



CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DETERIORANTE E PATOGENICA EM CHOPE ARTESANAL

Eduardo Thiago Slomp ⁽¹⁾
Bettina Rachel Wetzstein ⁽²⁾
Marian Natalie Meisen ⁽³⁾
Lisiane Fernandes de Carvalho ⁽⁴⁾
Carolina Krebs de Souza ⁽⁵⁾

Resumo

O consumo e produção do chope veem aumentando consideravelmente em comparação a cerveja, sendo uma bebida com sabor característico e não apresentando legislação específica. O propósito deste estudo foi verificar a qualidade microbiológica (deteriorantes e patogênicos) de chope artesanal produzido e comercializado no Vale do Itajaí (SC), através das contagens de bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, bactérias lácticas, coliformes totais e coliformes termotolerantes (*Escherichia Coli*). Os resultados obtidos foram satisfatórios, não indicando a presença de coliformes totais e termotolerantes; contaminação moderada de bolores e leveduras, aeróbios mesófilos e bactérias lácticas. Sendo assim confirmou-se que a higienização dos equipamentos que entram em contato com o produto, está sendo desenvolvida corretamente e o produto comercializado é indicado para o consumo, pois não apresenta riscos para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Microrganismos, Patogênicos, Deteriorantes, Chope Artesanal.

1 Introdução

O chope é uma bebida fermentada presente em grande parte das casas brasileiras e passou por muitas transformações para apresentar as características que conhecemos hoje. O seu nome vem da palavra alemã *Schoppen*, que significa ‘copo de meio litro’ e é fabricado há mais de cinco milhões de anos, onde em tempos remotos era utilizado como moeda e produto de beleza (NETA et al., 2005).

O processo de fabricação desta bebida é idêntico ao da cerveja, sendo a única diferença a etapa de pasteurização, onde a cerveja é pasteurizada por uma determinada temperatura e tempo para que receba um “choque” térmico. Este processo foi desenvolvido pelo cientista *Loius Pasteur* em 1864 com a finalidade de aumentar a estabilidade microbiológica do produto e também o seu tempo de duração. Atualmente, as grandes indústrias pasteurizam o chope para garantir a qualidade microbiológica, retirando assim a única diferença no processo de fabricação entre as bebidas (SCHEFFER et al, 2013).

As matérias primas para a produção de cerveja são a água, cereais malteados, o lúpulo, e a levedura cervejeira. A água é considerada o ingrediente principal, pois corresponde a 93% da formulação, deve ser inócua, livre de contaminações e dura, com alto teor de cálcio e magnésio, para servir de nutriente para as leveduras. A cevada é o principal cereal utilizado no processo de malteação.

A malteação é o processo da germinação controlada dos grãos e se faz necessária para obtenção de enzimas que irão atuar posteriormente no processo de brassagem para produção de cerveja. Segundo Patzak (2001), o lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta trepadeira e a flor da fêmea

¹ Mestrando do Programa de Pós Graduação de Engenharia Química - Universidade Regional de Blumenau

² Graduando do curso de Engenharia Química – Universidade Regional de Blumenau

³ Técnica (Mestre) do Laboratório de Ensaios Microbiológicos – Universidade Regional de Blumenau

⁴ Professora Doutora do Departamento de Engenharia Química – Universidade Regional de Blumenau

⁵ Professora Doutora do Departamento de Engenharia Química – Universidade Regional de Blumenau



(cone) é um produto essencial para a indústria cervejeira. Para adição de lúpulo, é utilizada a sua flor, que é desidratada, possui características amargas e serve como conservante no mosto. Segundo Mayolle et al, 2012 a cevada para aplicação em indústria cervejeira requer um teor inicial de água em torno de 13% p/p. A levedura utilizada é a *Sacharomyces cerevisiae*, sendo o último ingrediente a ser adicionado. (REBELLO, 2009).

Com a chegada da cevada na indústria, inicia-se o processo de malteação, onde a cevada deve ser macerada, que consiste em cobrir os grãos com água até o entumescimento dos mesmos, retira-se a água e a temperatura é elevada a 30°C por 30 a 60 minutos. Com estas etapas, o grão é ativado, liberando a radícula externa, com o auxílio do ar frio e seco, interrompe-se a germinação. Com isto, o processo é paralisado, só retornando com o aumento de umidade. (REBELLO, 2009)

Já o processo de fabricação da cerveja consiste em misturar o malte moído com água, aquecer para facilitar a dissolução e filtrar para a retirada de cascas e lavagem da torta, assim temos a formação do mosto. Após este processo, adiciona-se o lúpulo ao mosto e novamente aquecido para a dissolução completa do lúpulo e esterilização do mosto. Para existir condições ideais para as leveduras atuarem, deve-se resfriar a uma temperatura de 9 a 15°C, seguido de aeração. Adiciona-se a levedura para iniciar o processo de fermentação, com uma temperatura controlada no geral de 10 a 25°C (ROSA et al., 2014).

Há uma classificação da cerveja segundo sua fermentação, alta fermentação (ale) e baixa fermentação (lager). Segundo Bamforth (1998), as são feitas por fermentação do mosto de cerveja a 15-25° C, enquanto que lagers são tradicionalmente feitos por fermentação a temperaturas mais baixas, 6-14°C (Bamforth, 1998).

A exploração de microrganismos para a produção de alimentos e de bebidas fermentadas é uma das mais antigas tecnologias aplicadas a alimentos conhecida pelo homem (FOX, 1993).

Concluída a fermentação, a maior parte da levedura é separada por decantação e tem início a maturação, onde o produto permanece de 6 a 20 dias, dependendo da cervejaria, com uma temperatura controlada de 0°C. Ao final desta fase, o aroma e sabor da cerveja já estão praticamente definidos. Para a retirada de partículas em suspensão, adiciona-se um material adsorvente chamado terra diatomácea, e esta filtração não altera a composição e o sabor da cerveja. Após estes processos, a cerveja é estocada em tanques, onde passa pelas etapas de enchimento, pasteurização, rotulagem e paletização. O chope apenas passa pela enchedora e é encaminhado para comercialização, sendo a única diferença entre a cerveja e o chope (ROSA et al, 2014).

Segundo VRIESEKOP et al, 2012 a cerveja é intrinsecamente resistente ao desenvolvimento de microrganismos patogênicos, devido a uma combinação de fatores inibidores e a deterioração. A presença de etanol [até 10% (v/v)], lúpulo (*Humulus lupulus*) amargor compostos (aproximadamente 17-55 ppm iso- α -ácidos), pH baixo (na faixa de 3,9-4,4), elevada concentração de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5 % p/p), baixo teor de oxigênio (<0,1 ppm) e a já proferida de substâncias nutritivas protegem a cerveja contra a infecção por mais microrganismos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar e quantificar a microbiota patogênica e deteriorante de chope artesanal, para verificar a qualidade e a segurança do produto comercializado.

2 Materiais e Métodos

Neste projeto, foram analisadas 04 marcas de chope produzidos no estado de Santa Catarina e as amostras foram coletadas no período de outubro a dezembro de 2014 em estabelecimentos da cidade de Blumenau/SC. Serão apresentados os dados das marcas A, B, C e D na qual foram realizadas duas coletas (duas datas) ao longo do tempo de estudo, sendo estas coletas realizadas em duplicata.

As coletas foram efetuadas solicitando um copo de chope, como seria consumido normalmente e colocando esta amostra do copo em frascos estéreis e vazios, sempre em duplicata.



Para a realização dos ensaios, foi utilizada a metodologia descrita no livro: Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água (SILVA et al, 2010), que é baseada em *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (DOWNES e ITO, 2001). Os ensaios realizados consistiram na contagem de aeróbios mesófilos e bactérias lácticas, coliformes totais, coliformes Termotolerantes e *E.coli*.

2.1 Contagem de Aeróbios Mesófilos e Bactérias Lácticas em Placas

Diluiu-se 25 mL da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1% e homogeneizou-se, obtendo-se a primeira diluição. Para duas placas de Petri estéreis e separadas inoculou-se 1 mL, e também 1 mL para um tubo de diluição, que possuía 9 mL de água peptonada, obtendo-se a segunda diluição. Deste tubo de diluição, inoculou-se 1 mL para duas placas de Petri separadas, estéreis e vazias e mais 1mL para o terceiro tubo de diluição, que possuía 9 mL de água peptonada homogeneizou-se e dessa solução, inoculou-se 1 mL para duas placas de Petri separadas, estéreis e vazias.

Após todo este processo, separaram-se as placas inoculadas para utilizar dois ágar diferentes, metade das placas foi o ágar Man Ragoza & Sharpel (MRS), em uma quantidade de 12 a 15 mL previamente fundido e resfriado a 44-46°C. E na outra metade foi utilizado o Ágar Padrão para Contagem (PCA), com a mesma quantidade e temperatura do MRS. Em algumas amostras mais diluições foram necessárias, repetindo-se os passos citados anteriormente de inoculação em tubos com 9mL de água peptonada.

Depois desse processo, iniciou-se a etapa de incubação, onde as placas de Petri são enviadas para uma estufa com uma temperatura de 35±1°C pelo período de 48 horas. Após este período, procedeu-se a leitura das colônias com o auxílio de um contador de colônias. O resultado encontrado é calculado pela multiplicação da contagem das colônias e o inverso da diluição inoculada e foi expresso em Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL).

2.2 Contagem de Bolores e Leveduras

Das mesmas diluições citadas anteriormente, inoculou-se 0,1 mL para placas de Petri previamente separadas com ágar Sabouraud, o inóculo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após esse processo, as placas foram incubadas a temperatura de 23-25°C entre 3 a 5 dias.

Após este período, procedeu-se a leitura de colônias com o auxílio do contador de colônias. O resultado encontrado é calculado pela multiplicação da contagem das colônias e o inverso da diluição inoculada e como o volume inoculado é 10 vezes menor, o resultado foi multiplicado por 10 e expresso em UFC/mL.

2.3 Contagem de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes *Escherichia coli*

Diluiu-se 25 mL da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1%, homogeneizou-se, obtendo-se a primeira diluição, inoculou-se 1 mL para três tubos que possuíam 10 mL da solução Lauril Sulfato Triptose (LST). Após esse processo, passou-se 1 mL para 9mL de água peptonada, homogeneizou-se e inoculou-se 1 mL da diluição em três tubos que contém LST, obtendo-se a segunda diluição.

Então, passou-se 1 mL para um tubo de diluição, que contém 9 mL de água peptonada, homogeneizou-se e dessa solução, inoculou-se 1 mL em três tubos que contém LST, que corresponde a terceira diluição. Com a conclusão das diluições, obteve-se uma quantidade de nove tubos de ensaio.

Depois desse processo, iniciou-se a etapa de incubação, onde os tubos foram enviados para uma estufa com uma temperatura de 35 ± 1°C por 24-48 horas. Após este período, verificou-se a turvação do meio com a formação de gás. Esta etapa é um ensaio preditivo para a presença de coliformes e seu resultado é apresentado como Número Mais Provável por mililitro (NMP/mL).

3 Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os dados de dois dias de coleta com os resultados das duplicatas nos ensaios para quantificação de Aeróbios Mesófilos, Bactérias Láticas e Bolores e Leveduras. As amostras não apresentaram contaminação por Coliformes totais, termotolerantes e *E.coli* (< 3 NMP/mL), o resultado positivo para estes ensaios é constatado com a turvação do meio e também a formação de gás nos tubos de Duran.

Marca	Dias	BL	BAM	BOL
A	28/10	3,70E+04	1,20E+04	5,00E+06
		8,10E+03	1,80E+02	1,10E+05
	19/11	0,00E+00	4,70E+02	3,40E+05
		0,00E+00	0,00E+00	5,00E+05
	Média	2,26E+04	1,27E+04	1,49E+06
B	04/11	6,00E+05	1,20E+05	2,80E+06
		6,00E+05	0,00E+00	2,50E+06
	03/12	6,00E+05	1,30E+04	1,00E+06
		6,00E+05	2,00E+03	2,00E+06
	Média	6,00E+05	3,38E+04	2,08E+06
C	04/11	1,10E+02	4,50E+03	1,10E+05
		6,00E+01	5,00E+01	4,50E+03
	03/12	0,00E+00	5,00E+03	2,20E+05
		0,00E+00	1,00E+03	3,00E+05
	Média	4,25E+01	2,64E+03	1,59E+05
D	19/11	3,50E+04	1,30E+04	1,00E+06
		1,00E+04	2,90E+03	2,00E+06
	03/12	1,00E+03	2,50E+02	1,10E+05
		8,00E+02	3,50E+02	3,50E+05
	Média	1,17E+04	4,13E+03	8,65E+05
Média Geral		1,59E+05	1,33E+04	1,15E+06

Tabela 1 - Resultados das análises na amostra da Marca A em dois dias de coleta
BL – Bactérias Láticas; BAM – Bactérias Aeróbias Mesófilas; BOL – Bolores e leveduras;
Fonte: Dos autores, 2016.

Segundo Rebello (2009), um dos fatores que restringem a contaminação microbiológica é o pH da cerveja, com um valor em torno de 4,0, porém como as bactérias láticas vivem em condições semelhantes as leveduras, sendo comum ocorrer contaminação das mesmas em cervejas. A presença de bactérias láticas poderá provocar turvação na cerveja e a presença de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são responsáveis por 70% das contaminações em cervejarias, poderão produzir maus odores, podendo comprometer lotes inteiros de cerveja (SUHRE, 2014).

As amostras apresentaram contagem de bactérias láticas na primeira rodada de ensaios, com valores encontrados na ordem de 10^3 e 10^4 UFC/mL, contudo, a presente pesquisa não consegue efetivamente afirmar que esta contagem causará os efeitos indesejáveis e a turvação do chope, ensaios de vida de prateleira poderiam responder a este questionamento.

A contagem de bolores e leveduras na ordem de 10^5 e 10^6 UFC/mL era esperado porque as leveduras fazem parte do processo de produção do chope e o chope não é um produto pasteurizado, que reduziria esta carga. A contagem realizada nesta pesquisa é uma contagem total que não caracterizou ou



estabeleceu as espécies que cresceram nas placas cultivadas, porque há algumas espécies de leveduras que são indesejáveis que apareçam na cerveja ou no chope, tais como *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces*, sendo as *Saccharomyces* spp. consideradas as mais perigosas.

As bactérias aeróbias mesófilas são utilizadas como indicadores gerais de populações bacterianas em alimentos, a técnica não diferencia os tipos de bactéria, sendo utilizadas para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (SILVA et al, 2010). As contagens encontradas ficaram na ordem de 10^2 e 10^4 UFC/mL.

4 Conclusão

De acordo com Estevinho (2015), devido ao fato da cerveja dispor de uma estabilidade microbiológica e de características desfavoráveis para a multiplicação de muitos microrganismos, em virtude dos fatores, tais como o processo de fabricação, os efeitos antimicrobianos do álcool, o baixo pH, o elevado teor em dióxido de carbono e também os ácidos do lúpulo, evita-se a quantidade de microrganismos que possam estar presentes na cerveja.

O presente trabalho foi realizado com amostras de chope, que não passam por processo de pasteurização, que diminui o nível bacteriológico do produto, ainda assim, as amostras se apresentaram com índices baixos de contagem microbiológica. Uma proposta de pesquisa seria realizar mais coletas com a mesma marca de chope em épocas distintas para verificar se os resultados se mantêm e também realizar coleta de outras marcas de chope para comparar os resultados obtidos e verificar as contagens microbiológicas em outras marcas.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que, como não houve presença de coliformes, a higienização dos equipamentos está sendo feita corretamente e garantindo qualidade ao consumidor. Não há legislação específica para padrões microbiológicos em chope para podermos avaliar as demais contaminações encontradas, neste momento pode-se destacar que houve presença significativa de bolores e leveduras na amostra analisada.

5 Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo financiamento e a FURB por disponibilizar o Laboratório de Ensaio de Microbiologia para a execução da pesquisa.

6 Referência

Bamforth C. **Tap into the Art and Science of Brewing**. Plenum Press, New York, 1998.
DOWNES, Frances Pouch; ITO, Keith. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association (2001).

ESTEVINHO, Leticia M. **Leveduras e fermentações: O caso da cerveja**. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/11625/3/LivroDeActas.pdf#page=59>> Acesso em 25 de janeiro de 2016.

PATZAK, J. **Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.)**. Euphytica, volume 121, Issue 1, pp 9-18 (2001).



Fox, P.F., Cheese: **An overview. In: Cheese Chemistry, Physics and Microbiology.** Ed., Chapman and Hall: London, 1993, pp 1–36.

NETA, Luzia S. F.; HABERT, Alberto C. C.; BORGES, Piacsek **Cerveja Microfiltrada: Processo e Qualidade** Rio de Janeiro – RJ, 2005.

REBELLO, Flávia de F. P. **Produção de cerveja.** Disponível em: <<https://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/viewFile/224/220>> Revista Agroambiental (Revisão) - Dezembro 2009.

ROSA, Natasha A.; AFONSO, Júlio C. **A Química da Cerveja.** Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc37_2/05-QS-155-12.pdf> Acesso em 25 de janeiro de 2016

SCHEFFER, Rayane C.; DIAS, Edimar N.; LEMES, Bruno K.; LEMOS, Afonso J. **Processo produtivo da cerveja tipo Pilsen.** 2013.

SILVA, Neusely; SILVEIRA, Neliane F. de A.; JUNQUEIRA, Valéria C. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** 4 ed. São Paulo: Varela, 2010.

SINDICERV (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja). Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>> Acesso em 20 de Janeiro de 2016.

SUHRE, Taís. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras.** Porto Alegre, 2014.

VRIESEKOOOP, Frank; KRAHL, Moritz Krahl; HUCKER, Barry; MENZ, Garry. **Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly.** 2012. Journal of Institute of Brewing 118, pp 335–345.