de saída. É necessário ter em conta que, quer os tubos de amostragem, quer os tubos altos, apresentaram contaminações nas amostragens realizadas com zaragatoa.

Tabela 21 Resultados microbiológicos da cerveja em tanque em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Lote	Local de recolha	<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
10/mai	PL 195	tubo amostragem	<0,60	1,37	2,34
31/mai	PL 197	tubo amostragem 1 ^a	1,54	n.d	2,11
		tubo amostragem 2 ^a	n.d	n.d	<0,6
07/jun	PL198	tubo de amostragem	n.d	<0,6	n.d
15/jun	PL 199	tubo de saída	n.d	n.d	n.d
24/jun	Musa Blondie 3	tubo de saída	n.d	n.d	n.d
30/jun	L1637	tubo de saída	n.d	n.d	2,51
06/jul	PL198	tubo de saída	>4,18	2,37	3,26
07/jul	IPA 71	tubo de saída	n.d	n.d	n.d

Na amostragem de dia 31 de maio, a extração de duas amostras de cerveja pelo tubo de amostragem, permitiu observar a diminuição da concentração para *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae*, na segunda amostra recolhida. Isso confirma a necessidade de realizar uma purga da primeira cerveja retirada.

O nível de contaminação da cerveja em tanque varia muito de lote para lote. A presença de lotes em que não foi detetada qualquer tipo de contaminação, permite-nos concluir que por vezes, possivelmente devido a um procedimento mais rigoroso, é possível obter uma cerveja maturada com elevada qualidade.

Cerveja em barril

Analisou-se a cerveja que saía dos “clicks” de enchimento, uma vez que para análise da cerveja em barril se teria de utilizar um equipamento para a sua extração, que poderia adulterar os resultados. No entanto, desta forma, os resultados obtidos são os resultados da cerveja em barril, sem ter em conta possíveis contaminações devido há presença de microrganismos no interior do mesmo.

Tabela 22 Resultados microbiológicos da cerveja em barril em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Lote	Log(UFC/mL)		
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
10/mai	PL 195	1,26	1,04	1,16
	PL 195	≅ 0,83	1,47	1,75
07/jun	PL 198	1,26	<0,6	2,7
15/jun	PL 199	n.d	n.d	n.d
24/jun	Musa Blondie 3	n.d	n.d	n.d
06/jul	PL 198	>4,18	>4,18	>3,5
07/jul	IPA 71	inconclusivo	0,90	2,2

Na amostragem de dia 10 de maio, são apresentados dois valores, dado ter-se analisado a cerveja proveniente de dois “clicks” de enchimento de barris. Segundo os dados, anteriormente apresentados, um dos “clicks” apresentava-se mais contaminado do que o outro.

A necessidade de esvaziar, naquele dia, um tanque de 6 000 L, obrigou a improvisar-se a instalação de um segundo “click” de enchimento, de forma a acelerar esse processo. Esta alteração ao normal processo de produção pode ter originado um menor cuidado na desinfeção dos diferentes equipamentos utilizados, conforme resultados descritos no quadro anterior. Essa falha motivou a devolução dos 193 barris cheios nesse dia, por terem sido considerados impróprios para consumo pelo cliente.

A cerveja PL 198 foi analisada em dois momentos distintos (dia 7 de junho e 6 de julho), apresentando sempre resultados positivos para as bactérias analisadas e uma evolução da contaminação ao longo desse período.

Nas cervejas Musa Blondie 3 e IPA 71, não foi detetado qualquer tipo de contaminação, pelo que apresentam elevada qualidade.

Na cerveja PL 199 os resultados não são alarmantes, pois apenas foi detetado um nível baixo de contaminação para “*Acetobacter*”, pelo que se pode considerar que é uma cerveja também com qualidade. No entanto, a sua qualidade poderá diminuir mais facilmente ao longo do tempo de prateleira.

O facto de uma parte significativa das amostras analisadas no enchimento já apresentarem contaminação em tanque, impele-nos a considerar imprescindível a correção das técnicas de desinfeção em fases anteriores do processo.

Cerveja em garrafa

Como referido na amostragem dos tanques, ocorreu um equívoco com o meio MRS no dia 25 de maio pelo que, não estão indicados resultados para *Lactobacillus*.

Tabela 23 Resultados microbiológicos da cerveja em garrafa em Log(UFC/mL). (n.d – não detetado)

Dia	Lote	Garrafa	Log(UFC/mL)		
			<i>Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
10/mai	IPA L1 592	1	≈1,01	<0,60	2,67
19/mai	L1 594	1	n.d	n.d	1,46
		2	n.d	n.d	2,32
25/mai	L1 596	1	—	n.d	n.d
		2		n.d	n.d
	L1 614	1		n.d	n.d
		2		n.d	n.d
30/jun	L1637	1	n.d	n.d	1,20
		2	n.d	1,30	>3,18
		3	n.d	—	1,72

A cerveja em garrafa analisada no dia 10 de maio não estava com as características pretendidas, tendo-se tentado identificar possíveis causas. A contaminação por microrganismos produtores de ácidos, apesar de não atingir níveis elevados, pode ser a causa da presença de certos “off-flavours” e turvação nesse lote. A contaminação por *Enterobacteriaceae* aponta para deficiências de higienização ao longo do processo produtivo.

Os resultados obtidos a 19 de maio na cerveja L1 594 evidenciam a existência de contaminação durante o processo de enchimento das garrafas, pelo menos no que concerne a *Enterobacteriaceae*, sinal de que pode também ter ocorrido deficiências de higienização ao longo do processo produtivo.

No dia 25 de maio, não se detetou “*Acetobacter*”, nem *Enterobacteriaceae* nas amostras recolhidas.

Na amostragem de dia 30 de junho, detetaram-se níveis altos para “*Acetobacter*” e *Enterobacteriaceae*, no entanto, não foram detetados *Lactobacillus*. A presença de *Enterobacteriaceae* já tinha sido detetada na análise realizada à cerveja em tanque, no entanto, no que respeita a *Acetobacter*, estes resultados indiciam uma forte probabilidade de contaminação durante o processo de engarrafamento.

Resultados de sequenciação

As colónias selecionadas para extração de DNA e posterior envio para sequenciação, pertenciam à amostragem realizada no dia 10 de maio, sendo que algumas foram isoladas da mesma placa de Petri.

Das 20 colónias selecionadas, 10 para *Lactobacillus* (Figura 20) e 10 para *Acetobacter* (Figura 21), apenas 9 deram positivas para DNA bacteriano nas eletroforeses realizadas.

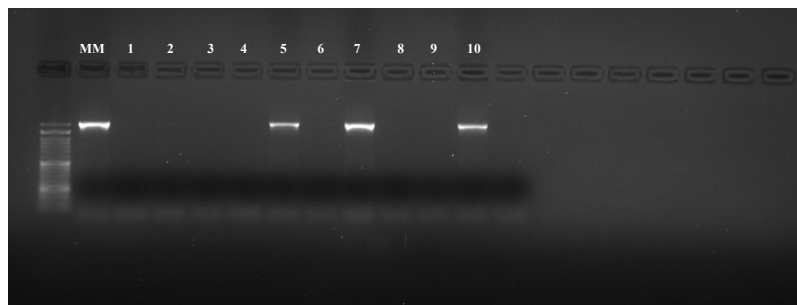


Figura 20 Resultados da eletroforese para deteção de DNA bacteriano em amostras de *Lactobacillus* (MM - marcador de massa molecular).

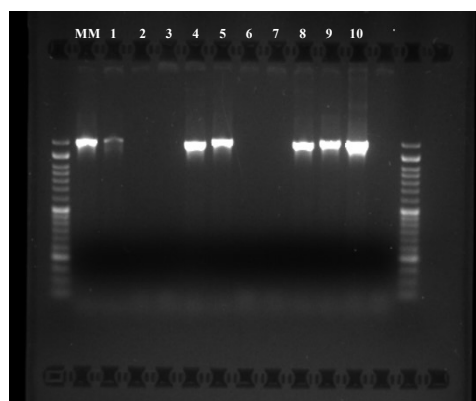


Figura 21 Resultados da eletroforese para deteção de DNA bacteriano em amostras de *Acetobacter* (MM - marcador de massa molecular).

As amostras positivas foram enviadas para sequenciação. Os resultados obtidos estão apresentados na *Tabela 24*.

Tabela 24 Resultados de sequenciação.

Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy	Completeness (%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>subsp. bovis</i>	GTC 843	99,04	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales; <i>Staphylococcaceae</i> ; <i>Staphylococcus</i> ; <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	78,3
<i>Sphingomonas panni</i>	C52	97,98	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales; <i>Sphingomonadaceae</i> ; <i>Sphingomonas</i>	80,8
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	99,07	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales; <i>Staphylococcaceae</i> ; <i>Staphylococcus</i>	80,7
<i>Staphylococcus edaphicus</i>	P5085	99,3	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales; <i>Staphylococcaceae</i> ; <i>Staphylococcus</i>	78,1
<i>Sphingomonas panni</i>	C52	99,14	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales; <i>Sphingomonadaceae</i> ; <i>Sphingomonas</i>	82,6
<i>Levilactobacillus brevis</i>	ATCC 14869	99,48	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Levilactobacillus</i>	78,4
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>subsp. tolerans</i>	JCM 1171	99,22	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Lacticaseibacillus</i> ; <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	77,2
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>subsp. tolerans</i>	JCM 1172	99,67	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Lacticaseibacillus</i> ; <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	80,5
<i>Staphylococcus edaphicus</i>	P5085	99,57	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales; <i>Staphylococcaceae</i> ; <i>Staphylococcus</i>	78,3

A identificação de bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus*, bactérias Gram-positivas, no lugar de bactérias pertencentes ao género *Acetobacter*, bactérias Gram-negativas, pode ter acontecido devido ao envelhecimento das colónias, que provoca perda da capacidade de aquisição da coloração no teste de coloração Gram. Deste modo, bactérias Gram-positivas poderão ter sido identificadas como bactérias Gram-negativas, adulterando os resultados. Dever-se-ia ter selecionado colónias de amostragens diferentes, para verificar se este foi o erro cometido.

Em relação à sequenciação de colónias que cresceram em meio MRS, apesar de não pertencerem ao género *Lactobacillus*, são igualmente bactérias produtoras de ácido láctico, afetando de igual modo a qualidade da cerveja.

4. Conclusões

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida à base de malte, água, lúpulo e levedura e, pode ser classificada como cerveja industrial ou cerveja artesanal dependendo do tipo de indústria. A cerveja artesanal é caracterizada pela ausência de pasteurização e filtração estéril (etapas presentes na cerveja industrial) e, por isso, não é possível garantir o não crescimento/desenvolvimento de microrganismos. Apesar da presença de etanol, de compostos do lúpulo, da elevada concentração de CO₂ e reduzida concentração de O₂, muitos microrganismos conseguem resistir e, a sua presença pode causar alterações na cerveja.

Considera-se que o controlo é assegurado na fase quente, devido ao mosto ser elevado à temperatura de ebulição, no entanto, poderão existir contaminações na fase fria do processo, caso não se proceda a uma desinfeção e manuseamento adequados dos equipamentos e materiais.

O trabalho realizado confirmou o risco existente de as cervejas artesanais poderem ser alvo de contaminação por diversos géneros de bactérias, que podem afetar a sua qualidade e estabilidade, ao longo de todas as etapas da fase fria do processo de fabrico. Nas análises realizadas verificou-se contaminação nos equipamentos, materiais utilizados, e em muitos lotes de cerveja, em tanque, em barril e em garrafa, principalmente por “*Acetobacter*” e *Enterobacteriaceae*.

Os resultados positivos para “*Acetobacter*”, mesmo que as análises de sequenciação não tenham permitido a confirmação de microrganismos desse género, são um fator de risco para a qualidade da cerveja e sua aptidão para consumo.

Através da pesquisa bibliográfica realizada, sabemos que a presença de *Staphylococcus*, bactérias patogénicas do Homem e de outros mamíferos (Rodríguez et al., 1996), pode também provocar um aroma frutado atípico na cerveja.

Além disso, também foram detetadas bactérias produtoras de ácido láctico sendo que, nas análises de sequenciação foi possível identificar-se *Levilactobacillus brevis* e *Lacticaseibacillus paracasei subsp. tolerans*.

A deteção destes microrganismos indicadores de qualidade comprova que a desinfecção não está a ser eficaz, pelo que se deve equacionar o recurso a novos desinfetantes, ou acréscimo da concentração/tempo de atuação da solução atualmente utilizada.

No que diz respeito às contaminações por *Enterobacteriaceae*, também detetadas em vários pontos do processo e na própria cerveja, apontam para a necessidade de melhorias no processo de higienização, e também a uma análise prévia dos inóculos de levedura utilizados ao longo do processo produtivo (Dragone et al., 2008).

A implementação de técnicas mais eficazes no controlo de contaminações ao longo da fase fria do processo produtivo, permitirá melhorar a estabilidade e qualidade da cerveja, minimizando os riscos de “off-flavours” e turvação, e prolongando o seu “tempo de prateleira”.

5. Trabalho futuro

No seguimento deste trabalho conclui-se ser necessário, no futuro, incrementar o número de amostras recolhidas em cada ponto de controlo, visando obtenção de resultados mais significativos.

Para clarificar a presença ou não de *Acetobacter*, poder-se-á alterar o método inoculação da amostra no meio de cultura. Deverá ser utilizado o método de espalhamento, em detrimento do método de sementeira por incorporação, uma vez que essas bactérias são estritamente aeróbias.

Tendo em conta a deteção de outros microrganismos nos resultados de sequenciação de DNA (pertencentes aos géneros *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Levilactobacillus* e

Lactocaseibacillus), futuras análises deverão ter em conta a presença/ausência dessas bactérias, potencialmente prejudiciais à estabilidade e qualidade da cerveja.

Deverão também ser testadas novas técnicas de desinfecção, quer por alteração da substância base, quer por avaliação de diferentes concentrações e tempos de exposição ao desinfetante.

A montante, na empresa fornecedora, a análise prévia dos inóculos de levedura deve também ser considerada, com o objetivo de reduzir possíveis contaminações por *Enterobacteriaceae*.

Por fim, a empresa deve enviar os barris para análise num laboratório acreditado, de modo a confirmar se estes vêm nas condições assépticas que o fornecedor garante.

6. Bibliografia

- Abel-Santos, E. (2015). Endospores, Sporulation and Germination. *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*, 1–3, 163–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00009-3>
- Ashtavinayak, P., Elizabeth, H. (2016). Review: Gram negative bacteria in brewing. *Advances in Microbiology*, 06(03), 195–209. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.63020>
- Breda, C., Barros, A., Gouvinhas, I. (2022). Characterization of bioactive compounds and antioxidant capacity of Portuguese craft beers. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100473>
- Correia, P. (2019). *Otimização do método de dry-hopping em contexto microcervejeiro*. <http://hdl.handle.net/10773/30036>
- Neto, L., Bossi, M., Luiz, L., Ramos, G. (2017). Aplicação do plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em uma cervejaria artesanal (Application of a Plan of Hazard Analysis and Critical Control Points in an artisanal brewery). *Brazilian Journal of Production Engineering*, 3, 46–66.
- Dragone, G., Mussatto, S., Nogueira, A., Silva, J. (2008). Review: Beer production - Spoilage microorganisms and detection methods. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10(4), 240–251.

- Ehlers, S., Merrill, S. (2022). *Staphylococcus saprophyticus*. <https://doi.org/10.32388/m8m7li>
- Garcia, B. (2019). *Estudo do efeito da brassagem no perfil do mosto de uma cerveja Weiss*. 1–67.
- Guerreiro, M. (2018). *Craft beer: from fermentation monitoring and optimization to microbiological quality control programme*. 1–47.
- Harrison, M., Jr., JB (2017). *Beer/Brewing*. 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13014-6>
- Konuray, G., Erginkaya, Z. (2018). *Potential use of Bacillus coagulans in the food industry*. *Foods* 7(6), 1-10. <https://doi.org/10.3390/foods7060092>
- Kordialik-Bogacka, E. (2022). Biopreservation of beer: Potential and constraints. *Biotechnology Advances*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2022.107910>
- López, M., Roche, E., Rodríguez, E. (2020). Contaminant microbiota in craft beers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1181–1186. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2020.9.6.1181-1186>
- Nabiça, V. (2019). *Desenvolvimento de um plano HACCP para uma unidade de produção de cerveja artesanal*. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/1408>
- Parihar, H. S. (2014). *Bacillus cereus*. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 353–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00997-0>
- Portaria 1/96 de 3 de Janeiro. (1996). *Diário Da República n.º 2/1996*, 8–9.
- Rocha, P. (2015). *Projeto de um Laboratório na Cervejeira Sovina*.
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2017). *Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota* *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3):462-473 <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
- Rodríguez, M., Rodríguez, A., Andrade, M., Bermúdez, E., Córdoba, J. (1996). *Staphylococcus*. *Laboratory Models for Foodborne Infections*, 209–221. <https://doi.org/10.1201/9781315120089-13>
- Teixeira, M. (2014). *Melhoria do sistema gestão da qualidade microbiológica da Filtração de cerveja*.

7. Anexos

Anexo 1 - Resultados da amostragem de dia 10/05

- Enchimento de barril

- z2- entrada do tubo do tanque
- z5- click 1
- z6- click 2

- Tubo de amostragem

- z7- BBT 2

- Cerveja tanque

- C1 – cerveja PL195 retirada da torneira de amostragem do tanque BBT 2

- Cerveja garrafa

- C2 - cerveja IPA L1592

- Cerveja barril

- C3 - cerveja PL195 retirada do click 1
- C4 - cerveja PL195 retirada do click 2

Tabela 25 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 10 de maio.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
z2	10 ⁻¹	>150	>1500	>3,18
z5		0	n.d	n.d
z6		9	≅ 90	≅ 1,95
z7		88	880	2,94
c1	10 ⁰	22	220	2,34
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		
c2	10 ⁰	>150	463	2,67
	10 ⁻¹	43		
	10 ⁻²	8		
c3	10 ⁰	15	14,55	1,16
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻²	0		
c4	10 ⁰	56	56,36	1,75
	10 ⁻¹	6		
	10 ⁻²	0		

Tabela 26 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 10 de maio.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia															% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
			1			2			3			4			5						
Amostra	Diluição		cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
z2	10 ⁻¹	>150	+	-	-	+	+		+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	150	>1500	>3,18
z5		1	+	-	-		—			—			—			—		100%	1	<40	<1,60
z6		30	+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
z7		35	+	+		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+		60%	21	210	2,32
c1	10 ⁰	26	+	-	-	+	-	-	+	+		+	-	-	+	+		60%	15,6	23,3	1,37
	10 ⁻¹	10	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	10		
	10 ⁻²	3	+	-	-	+	-	-	+	-	-		—			—		100%	8		
c2	10 ⁰	8	+	+		+	+		+	-	-	+	+		+	+		20%	1,6	<4	<0,60
	10 ⁻¹	4	+	+		+	+		+	+		+	+			—		0%	0		
	10 ⁻²	0																—	0		
c3	10 ⁰	11	+	-	-		—			—			—			—		100%	11	11	1,04
	10 ⁻¹	—	placa ilegível, impossível recolher amostras das colónias															—	—		
	10 ⁻²	0																	—		
c4	10 ⁰	57	+	-	-	+	+		+	-	-	+	+		+	+		40%	22,8	29,45	1,47
	10 ⁻¹	24	+	-	-	+	-	-	+	+		+	+		+	+		40%	9,6		
	10 ⁻²	1	+	-	-		—			—			—			—		100%	1		

Tabela 27 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 10 de maio.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia										% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3		4		5					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram	cat	gram	cat	gram				
z2	10 ⁻¹	10	+		+		+		+		+		0%	0	n.d	n.d
z5		0	—										—	0	n.d	n.d
z6		5	+		+		+		+		-	-	0%	0	n.d	n.d
z7		64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%	0	n.d
c1	10 ⁰	8	+		-	+	+		-	+	-	+	40%	3,2	<4	<0,60
	10 ⁻¹	0	—										—	0		
	10 ⁻²	0	—										—	0		
c2	10 ⁰	20	-	-	+		+		-	+	-	+	40%	8	≅10,18	≅1,01
	10 ⁻¹	8	+		+		+		-	+	-	+	40%	3,2		
	10 ⁻²	8	+		+		+		+		+		0%	0		
c3	10 ⁰	27	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	60%	16,2	18,36	1,26
	10 ⁻¹	10	-	+	+		-	-	-	+	-	-	40%	4		
	10 ⁻²	0	—										—	0		
c4	10 ⁰	34	+		+		+		+		-	+	20%	6,8	≅6,8	≅0,83
	10 ⁻¹	44	+		+		+		+		—		0%	0		
	10 ⁻²	0	—										—	0		

Anexo 2 - Resultados da amostragem de dia 19/05

- CIP ao tanque CCT 21

- x1- porta
- x2- borracha
- x3- tubo

- CIP à spx (centrifugadora)

- x5- filtro
- x6- entrada
- x7- saída

- Cerveja em garrafa

- g1- cerveja L1594 retirada da garrafa 1
- g2- cerveja L1594 retirada da garrafa 2

Tabela 28 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio Rapid'Enterobacteriaceae, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 19 de maio.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
x1	10 ⁻¹	3	<40	<1,60
x2		0	n.d	n.d
x3		0	n.d	n.d
x5		0	n.d	n.d
x6		6	≅ 6	≅0,78
x7		0	n.d	n.d
g1		10 ⁰	28	29,1
	10 ⁻¹	4		
	10 ⁻²	0		
g2	10 ⁰	>150	210	2,32
	10 ⁻¹	21		
	10 ⁻²	0		

Tabela 29 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 19 de maio.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia															% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
			1			2			3			4			5						
Amostra	Diluição		cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
x1	10 ⁻¹	18	+	-	-	+	+		+	+		+	-	-	+	+		40%	7,2	≈72	≈1,86
x2		0	—															0%	0	n.d	n.d
x3		1	+			—			—			—			—			0%	0	n.d	n.d
x5		13	+			+			—			—			—			0%	0	n.d	n.d
x6		0	—															0%	0	n.d	n.d
x7		0	—															0%	0	n.d	n.d
g1		10 ⁰	130	+	-	+	+	+		+	-	+	+	-	+	+	-	+	0%	0	n.d
	10 ⁻¹	14	+	+		+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	0%	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		
g2	10 ⁰	>150	+	+		+	-	+	+	+		-			+	+		0%	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	56	+	+		+	+		+	-	+	+	+		+	+		0%	0		
	10 ⁻²	4	+	+		+	-	+	+	+		—			—			0%	0		

Anexo 3- Resultados da amostragem de dia 25/05

- CIP ao tanque CCT9

- zp- porta
- zb- borracha
- zt-tubo alto

- Garrafas vazias

- zg1- garrafa 1
- zg2- garrafa 2
- zg3- garrafa 3
- zg4- garrafa 4
- zg5- garrafa 5

- Cerveja em garrafa

- cl6g1- cerveja Lager L1596 retirada da garrafa 1
- cleg2 - cerveja Lager L1596 retirada da garrafa 2
- cl4g1- cerveja Lager L1614 retirada da garrafa 1
- cl4g2- cerveja Lager L1614 retirada da garrafa 2

Nota: As placas com o meio MRS não solidificaram, possivelmente, porque o agar poderá ter ficado depositado no fundo do frasco de preparação. Mesmo assim, as placas foram colocadas na estufa, sem se inverterm, mas não se verificou crescimento.

Tabela 31 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio Rapid'Enterobacteriaceae, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 25 de maio.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
zp	10 ⁻¹	1	<40	<1,60
zb		1	<40	<1,60
zt		1	<40	<1,60
zg1		0	n.d	n.d
zg2		0	n.d	n.d
zg3		0	n.d	n.d
zg4		2	<40	<1,60
zg5		1	<40	<1,60
cl6g1		10 ⁰	0	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		
cl6g2	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		
cl4g1	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		
cl4g2	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		

Tabela 32 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 25 de maio.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia															% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
			1			2			3			4			5						
Amostra	Diluição		cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
zp	10 ⁻¹	0	—															—	0	n.d	n.d
zb		0	—															—	0	n.d	n.d
zt		0	—															—	0	n.d	n.d
zi		8	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	0,8	6,4	≅64	≅1,81
zg1		0	—															—	0	n.d	n.d
zg2		0	—															—	0	n.d	n.d
zg3		0	—															—	0	n.d	n.d
zg4		0	—															—	0	n.d	n.d
zg5		0	—															—	0	n.d	n.d
cl6g1		10 ⁰	0	—															—	0	n.d
	10 ⁻¹	0	—															—	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		
cl6g2	10 ⁰	0	—															—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—															—	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		
cl4g1	10 ⁰	0	—															—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	1	+	+														0	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		
cl4g2	10 ⁰	0	—															—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—															—	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		

Anexo 4 - Resultados da amostragem de dia 31/05

- Enchimento de barril

- y3 - “click” da MUSA
- y4 - “click” da nortada usado no enchimento de cerveja MUSA
- y11 – entrada do tubo alto do tanque

- Tubo de amostragem

- y6 - tanque BBT 2 após aplicar a solução
- y7 - tanque BBT 2 antes de aplicar a solução
- y9 - tanque BBT 1 antes de aplicar a solução
- y10 - tanque BBT 1 após aplicar a solução

- Cerveja Tanque PL197

- pl1 – 1ª amostra retirada da torneira de amostragem do tanque BBT 1
- pl2 – 2ª amostra retirada da torneira de amostragem do tanque BBT 1

Tabela 33 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 31 de maio.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
y3		2	<40	<1,60
y4		78	780	2,89
y6		0	n.d	n.d
y7		3	<40	<1,60
y9		19	190	2,28
y10		2	<40	<1,60
y11		0	n.d	n.d
pl1		10 ⁰	138	128.18
	10 ⁻¹	3		
	10 ⁻²	0		
pl2	10 ⁰	3	<4	<0,60
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		

Tabela 34 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 31 de maio.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia															% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1			2			3			4			5						
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
y3		0	—															—	0	n.d	n.d
y4		72	+	-	+	+	-	+	+	-	+	—			—			0%	0	n.d	n.d
y6		0	—															—	0	n.d	n.d
y7		9	+	-	-	+	-	-	-	—			+	+	—			40%	4	<40	<1,60
y9		78	+	-	-	+	-	-	+	-	+	—			—			67%	52	520	2,72
y10		4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	—			—			100%	4	<40	<1,60
y11		35	+	-	-	+	-	-	—			—			—			100%	35	350	2,54
pl1		10 ⁰	—	—															—	—	n.d
	10 ⁻¹	4	+	-	+	-	—			—			—			0%	0				
	10 ⁻²	0	—															—	0		
pl2	10 ⁰	0	—															—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—															—	0		
	10 ⁻²	0	—															—	0		

Tabela 35 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 31 de maio.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia								% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3		4					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram	cat	gram				
y3		2	+		+			—		—	0%	0	n.d	n.d
y4		102	+		+		+			—	0%	0	n.d	n.d
y6		0	—								—	0	n.d	n.d
y7		1	-	+		—		—		—	100%	1	<40	<1,60
y9		73	+		+		-	+		—	33%	24	240	2,38
y10		5	+		+			—		—	0%	0	n.d	n.d
y11		0	—								—	0	n.d	n.d
pl1		10 ⁰	139	+		+		-	+	+	25%	35	35	1,54
	10 ⁻¹	17	+		+		+		+	0%	0			
	10 ⁻²	4	+			—		—		—	0%	0		
pl2	10 ⁰	23	+		+		+		—	0%	0	n.d	n.d	
	10 ⁻¹	4	+		+			—	—	0%	0			
	10 ⁻²	0	—								—			0

Anexo 5 - Resultados da amostragem de dia 07/06

- Enchimento de barril

- k1 - entrada do tubo baixo do tanque
- k2 - encaixe do “click”
- k3 - mangueira do “click”
- k4 - interior do “click”
- k5 – exterior do “click”

- CIP à bomba

- k6 - entrada
- k7 - saída

- Cerveja em tanque

- p2 - cerveja PL198 retirada do tubo alto do tanque BBT 2

- Cerveja em barril

- p3 - cerveja PL198 retirada do “click” de enchimento

Tabela 36 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 7 de junho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
k1	10 ⁻¹	0	n.d	n.d
k2		0	n.d	n.d
k3		0	n.d	n.d
k4		0	n.d	n.d
k5		0	n.d	n.d
k6		0	n.d	n.d
k7		0	n.d	n.d
p2	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
p3	10 ⁰	47	47	1,67
	10 ⁻¹	0		

Tabela 38 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 7 de junho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia								% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
			1		2		3		4					
Amostra	Diluição		cat	gram	cat	gram	cat	gram	cat	gram				
k1	10 ⁻¹	0	—								—	0	n.d	n.d
k2		0	—								—	0	n.d	n.d
k3		0	—								—	0	n.d	n.d
k4		4	-	+	+		-	+		—	67%	3	<40	<1,60
k5		0	—								—	0	n.d	n.d
k6		0	—								—	0	n.d	n.d
k7		0	—								—	0	n.d	n.d
p2	10 ⁰	0	—								—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	3	-	+	+		—		—	50%	2			
p3	10 ⁰	72	+		-	-	-	+	+	25%	18	18	1,26	
	10 ⁻¹	12	+		+		—		—	0%	0			

Anexo 6 - Resultados da amostragem de dia 15/06

- Enchimento de barril

- t18 – tubo alto do tanque BBT 2
- t2 - zona do “click” que encaixa no tanque
- t3- mangueira do “click”
- t4 - interior do “click”
- t5 - exterior do “click”

- Barril vazio

Barril 1

- t7- zona interior onde encaixa o “click”
- t8 - mangueira barril
- t9 - peça com orifícios
- t10 - fundo (centro)
- t11 - fundo (laterais)

Barril 2

- t13- zona interior onde encaixa o “click”
- t14- mangueira barril
- t15- peça com orifícios
- t16- fundo (centro)
- t17 - fundo (laterais)

- Cerveja em tanque

- ct - cerveja PL199 retirada do tubo alto do tanque BBT2

- Cerveja de barril

- cc - cerveja PL199 retirada do “click”

Tabela 39 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio Rapid'Enterobacteriaceae, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 15 de junho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
t2	10 ⁻¹	1	<40	<1,60
t3		0	n.d	n.d
t4		0	n.d	n.d
t5		0	n.d	n.d
t7		0	n.d	n.d
t8		0	n.d	n.d
t9		0	n.d	n.d
t10		0	n.d	n.d
t11		0	n.d	n.d
t13		0	n.d	n.d
t14		0	n.d	n.d
t15		0	n.d	n.d
t16		0	n.d	n.d
t17		0	n.d	n.d
t18		2	<40	<1,60
ct	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
cc	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		

Tabela 40 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 15 de junho.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia									% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)	
Amostra	Diluição		1			2			3							
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram					
t2	10 ⁻¹	6	+	-	-	+	-	-	—			1	6	≅60	≅1,78	
t3		2	+	+		+	+		—			0	0	n.d	n.d	
t4		0	—									—	0	n.d	n.d	
t5		2	+	-	-	+	-	-	—			1	2	<40	<1,60	
t7		0	—									—	0	n.d	n.d	
t8		1	+	+		—			—			0	0	n.d	n.d	
t9		0	—									—	0	n.d	n.d	
t10		0	—									—	0	n.d	n.d	
t11		0	—									—	0	n.d	n.d	
t13		1	+	+		—			—			0	0	n.d	n.d	
t14		0	—									—	0	n.d	n.d	
t15		0	—									—	0	n.d	n.d	
t16		1	+	+		—			—			0	0	n.d	n.d	
t17		3	colónias demasiado pequenas para realizar os testes									—	3	<40	<1,60	
t18		2	+	-	-	—			—			1	2	<40	<1,60	
ct		10 ⁰	2	+	+		+	+		—			0	0	n.d	n.d
		10 ⁻¹	0	—									—	0		
cc		10 ⁰	0	—									—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—									0	0			

Tabela 41 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 15 de junho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia				% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2					
			cat	gram	cat	gram				
t2	10 ⁻¹	0	—				—	0	n.d	n.d
t3		0	—				—	0	n.d	n.d
t4		0	—				—	0	n.d	n.d
t5		0	—				—	0	n.d	n.d
t7		0	—				—	0	n.d	n.d
t8		0	—				—	0	n.d	n.d
t9		0	—				—	0	n.d	n.d
t10		0	—				—	0	n.d	n.d
t11		0	—				—	0	n.d	n.d
t13		0	—				—	0	n.d	n.d
t14		0	—				—	0	n.d	n.d
t15		0	—				—	0	n.d	n.d
t16		0	—				—	0	n.d	n.d
t17		0	—				—	0	n.d	n.d
t18		2	+		+		0%	0	n.d	n.d
ct	10 ⁰	1	+			0%	0	n.d	n.d	
	10 ⁻¹	0	—				—			0
cc	10 ⁰	0	—				—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—				—	0		

Anexo 7 - Resultados da amostragem de dia 17/06

- CIP à enchedora

- p1 - agulha 1
- p2 - agulha 2
- p3 - agulha 3
- p4 - agulha 4
- p5 - agulha 5
- p6 - agulha 6
- p7 - agulha 7
- p8 - agulha 8
- p12 - capsuladora

- Garrafas vazias

- p9 - garrafa 1
- p10 - garrafa 2
- p11 - garrafa 3

Placas meio GYC contaminadas - todas as placas estavam incontáveis. Não existem resultados para *Acetobacter* nas amostragens deste dia.

Tabela 42 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio Rapid'Enterobacteriaceae, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 17 de junho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
p1	10 ⁻¹	0	n.d	n.d
p2		0	n.d	n.d
p3		0	n.d	n.d
p4		0	n.d	n.d
p5		0	n.d	n.d
p6		2	<40	<1,60
p7		0	n.d	n.d
p8		1	<40	<1,60
p9		0	n.d	n.d
p10		0	n.d	n.d
p11		0	n.d	n.d
p12		60	600	2,77

Tabela 43 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 17 de junho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia								% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3		4					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram	cat	gram				
p1	10 ⁻¹	0	—								—	0	n.d	n.d
p2		0	—								—	0	n.d	n.d
p3		0	—								—	0	n.d	n.d
p4		0	—								—	0	n.d	n.d
p5		0	—								—	0	n.d	n.d
p6		0	—								—	0	n.d	n.d
p7		0	—								—	0	n.d	n.d
p8		1	-	+	—	—	—	—	—	—	100%	1	<40	<1,60
p9		0	—								—	0	n.d	n.d
p10		0	—								—	0	n.d	n.d
p11		0	—								—	0	n.d	n.d
p12		4	+		+		+		+		0%	0	n.d	n.d

Anexo 8 - Resultados da amostragem de dia 24/06

- Enchimento de barril

- j1- entrada do tubo alto do tanque CCT7
- j2- zona do “click” que encaixa no tanque
- j3- mangueira do “click”
- j4- interior do “click”
- j5- exterior do “click”

- Cerveja em tanque

- s1-cerveja Musa Blondie 3 retirada do tubo alto

- Cerveja em barril

- s2- cerveja Musa Blondie 3 retirada do “click”

- Ação da desinfecção com San 318 DR realizada no tubo alto

BBT1

- j6- 0 min
- j7- 5 min
- j8- 10 min
- j9- 15 min

BBT2

- j10- 0 min
- j11- 5 min
- j12- 10 min
- j13- 15 min

Tabela 44 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 24 de junho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
j1	10 ⁻¹	0	n.d	n.d
j2		1	<40	<1,60
j3		0	n.d	n.d
j4		0	n.d	n.d
j5		0	n.d	n.d
j6		69	690	2,84
j7		2	<40	<1,60
j8		1	<40	<1,60
j9		0	n.d	n.d
j10		1	<40	<1,60
j11		0	n.d	n.d
j12		0	n.d	n.d
j13		2	<40	<1,60
s1	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		
s2	10 ⁰	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0		
	10 ⁻²	0		

Tabela 45 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - dia 24 de junho.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	Colónia									% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
			1			2			3						
Amostra	Diluição		cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
j1	10 ⁻¹	23	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	23	230	2,36
j2		0	—									—	0	n.d	n.d
j3		2	+	-	-	+	-	-	—			100%	2	<40	<1,60
j4		0	—									—	0	n.d	n.d
j5		0	—									—	0	n.d	n.d
j6		>150	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	>150	>1500	>3,18
j7		0	—									—	0	n.d	n.d
j8		16	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	16	160	2,20
j9		12	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	12	120	2,08
j10		7	+	-	-	+	-	-	—			100%	7	≈70	≈1,85
j11		7	-			-			—			0%	0	n.d	n.d
j12		0	—									—	0	n.d	n.d
j13		0	—									—	0	n.d	n.d
s1	10 ⁰	0	—									—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—									—	0		
	10 ⁻²	1	+	+		—			—			0%	0		
s2	10 ⁰	0	—									—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—									—	0		
	10 ⁻²	0	—									—	0		

Tabela 46 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - dia 24 de junho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	Colónia						% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram				
j1	10 ⁻¹	1	-	-					0%	0	n.d	n.d
j2		0			—				—	0	n.d	n.d
j3		0			—				—	0	n.d	n.d
j4		0			—				—	0	n.d	n.d
j5		0			—				—	0	n.d	n.d
j6		22	-	-	+		-	+	33%	7	≅70	≅1,85
j7		0			—				—	0	n.d	n.d
j8		0			—				—	0	n.d	n.d
j9		0			—				—	0	n.d	n.d
j10		0			—				—	0	n.d	n.d
j11		0			—				—	0	n.d	n.d
j12		0			—				—	0	n.d	n.d
j13		0			—				—	0	n.d	n.d
s1	10 ⁰	0			—			—	0	n.d	n.d	
	10 ⁻¹	0			—			—	0			
	10 ⁻²	0			—			—	0			
s2	10 ⁰	0			—			—	0	n.d	n.d	
	10 ⁻¹	0			—			—	0			
	10 ⁻²	0			—			—	0			

Anexo 9 - Resultados da amostragem de dia 30/06

- CIP à enchedora

- f1 - agulha 1
- f2 - agulha 2
- f3 - agulha 3
- f4 - agulha 4
- f5 - agulha 5
- f6 - agulha 6
- f7 - agulha 7
- f8 - agulha 9
- f24 – capsuladora

- Caricas

- f9 - carica 1
- f10 - carica 2
- f11 - carica 3
- f12 - carica 4
- f13 - carica 5
- f14 - carica 6
- f15 - carica 7

- Garrafas vazias

- f16 - garrafa 1
- f17 - garrafa 2
- f18 - garrafa 3
- f19 - garrafa 4
- f20 - garrafa 5
- f21 - garrafa 6
- f22 - garrafa 7
- f23 - garrafa 8

- CIP à spx (centrifugadora)

- f25 - entrada
- f26 - saída
- f27 - filtro

- CIP ao tanque CCT 3

- f28 - porta
- f29 - borracha
- f30 - entrada do tubo alto

- Cerveja em tanque

- d4 - cerveja L1637 retirada do tubo alto

- Cerveja em garrafa

- d5 - cerveja L1637 garrafa 1
- d6 - cerveja L1637 garrafa 2
- d7 - cerveja L1637 garrafa 3

Tabela 47 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 30 de junho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição			
f1	10 ⁻¹	1	<40	<1,60
f2		0	n.d	n.d
f3		0	n.d	n.d
f4		0	n.d	n.d
f5		1	<40	<1,60
f6		0	n.d	n.d
f7		0	n.d	n.d
f8		0	n.d	n.d
f9		1	<40	<1,60
f10		0	n.d	n.d
f11		2	<40	<1,60
f12		0	n.d	n.d
f13		0	n.d	n.d
f14		0	n.d	n.d
f15		0	n.d	n.d
f16		0	n.d	n.d
f17		0	n.d	n.d
f18		0	n.d	n.d
f19		0	n.d	n.d
f20		1	<40	<1,60
f21		0	n.d	n.d
f22		0	n.d	n.d
f23		0	n.d	n.d
f24		>150	>1500	>3,18
f25		0	n.d	n.d
f26		0	n.d	n.d
f27		1	<40	<1,60
f28		0	n.d	n.d
f29		0	n.d	n.d
f30		0	n.d	n.d
d4	10 ⁰	>150	320	2,51
	10 ⁻¹	32		
d5	10 ⁰	16	16	1,20
	10 ⁻¹	0		
d6	10 ⁰	>150	>1500	>3,18
	10 ⁻¹	0		
d7	10 ⁰	51	52,73	1,72
	10 ⁻¹	7		

Tabela 48 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 30 de junho.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	colónia									% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1			2			3						
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
f1	10 ⁻¹	9	+	+		+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
f2		39	+	-	-	+	+		+	-	-	67%	26	260	2,41
f3		16	+	-	-	+	-	-	+	+		67%	11	110	2,04
f4		22	-			+	-	-	-			33%	7	≈70	≈1,85
f5		25	+	+		+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
f6		34	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	34	340	2,53
f7		41	+	+		+	-	-	+	+		33%	14	140	2,15
f8		33	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	33	330	2,52
f9		>150	—									—	>150	>1500	>3,18
f10		54	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	54	540	2,73
f11		5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	5	≈ 50	≈ 1,70
f12		3	+	+		+	+					0%	0	n.d	n.d
f13		33	+	+		+	+					0%	0	n.d	n.d
f14		0	—									—	0	n.d	n.d
f15		5	+	+								0%	0	n.d	n.d
f16		2	+	+								0%	0	n.d	n.d
f17		0	—									—	0	n.d	n.d
f18		11	+	-	-	+	-	-				100%	11	110	2,04
f19		1	+	+								0%	0	n.d	n.d
f20		1	+	-	-							100%	1	<40	<1,60
f21		1	-									0%	0	n.d	n.d
f22		0	—									—	0	n.d	n.d
f23		2	+	-	-	+	-	-				100%	2	<40	<1,60

f24		150	+ - -	+ - +	+ - +	33%	50	500	2,70
f25		42	+ - -	-	+ +	33%	14	140	2,15
f26		30	-	+ +	+ +	0%	0	n.d	n.d
f27		35	+ +	+ +	+ - -	33%	12	120	2,08
f28		6	+ - -	—	—	100%	6	≅60	≅1,78
f29		11	+ - -	+ - -	-	67%	7	≅70	≅1,85
f30		13	-	+ +	+ - -	33%	4	<40	<1,60
d4	10 ⁰	0	—			—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	0	—			—	0		
d5	10 ⁰	0	—			—	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	3	+ +	—	—	0%	0		
d6	10 ⁰	28	+ +	+ - -	—	50%	14	20	1,30
	10 ⁻¹	25	+ - -	+ +	+ +	33%	8		
d7	10 ⁰	—	agar caiu			—	—	—	—
	10 ⁻¹	—				—	—		

Tabela 49 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 30 de junho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	colónia									% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1			2			3						
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
f1	10 ⁻¹	0				—						—	0	n.d	n.d
f2		0				—						—	0	n.d	n.d
f3		0				—						—	0	n.d	n.d
f4		0				—						—	0	n.d	n.d
f5		0				—						—	0	n.d	n.d
f6		0				—						—	0	n.d	n.d
f7		0				—						—	0	n.d	n.d
f8		0				—						—	0	n.d	n.d
f9		0				—						—	0	n.d	n.d
f10		0				—						—	0	n.d	n.d
f11		0				—						—	0	n.d	n.d
f12		0				—						—	0	n.d	n.d
f13		0				—						—	0	n.d	n.d
f14		0				—						—	0	n.d	n.d
f15		0				—						—	0	n.d	n.d
f16		0				—						—	0	n.d	n.d
f17		0				—						—	0	n.d	n.d
f18		0				—						—	0	n.d	n.d
f19		0				—						—	0	n.d	n.d
f20		0				—						—	0	n.d	n.d
f21		0				—						—	0	n.d	n.d
f22		0				—						—	0	n.d	n.d
f23		0				—						—	0	n.d	n.d

f24		0	—						—	0	n.d	n.d		
f25		0	—						—	0	n.d	n.d		
f26		0	—						—	0	n.d	n.d		
f27		0	—						—	0	n.d	n.d		
f28		0	—						—	0	n.d	n.d		
f29		0	—						—	0	n.d	n.d		
f30		0	—						—	0	n.d	n.d		
d4	10 ⁰	>150	+			+			+		0	0	n.d	n.d
	10 ⁻¹	>150	+			+			+		0	0		
d5	10 ⁰	0	—						—	0	n.d	n.d		
	10 ⁻¹	80	+			+			+				0	0
d6	10 ⁰	>150	colónias muito pequenas para realização de testes						—	—	n.d	n.d		
	10 ⁻¹	>150	+			+			+				0	0
d7	10 ⁰	>150	colónias muito pequenas para realização de testes						—	—	n.d	n.d		
	10 ⁻¹	>150	+			+			+				0	0

Anexo 10 - Resultados da amostragem de dia 06/07

- CIP ao tanque CCT9

- v1 – porta
- v2 – borracha
- v3 – tubo alto

- CIP ao tanque CCT7

- v4 – porta
- v5 – borracha
- v6 – tubo alto

-Atuação da solução de Mida San 318 DR

No tanque CCT1

- v7 – análise realizada antes da aplicação da solução
- v8 - análise realizada após 5 minutos da aplicação da solução
- v9 - análise realizada após 10 minutos da aplicação da solução
- v10 - análise realizada após 15 minutos da aplicação da solução

No tanque CCT3

- v11 – análise realizada antes da aplicação da solução
- v12 - análise realizada após 5 minutos da aplicação da solução
- v13 - análise realizada após 10 minutos da aplicação da solução
- v14 - análise realizada após 15 minutos da aplicação da solução

No tanque CCT4

- v15 - análise realizada antes da aplicação da solução
- v16 - análise realizada após 5 minutos da aplicação da solução
- v17 - análise realizada após 10 minutos da aplicação da solução
- v18 - análise realizada após 15 minutos da aplicação da solução

- Atuação da solução de Mida Chriox 5 (1 %)

No tanque CCT6

- v19 - análise realizada antes da aplicação da solução
- v20 - análise realizada após 5 minutos da aplicação da solução
- v21 - análise realizada após 10 minutos da aplicação da solução
- v22 - análise realizada após 15 minutos da aplicação da solução

No tanque CCT10

- v25- análise realizada antes da aplicação da solução
- v26 - análise realizada após 5 minutos da aplicação da solução
- v27 - análise realizada após 10 minutos da aplicação da solução
- v28 - análise realizada após 15 minutos da aplicação da solução

- Cerveja em tanque

- i1 - cerveja PL198 retirada do tubo alto

- Cerveja em barril

- i2 - cerveja PL198 retirada do barril

Tabela 50 Contagem de colónias pertencentes à família Enterobacteriaceae em placas de meio Rapid'Enterobacteriaceae, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 6 de julho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)	
Amostra	Diluição				
v1	-1	0	n.d	n.d	
v2		0	n.d	n.d	
v3		0	n.d	n.d	
v4		0	n.d	n.d	
v5		0	n.d	n.d	
v6		0	n.d	n.d	
v7		0	n.d	n.d	
v8		0	n.d	n.d	
v9		0	n.d	n.d	
v10		0	n.d	n.d	
v11		1	<40	<1,60	
v12		0	n.d	n.d	
v13		0	n.d	n.d	
v14		0	n.d	n.d	
v15		0	n.d	n.d	
v16		0	n.d	n.d	
v17		0	n.d	n.d	
v18		0	n.d	n.d	
v19		0	n.d	n.d	
v20		0	n.d	n.d	
v21		0	n.d	n.d	
v22		0	n.d	n.d	
v25		13	130	2,11	
v26		0	n.d	n.d	
v27		0	n.d	n.d	
v28		1	n.d	n.d	
i1		0	>150	1800	3,26
		-1	>150		
	-2	18			
I2	0	>150	>15000	>4,18	
	-1	>150			
	-2	>150			

Tabela 51 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 6 de julho.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial										% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostr a	Diluiçã o		1			2			3						
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
v1	-1	12	+	+		-			+	-	-	33%	4	<40	<1,60
v2		6	-			+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
v3		14	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	14	140	2,15
v4		14	+	-	-	-			+	-	-	67%	9	≅90	≅1,95
v5		7	+	-	-	-			+	-	-	67%	5	≅ 50	≅1,70
v6		3	+	-	-		-			-		100%	3	<40	<1,60
v7		14	-			+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
v8		25	-			+	-	-	-			33%	8	≅80	≅1,90
v9		16	+	+		-			+	-	-	33%	5	≅ 50	≅1,70
v10		27	-			+	+		+	-	-	33%	9	≅90	≅1,95
v11		17	+	-	-	+	+		+	-	-	67%	11	110	2,05
v12		13	+	-	-		-			-		100%	13	130	2,11
v13		7	-			+	-	-	+	-	-	67%	5	≅ 50	≅1,70
v14		10	+	-	-	+	-	-	-			67%	7	≅70	≅1,85
v15		23	+	-		+	-		-			67%	15	150	2,18
v16		24	-			+	+		+	+		0%	0	n.d	n.d
v17		17	+	-	-	+	-	-	+	+		67%	16	160	2,20
v18		6	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	17	170	2,23
v19		7	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	6	≅60	≅ 1,78
v20		6	-			+	+		+	-	-	33%	2	<40	<1,60
v21		16	+	+		-			+	+		0%	0	n.d	n.d
v22		14	-			-			+	-	-	33%	5	≅ 50	≅1,70
v25		>150	colónias muito pequenas para realização de testes									—	>150	>1500	>3,18

v26		7	+ - -			+ - -			+ - -			100%	2	<40	<1,60	
v27		7	+ - -			+ - -			+ - -			100%	8	≅80	≅1,90	
v28		7	+ - -			+ - -			+ - -			100%	7	≅70	≅1,85	
i1	0	>150	colónias muito pequenas para realização de testes										—	>150	236,4	2,37
	-1	27	+	-	-	-			+	-	-	67%	18			
	-2	15	-			+	-	-	—			50%	8			
i2	0	>150	colónias muito pequenas para realização de testes										—	>150	>15000	>4,18
	-1	>150	colónias muito pequenas para realização de testes										—	>150		
	-2	>150	colónias muito pequenas para realização de testes										—	>150		

Tabela 52 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 6 de julho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial							% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram				
v1	-1	0			—			—	0	n.d	n.d	
v2		0			—			—	0	n.d	n.d	
v3		0			—			—	0	n.d	n.d	
v4		0			—			—	0	n.d	n.d	
v5		0			—			—	0	n.d	n.d	
v6		0			—			—	0	n.d	n.d	
v7		0			—			—	0	n.d	n.d	
v8		0			—			—	0	n.d	n.d	
v9		0			—			—	0	n.d	n.d	
v10		0			—			—	0	n.d	n.d	
v11		1	-	+					100%	1	<40	<1,60
v12		0			—				—	0	n.d	n.d
v13		0			—				—	0	n.d	n.d
v14		0			—				—	0	n.d	n.d
v15		0			—				—	0	n.d	n.d
v16		0			—				—	0	n.d	n.d
v17		0			—				—	0	n.d	n.d
v18		0			—				—	0	n.d	n.d
v19		0			—				—	0	n.d	n.d
v20		0			—				—	0	n.d	n.d
v21		0			—				—	0	n.d	n.d
v22		0			—				—	0	n.d	n.d
v25		13	+		-	+	+		33%	4	<40	<1,60

v26		0	—	—	0	n.d	n.d
v27		0	—	—	0	n.d	n.d
v28		0	—	—	0	n.d	n.d
i1	0	>150	—	—	>150	>15000	>4,18
	-1	>150	—	—	>150		
	-2	>150	—	—	>150		
I2	0	>150	—	—	>150	>15000	>4,18
	-1	>150	—	—	>150		
	-2	>150	—	—	>150		

Anexo 11 - Resultados da amostragem de dia 07/07

- Enchimento de barril

- H1- entrada do tubo alto do tanque CCT9
- H2- zona do “click” que encaixa no tanque
- H3- mangueira do “click”
- H4- interior do “click”
- H5- exterior do “click”

- CIP ao tanque CCT4

- H6 - porta
- H7 - borracha
- H8 - tubo alto

- CIP à bomba

- H9 - entrada
- H10 - saída

- CIP à spx

- H13 - entrada
- H14- saída
- H15 – filtro
- K6 – água retirada da torneira de amostragem

- Barril vazio

Barril 1

- H16- zona interior onde encaixa o “click”
- H17 - mangueira barril
- H18 - peça com orifícios
- H19 - fundo (centro)
- H20 - fundo (laterais)

Barril 2

- H21- zona interior onde encaixa o “click”
- H22 - mangueira barril

- H23 - peça com orifícios
- H24 - fundo (centro)
- H25 - fundo (laterais)

- Cerveja em tanque

- K1 - cerveja IPA 71 retirada do tubo alto

- Cerveja em barril

- K2 - cerveja IPA 71 retirada do “click”

- Cerveja em garrafa

- K7 - cerveja L1637 garrafa 1
- K8 - cerveja L1637 garrafa 2

Tabela 53 Contagem de colónias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* em placas de meio *Rapid'Enterobacteriaceae*, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 7 de julho.

<i>Enterobacteriaceae</i>		Contagem	UFC/mL	Log(UFC/mL)	
Amostra	Diluição				
H1	-1	0	n.d	n.d	
H2		0	n.d	n.d	
H3		0	n.d	n.d	
H4		0	n.d	n.d	
H5		0	n.d	n.d	
H6		0	n.d	n.d	
H7		0	n.d	n.d	
H8		0	n.d	n.d	
H9		0	n.d	n.d	
H10		0	n.d	n.d	
H13		0	n.d	n.d	
H14		0	n.d	n.d	
H15		0	n.d	n.d	
H16		0	n.d	n.d	
H17		0	n.d	n.d	
H18		0	n.d	n.d	
H19		0	n.d	n.d	
H20		0	n.d	n.d	
H21		0	n.d	n.d	
H22		0	n.d	n.d	
H23		0	n.d	n.d	
H24		0	n.d	n.d	
H25		0	n.d	n.d	
k1		0	0	n.d	n.d
		1	0		
	2	0			
k2	0	>150	160	2,20	
	1	16			
	2	0			
k6	0	0	n.d	n.d	
	1	0			
	2	0			
k7	0	0	n.d	n.d	
	1	0			
	2	0			
k8	0	0	n.d	n.d	
	1	0			
	2	0			

Tabela 54 Contagem de colónias em placas de meio GYC, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 7 de julho.

<i>Acetobacter</i>		Contagem inicial	colónia									% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1			2			3						
			cat	oxi	gram	cat	oxi	gram	cat	oxi	gram				
H1	-1	0	—									—	0	n.d	n.d
H2		0	—									—	0	n.d	n.d
H3		1	—									—	0	n.d	n.d
H4		6	-			n.d	n.d				—	0%	0	n.d	n.d
H5		2	-				n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H6		57	+	+		n.d	n.d				—	0%	0	n.d	n.d
H7		1	-				n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H8		0	—									0%	0	n.d	n.d
H9		2	-			n.d	n.d				—	0%	0	n.d	n.d
H10		3	+	+			n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H13		1	-				n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H14		3	-				n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H15		20	+	+			n.d				n.d	0%	0	n.d	n.d
H16		0	—									0%	0	n.d	n.d
H17		0	—									0%	0	n.d	n.d
H18		49	-			-					—	0%	0	n.d	n.d
H19		63	+	-	-						—	100%	63	630	2,80
H20		56	+	-	-	+	+				+ - -	67%	37	370	2,57
H21		55	+	-	-	+	+				—	50%	28	280	2,46
H22		79	+	+		+	-		-		+ - -	50%	40	400	2,60
H23		5	-			-					—	0%	0	n.d	n.d
H24		44	+	+		+	+				+ - -	0%	0	n.d	n.d
H25		0	—									0%	0	n.d	n.d

k1	0	31	+	+		+	+		—	0%	0	n.d	n.d		
	1	1	+	+				—	—	0%	0				
	2	0						—		0%	0				
k2	0	15	+	-	-	+	-	+	—	50%	8	8	0,90		
	1	5	-			+	-	+	—	0%	0				
	2	0						—		—	0				
k6	0	-							—	—	—	n.d	n.d		
	1	54	-			+	+		+	+	0%			0	
	2	57	+	-	+	+	-	+	—	0%	0				
k7	0	62	-			+	-	-	+	-	-	67%	41	54,5	1,74
	1	58	+	-	+	+	-	-	—			33%	19		
	2	38	-			+	+		-			0%	0		
k8	0	74	+	-	-	+	-	-	+	-	-	100%	74	88,3	1,94
	1	70	-			+	-	+	+	-	-	33%	23,1		
	2	17	+	+		+	+		—			0%	0		

Tabela 55 Contagem de colónias em placas de meio MRS, testes de confirmação e estimativa de colónias finais, respetivas Unidades Formadoras de Colónias por mililitro (UFC/mL) e seu logaritmo - 7 de julho.

<i>Lactobacillus</i>		Contagem inicial	colónia						% Colónias Confirmadas	Contagem final	UFC/mL	Log(UFC/mL)
Amostra	Diluição		1		2		3					
			cat	gram	cat	gram	cat	gram				
H1	-1	0	—						—	0	n.d	n.d
H2		0	—						—	0	n.d	n.d
H3		0	—						—	0	n.d	n.d
H4		0	—						—	0	n.d	n.d
H5		0	—						—	0	n.d	n.d
H6		0	—						—	0	n.d	n.d
H7		0	—						—	0	n.d	n.d
H8		0	—						—	0	n.d	n.d
H9		0	—						—	0	n.d	n.d
H10		0	—						—	0	n.d	n.d
H13		0	—						—	0	n.d	n.d
H14		0	—						—	0	n.d	n.d
H15		>150	colónias muito pequenas para realização de testes						—	>150	>15000	>4,18
H16		0	—						—	0	n.d	n.d
H17		0	—						—	0	n.d	n.d
H18		0	—						—	0	n.d	n.d
H19		0	—						—	0	n.d	n.d
H20		0	—						—	0	n.d	n.d
H21		0	—						—	0	n.d	n.d
H22		0	—						—	0	n.d	n.d
H23		0	—						—	0	n.d	n.d
H24		0	—						—	0	n.d	n.d
H25		0	—						—	0	n.d	n.d

k1	0	0	—			—	0	n.d	n.d
	1	0	—			—	0		
	2	0	—			—	0		
k2	0	>150	colónias muito pequenas para realização de testes			—	>150	inconclusivo	inconclusivo
	1	24	+	+	+	0	0		
	2	0	—			—	0		
k6	0	0	—			—	0	n.d	n.d
	1	0	—			—	0		
	2	0	—			—	0		
k7	0	10	+	+	+	0	0	n.d	n.d
	1	5	+	+	—	0	0		
	2	0	—			—	0		
k8	0	32	+	-	+	33%	10,6	10,6	1,03
	1	1	+	—	—	0	0		
	2	0	—			—	0		