



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Francisca Araújo Faria

**Implementação e validação de um equipamento  
eletrónico de contagem de células e de viabilidade  
celular**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor

José Maria Marques Oliveira

janeiro de 2021

## Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações**  
**CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Agradecimentos

Assim como a levedura, que precisa de carinho e dedicação do cervejeiro para produzir um produto de qualidade, eu não teria realizado da mesma forma este trabalho sem o carinho e dedicação de algumas pessoas, e por isso, reservo este momento para lhes demonstrar a minha gratidão.

Agradecer àqueles que sempre me apoiaram e educaram para ser a pessoa que sou hoje, lutando sempre ao meu lado, agradeço incansavelmente, aos meus pais. Aos meus irmãos, André e João Pedro, agradeço toda a compreensão, conselhos e encorajamento que me prestaram constantemente.

Ao Rui Miguel por todo o acompanhamento e carinho prestado, que foi sem dúvida fundamental.

Ao meu orientador na empresa, Doutor Fábio Oliveira, do Departamento de Qualidade da empresa, e ao Diretor da Qualidade, Doutor Pedro Rodrigues, um sincero obrigada pela oportunidade que me proporcionaram na empresa e por me auxiliarem e apoiarem ao longo desta dissertação.

Ao meu orientador, Professor José Maria Marques Oliveira, tenho de agradecer incansavelmente toda a orientação, conselhos, disponibilidade e apoio que recebi deste o primeiro momento.

À empresa pela oportunidade de realizar o meu estágio curricular e por sempre se mostrar disponível para o desenvolvimento do meu trabalho, mesmo apesar da situação pandémica que assolou o mundo durante a realização do trabalho. Tenho, ainda de agradecer a todos os colaboradores da empresa porque me fizeram sentir um membro da mesma, em especial aos colaboradores do laboratório central por toda a ajuda. Agradecer ainda à Marina e ao Manuel pela paciência e amizade.

A toda a minha família, que me apoiou, em especial à minha prima Suéli por todas as horas de companheirismo e partilha.

Aos meus amigos de sempre que, apesar das nossas escolhas nos terem conduzido para caminhos académicos e profissionais diferentes, sempre nos mantivemos juntos e, por isso, a eles agradeço a partilha de vitórias e frustrações.

Àqueles que caminharam comigo ao longo destes 5 anos, os meus colegas de curso, em especial à Cristiana, à Mariana, à Sónia, à Inês, à Catarina e à Araci, por todas as borgas e por todo o acompanhamento e carinho prestado ao longo de todo o curso.

## Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

A disponibilidade de culturas de levedura de qualidade fisiológica e microbiológica é fundamental para o processo cervejeiro. Métodos de propagação de levedura otimizados diminuem a incidência de fermentações inconsistentes e prolongadas.

O crescimento de leveduras durante a propagação, fermentação e *stockagem*, é analisado na empresa, por dois métodos, através do *Coulter Counter* e do microscópio ótico. Quanto à viabilidade celular é analisada apenas no microscópio ótico. Embora o contador eletrônico de partículas seja a técnica mais usada, este não permite distinguir entre células em crescimento e células únicas, e não permite a análise da viabilidade celular, recorrendo a empresa, para este tipo de análises, ao microscópio. No entanto, os erros de contagem manual rondam os 20 % a 30 %, devido à interpretação humana.

O trabalho realizado teve como principal objetivo a implementação de um contador de células automatizado, o *Aber Countstar*, em substituição do microscópio ótico e do *Coulter Counter Instrument*. Para a sua validação e implementação foi feita a contagem celular e a viabilidade celular das amostras pelo método tradicional (microscópio ótico) e pelo *Coulter*, e também através do novo equipamento a ser implementado. Realizaram-se ensaios para analisar a repetibilidade e a precisão do *Aber*, bem como para avaliar a capacidade deste de medir diferentes estirpes de levedura e de as avaliar nas várias fases do fabrico da cerveja. *A posteriori*, estes resultados foram analisados estatisticamente e, procedeu-se a otimizações no *Aber*.

O trabalho realizado demonstrou que as medições no *Aber* são comparáveis às contagens manuais, mas também são mais repetíveis e consistentes em relação ao microscópio. No entanto, verificou-se a existência de diferenças significativas entre o *Aber* e o *Coulter* utilizando o parâmetro "Standard" no *Aber*. Denotou-se que existiam diferenças significativas de leitura da concentração celular, quando aplicados fatores de diluição diferentes. Estes parâmetros (*Yeast Type* e fator de diluição) foram otimizados de forma a equiparar as leituras entre o *Aber* e o *Coulter*, sendo encontrado um parâmetro ótimo no *Aber* para cada tipo de amostra a analisar, bem como o respetivo fator de diluição a aplicar.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aber Countstar*, Contagem celular, Contagem rápida e automatizada, Levedura, Viabilidade celular.

## Abstract

The availability of yeast cultures of physiological and microbiological quality is fundamental to the brewing process. Optimized yeast propagation methods decrease the incidence of inconsistent and extended fermentations.

The growth of yeasts during propagation, fermentation and stocking, is analyzed in the company, by two methods, through the Coulter and the optical microscope. The cell viability is analyzed only under the optical microscope. Although the electronic particle counter is the most used technique, it does not allow the distinction between growing cells and single cells, and does not allow the analysis of cell's viability, using, the company, this Type of analysis under the microscope. However, errors in manual counting are around 20 % to 30 %, due to human interpretation.

The work carried out had as main objective the implementation of an automated cell counter, *Aber Countstar*, replacing the optical microscope and the *Coulter Counter* Instrument. For its validation and implementation, it was necessary to perform cell counting and cell viability of the samples by the traditional method (optical microscope) and by *Coulter*, and also through the new equipment to be implemented. Tests were carried out to analyze the consistency, repeatability and accuracy of *Aber*, as well as to evaluate its ability to measure different strains of yeast and to evaluate them in the various stages of brewing. Then, these results were analyzed statistically, and proceeded to optimization in *Aber*.

During the development of the work was demonstrated that the measurements in *Aber* were similar to manual counts, but they were also more repeatable and consistent in relation to the microscope. However, there were significant differences between *Aber* and *Coulter* using the "Standard" parameter. It was noted that there are significant differences in the reading of cell concentration when different dilution factors are applied. These parameters (Yeast Type and dilution factors) were optimized in order to match the readings between *Aber* and *Coulter*, being found an optimal parameter in *Aber* for each type of sample to be analyzed, as well as the respective dilution factor to be applied.

**KEYWORDS:** *Aber Countstar*, Cell counting, Fast automated counting, Yeast, Cell Viability.

# ÍNDICE

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de Integridade .....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xv
Lista de Variáveis, Abreviaturas, Siglas e Acrónimos .....	xvi
I - INTRODUÇÃO .....	17
1. Enquadramento geral .....	18
1.1. Motivações e objetivos.....	18
1.2. A empresa .....	19
1.2.1. Desenvolvimento sustentável .....	19
1.2.2. Qualidade e Segurança Alimentar .....	19
1.2.3. Inovação.....	20
1.3. Estrutura da dissertação.....	20
2. Processo de produção de cerveja .....	22
2.1. Contexto histórico e evolução.....	22
2.2. Processo industrial .....	23
2.2.1. Matérias-primas.....	23
2.2.2. Fabricação do mosto .....	25
2.2.3. Fermentação, maturação, estabilização e clarificação.....	27
3. Generalidades sobre leveduras utilizadas na produção de cerveja .....	30
3.1. Características gerais .....	30
3.2. Estrutura, composição e morfologia da levedura .....	30
3.3. Estirpes de levedura .....	31
3.4. Metabolismo da levedura.....	31
3.5. Armazenamento de leveduras em laboratório.....	33

3.6.	Propagação da levedura .....	34
3.6.1.	Crescimento anaeróbio .....	34
3.6.2.	Propagação à escala laboratorial.....	37
3.6.3.	Propagação à escala industrial.....	37
4.	Controlo da Qualidade .....	38
4.1.	Monitorização e Controlo da Fermentação .....	38
4.2.	Controlo microbiológico .....	38
4.3.	Sistemas de gestão da qualidade.....	40
5.	Métodos de contagem celular e de viabilidade celular .....	41
5.1.	Métodos tradicionais .....	41
5.1.1.	Visual ou Lupa.....	41
5.1.2.	Microscopia .....	42
5.2.	Métodos automatizados.....	43
5.2.1.	Citometria de fluxo.....	44
5.2.2.	Métodos eletroquímicos .....	45
5.2.3.	Monitorização em tempo real.....	45
5.2.4.	Microscopia digital .....	47
5.3.	Equipamentos de análise utilizadas na empresa .....	47
5.3.1.	<i>BECKMAN COULTER® Z2</i> .....	47
5.3.2.	Microscópio .....	48
5.3.3.	<i>Aber Counstar Yeast</i> .....	49
5.4.	Equipamento <i>Aber CountStar Yeast</i> .....	49
II –	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
6.	Determinação da concentração celular de levedura.....	55
6.1.	Método eletrónico – <i>BECKMAN COULTER® Z2</i> .....	55
6.2.	Método microscópico .....	56
6.3.	Método automatizado – <i>Aber Counstar Yeast</i> .....	57
7.	Determinação da viabilidade celular de levedura .....	58
7.1.	Método microscópico .....	58
7.2.	Método automatizado – <i>Aber Counstar Yeast</i> .....	59



8.	Capacidade analítica do <i>Aber</i> .....	59
8.1.	Repetibilidade de leitura no <i>Aber</i> e no microscópio .....	59
8.2.	Intercomparação com outros equipamentos – <i>Aber, Coulter</i> e microscópio ótico .....	59
8.3.	Validação do equipamento em diferentes gamas de concentração.....	60
8.4.	Resposta analítica da perda da viabilidade recorrendo a ensaio térmico .....	60
9.	Validação da resposta analítica do <i>Aber</i> para diferentes tipos de leveduras .....	60
10.	Validação analítica do <i>Aber</i> em diferentes fases do processo fermentativo .....	60
11.	Otimização do <i>Aber</i> para medição da levedura em diferentes tipos de amostras.....	61
12.	Análise estatística.....	62
III – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		64
13.	Capacidade analítica do <i>Aber</i> .....	65
13.1.	Repetibilidade das leituras no <i>Aber</i> e no microscópio ótico .....	65
13.2.	Intercomparação de equipamentos – <i>Aber, Coulter</i> e microscópio.....	67
13.3.	Validação do equipamento em diferentes gamas de concentração.....	69
13.4.	Resposta analítica da perda da viabilidade recorrendo a ensaio térmico.....	74
14.	Validação da resposta analítica do <i>Aber</i> para diferentes leveduras .....	75
15.	Validação analítica do <i>Aber</i> em diferentes fases do processo produtivo.....	82
15.1.	Amostras em propagação .....	82
15.2.	Amostras em fermentação.....	84
15.3.	Amostras em <i>stockagem</i> .....	88
16.	Otimização do <i>Aber</i> para medição da levedura em diferentes tipos de amostras.....	90
16.1.	Amostras de levedura C em <i>stockagem</i> .....	90
16.2.	Amostras de levedura D em <i>stockagem</i> .....	94
16.3.	Cerveja com levedura C – Cerveja C .....	95
16.4.	Cerveja com levedura C – Cerveja C sem álcool.....	96
16.5.	Cerveja com levedura C – Cerveja G .....	98
16.6.	Cerveja com levedura C – Cerveja F.....	99
16.7.	Cerveja com levedura C – Cerveja H .....	101
16.8.	Cerveja com levedura C – Cerveja I .....	102
16.9.	Cerveja com levedura A .....	103

16.10. Cerveja com levedura B.....	104
16.11. Cerveja com levedura D.....	106
16.12. Sidra E.....	107
16.13. Considerações finais.....	108
IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO .....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXOS .....	119
Anexo A - Informações suplementares aos materiais e métodos.....	120
A.1. Protocolo padrão de contagem de células.....	120
A.2. Preparação da solução de azul de metileno .....	121
Anexo B - Informações suplementares aos resultados e discussão.....	122
B.1. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura A.....	122
B.2. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura B.....	123
B.3. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura C.....	124
B.4. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura D.....	125
B.5. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura E.....	126

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema geral do processo cervejeiro. ....	23
<b>Figura 2</b> – Gráfico representativo das fases de crescimento da levedura, expresso em número total de células ( $X$ ) durante o tempo de fermentação ( $t$ ). ....	35
<b>Figura 3</b> – a) Contador eletrônico; b) Representação do sistema de contagem de células BECKMAN COULTER® ..	48
<b>Figura 4</b> – a) Microscópio ótico Eclipse E600; b) Câmara de contagem de Neubauer.....	49
<b>Figura 5</b> – Instrumento Aber Countstar Yeast. ....	50
<b>Figura 6</b> – Imagem de slide Countstar. ....	51
<b>Figura 7</b> – Imagem do software Countstar.....	52
<b>Figura 8</b> – Gráfico da variação da concentração celular ( $C$ ) das 30 repetições ( $n$ ) efetuadas para a mesma amostra diluída, e em ambos os equipamentos (Aber e microscópio).....	65
<b>Figura 9</b> – Gráfico da variação da Viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) das 30 repetições ( $n$ ) efetuadas para a mesma amostra diluída, e em ambos os equipamentos (Aber e microscópio).....	65
<b>Figura 10</b> – Gráfico das diferenças das leituras da concentração celular ( $C$ ) em função da média das leituras, entre o Aber e o Coulter (a), entre o Aber e o microscópio (b), e entre o Coulter e o microscópio (c). ....	68
<b>Figura 11</b> – Concentração celular ( $C$ ) lida no microscópio e no <i>Aber</i> usando 4 parametrizações diferentes (ST, US3, US4 e US5) em função dos fatores de diluição (200, 500, 1000 e 2000). As barras apresentam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).....	69
<b>Figura 12</b> – Gráficos das diferenças das leituras da concentração celular em função da média das leituras entre o Coulter e o Aber usando a parametrização ST (a), US3 (b), US4 (c) e US5 (d). ....	71
<b>Figura 13</b> – Viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) lida no microscópio e no Aber, usando 4 parametrizações diferentes (ST, US3, US4 e US5) em função dos fatores de diluição (200, 500, 1 000 e 2 000). As barras apresentam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).....	72
<b>Figura 14</b> – Gráfico das diferenças das leituras da viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) em função da média das leituras entre o microscópio e o Aber usando a parametrização ST (a), US3 (b), US4 (c) e US5 (d). ....	73
<b>Figura 15</b> – Análise da perda de viabilidade ( $V_{cel}$ ), provocada pelo banho-maria a 70 °C durante 10 min, através do microscópio e do Aber (com a parametrização Standard), com $n = 3$ para cada amostra. ....	74
<b>Figura 16</b> – Gráfico das diferenças das leituras da concentração celular ( $C$ ) em função da sua média entre o Aber e o microscópio (a), entre o Aber e o Coulter (b) e, entre o Coulter e o microscópio (c) para a levedura do tipo A. ....	77
<b>Figura 17</b> – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular ( $C$ ) em função da média das leituras entre o Aber e o microscópio (a), entre o Aber e o Coulter (b) e, entre o Coulter e o microscópio (c), para a levedura B. ....	78
<b>Figura 18</b> – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o Aber e o microscópio (a), entre o Aber e o Coulter (b) e, entre o Coulter e o microscópio (c), para a levedura do tipo C. ....	79
<b>Figura 19</b> – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o Aber e o microscópio (a), entre o Aber e o Coulter (b) e, entre o Coulter e o microscópio (c), para a levedura do tipo D. ....	80
<b>Figura 20</b> – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o Aber e o microscópio (a), entre o Aber e o Coulter (b) e, entre o Coulter e o microscópio (c), para a levedura do tipo E. ....	81

<b>Figura 21</b> – Concentração celular ( $C$ ) durante a fase da propagação, para cada estirpe de levedura (A, B, C e D) em três equipamentos diferentes. As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).....	83
<b>Figura 22</b> – Concentração celular ( $C$ ) durante a fase de fermentação, para cada estirpe de levedura (A, B, C, D e E) nos 3 equipamentos diferentes. As barras representam o erro associado à média para 5 repetições ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	85
<b>Figura 23</b> – Concentração celular ( $C$ ) da levedura do tipo C ( $n = 10$ ), lida em três equipamentos, em função do tempo ( $t$ ) de fermentação. ....	86
<b>Figura 24</b> – Acompanhamento da fermentação em termos de extrato aparente ( $P$ ) e de Teor alcoólico volúmico ( $TA_v$ ). .....	87
<b>Figura 25</b> – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) da levedura C em fase de stockagem ( $n = 10$ ), determinada no Aber e no Coulter. As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	88
<b>Figura 26</b> – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) da levedura D em fase de stockagem ( $n = 10$ ), determinada no Aber e no Coulter. As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	89
<b>Figura 27</b> – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) na stockagem C, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	91
<b>Figura 28</b> – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) na stockagem C, com os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4” medida no Aber ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	92
<b>Figura 29</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular entre o Coulter e o Aber (a) e da viabilidade celular entre o Aber e o microscópio (b) para a levedura C em stockagem, e utilizando no Aber o parâmetro “Coulter4”. .....	93
<b>Figura 30</b> – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) na stockagem D, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	94
<b>Figura 31</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja C, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	95
<b>Figura 32</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja C em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard”. ....	96
<b>Figura 33</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja C sem álcool, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	97
<b>Figura 34</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja C sem álcool em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard”. ....	97
<b>Figura 35</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja G, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	98
<b>Figura 36</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja G em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard”. ....	99
<b>Figura 37</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja F, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). ....	99

<b>Figura 38</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja F em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard” .....	100
<b>Figura 39</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja H, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	101
<b>Figura 40</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja H em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard” .....	101
<b>Figura 41</b> – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja I, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	102
<b>Figura 42</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para o tipo de cerveja I em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Coulter 4” .....	103
<b>Figura 43</b> – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de levedura A, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	103
<b>Figura 44</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para amostras de levedura A em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Coulter 3” .....	104
<b>Figura 45</b> – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de levedura B, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).....	105
<b>Figura 46</b> – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de cerveja com levedura D, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	106
<b>Figura 47</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para amostras de cerveja D em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “US4” .....	106
<b>Figura 48</b> – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de sidra E, medida no Aber com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). .....	107
<b>Figura 49</b> – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o Aber e o Coulter para amostras de sidra E em fermentação e utilizando no Aber o parâmetro “Standard” .....	108
<b>Figura A. 1.</b> – Técnica padrão de contagem.....	120
<b>Figura A. 2.</b> – Solução de azul metileno armazenada num frasco escuro.....	121
<b>Figura B.1.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o Aber e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	122
<b>Figura B.2.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o Aber e o Coulter, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	122
<b>Figura B.3.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o Coulter e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	123

<b>Figura B.4.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o Aber e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	123
<b>Figura B.5.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o Aber e o Coulter, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	123
<b>Figura B.6.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o Coulter e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	124
<b>Figura B.7.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o Aber e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	124
<b>Figura B.8.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o Aber e o Coulter, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	124
<b>Figura B.9.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o Coulter e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	125
<b>Figura B.10.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o Aber e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.....	125
<b>Figura B.11.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o Aber e o Coulter, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.....	125
<b>Figura B.12.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o Coulter e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.....	126
<b>Figura B.13.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o Aber e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.....	126
<b>Figura B.14.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o Aber e o Coulter, com 10 repetições para cada amostra.....	126
<b>Figura B.15.</b> – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o Coulter e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.....	127

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Diferentes parametrizações testadas no Aber CountStar.....	62
<b>Tabela 2</b> – Média das repetições efetuadas no Aber e no microscópio ( $n=30$ ) em termos de concentração celular ( $C$ ) e de viabilidade celular ( $V_{vi}$ ), bem como o seu erro associado, com 95 % de confiança, ( $\bar{A}$ ), e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV$ ).....	66
<b>Tabela 3</b> – Média da concentração celular dos 3 equipamentos, tal como o seu erro associado ( $E$ ) e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV$ ).....	67
<b>Tabela 4</b> – Coeficiente de correlação de pearson ( $r^2$ ) entre equipamentos obtido pela análise de regressão para cada tipo de levedura (A, B, C, D e E).....	76
<b>Tabela 5</b> – Coeficiente de variação ( $CV$ ) da leitura da concentração celular das 5 repetições efetuadas para cada estirpe de levedura em cada equipamento, em fase de propagação.....	84
<b>Tabela 6</b> – Coeficiente de variação ( $CV$ ) da leitura da concentração celular das 5 repetições efetuadas para cada estirpe de levedura em cada equipamento, em fase de fermentação.....	85
<b>Tabela 7</b> – Quadro resumo do melhor parâmetro a utilizar no Aber para cada amostra a ser analisada na empresa, bem como a respetiva diluição.....	109

## Lista de Variáveis, Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

### Abreviaturas:

FAN – *Free Amino Nitrogen*

ISO – *International Organization for Standardization*

ITP – *Inspection and test plans*

MCQ – Manual de Controlo de Qualidade

POS – Procedimento Operacional Standard

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

RFIS – *Radio frequency impedance spectroscopy*

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

TCF – Tanque de Cerveja Filtrada

### Expressões do latim:

*et al.* – *et alii* (e outros)

*e.g.* – *exempli gratia* (por exemplo)

*i.e.* – *id est* (isto é)

### Variáveis:

*C* – Concentração celular

*CV* – Coeficiente de variação de repetibilidade

*D* – Fator de diluição

*E* – Erro associado à média

$^{\circ}P$  – Extrato aparente

*n* – Número de réplicas

$p_{\text{value}}$  – Nível de significância

$r^2$  – Coeficiente de correlação de Pearson

*t* – Tempo

$t_d$  – Tempo de duplicação

*T* – Temperatura

$TA_v$  – Teor alcoólico volumétrico

*UFC* – Unidades Formadoras de Colónias

$V_{\text{cel}}$  – Viabilidade celular

*V* – Volume da câmara de *neubauer*

*X* – Número de células contadas

$\mu$  – taxa específica de crescimento celular



## I - INTRODUÇÃO

Neste capítulo começa-se por um enquadramento geral do trabalho onde se refere a motivação para a sua realização e se indicam os principais objetivos subjacentes à sua execução. Faz-se também uma breve descrição da empresa, onde foi efetuada a dissertação, bem como da estrutura adotada neste documento.

Dedica-se um subcapítulo à descrição do processo de produção de cerveja, onde se referem as suas particularidades, que contribuem para as suas características peculiares, bem como uma revisão bibliográfica sobre o tipo de levedura utilizada em todo o processo fermentativo. Refere-se também a importância da monitorização e do controlo na fermentação e, ainda, do controlo microbiológico de todo o processo.

Como não podia deixar de ser, por último, apresentam-se os métodos tradicionais e automatizados de contagem celular e de viabilidade celular.

1. Enquadramento geral	18
2. Processo de produção de cerveja	22
3. Generalidades sobre leveduras utilizadas na produção da cerveja	30
4. Controlo da qualidade	38
5. Métodos de contagem celular e de viabilidade celular	41

## 1. Enquadramento geral

### 1.1. Motivações e objetivos

O desenvolvimento de conhecimentos científicos e tecnológicos proveio da evolução da Humanidade ao longo dos tempos, e promoveu novas formas de inovação e novas ferramentas que levaram a um Mundo mais globalizado e interligado (Tilly, 2010). Várias tecnologias, introduzidas no mercado nos últimos anos, automatizaram os processos de forma a remover alguns erros humanos e a subjetividade associada (Thomson *et al.*, 2015).

A obtenção de uma cerveja de alta qualidade depende muito das condições fisiológicas e microbiológicas da levedura, do conhecimento da viabilidade celular (percentagem de células viáveis) e da contagem precisa de células durante todo o processo de fermentação, de modo a obter produtos consistentes.

O crescimento de leveduras, durante a propagação e fermentação, é analisado na empresa, por dois métodos: através do contador eletrónico de partículas (*Coulter Counter instrument*) e do microscópio ótico. A viabilidade celular é analisada apenas no microscópio ótico. Embora o contador eletrónico de partículas seja a técnica mais apropriada, não permite distinguir entre células em crescimento (*budding*) e células únicas, e entre agregados celulares ou outras impurezas presentes (Beckman Coulter, 2011). Portanto, as amostras devem ser analisadas primeiro quanto à sua morfologia celular por observação microscópica. No entanto, os erros de contagem manual podem chegar a valores entre os 20 % e os 30 %, devido à interpretação humana e, também, devido a um pequeno volume de amostra (0,1 µL). Por esta razão, muitas empresas cervejeiras pretendem adotar métodos de contagem e de avaliação da viabilidade celular que possam ser executadas por operadores de processo não qualificados ou para automatizar o processo de contagem de células. A automatização tem como objetivo reduzir erros associados à contagem manual e à variabilidade entre operadores (ASBC, 2015). No entanto, muito recentemente, foi relatado o funcionamento e os benefícios de um novo contador de células automatizado (*Aber Countstar*) que analisa a viabilidade de leveduras, usando o método de exclusão de corante azul de metileno (ASBC, 2015).

Este trabalho, realizado no âmbito da dissertação de Mestrado, foi desenvolvida ao longo de seis meses em ambiente empresarial numa empresa de bebidas, com o principal objetivo de implementar o contador de células automatizado, o *Aber Countstar*, em substituição do microscópio ótico e do *Coulter Counter instrument*. Tentou-se estudar a capacidade analítica do *Aber*, que teve como objetivo primordial a análise

da sua repetibilidade nas leituras bem como a do microscópio, a comparação entre os três equipamentos (o *Aber*, o *Coulter* e o microscópio), a execução de testes de leitura com diferentes gamas de concentração, e demonstração da resposta analítica da perda da viabilidade com recurso a ensaio térmico. Tentou-se também avaliar a capacidade do novo equipamento em medir diferentes estirpes de levedura e de as avaliar nas várias fases do fabrico da cerveja.

### 1.2. A empresa

A atividade produtiva da empresa está distribuída de norte a sul do país, por sete centros de produção que se dedicam à produção de cervejas, sumos, refrigerantes, vinhos, sidras e à captação e engarrafamento de água.

#### 1.2.1. Desenvolvimento sustentável

Para que a empresa seja competitiva no mercado do futuro, e para que possa assegurar as necessidades das gerações atuais, sem comprometer as gerações futuras, integrou o conceito de desenvolvimento sustentável, promovendo um desenvolvimento mais justo em termos económicos, ambientais e sociais.

#### 1.2.2. Qualidade e Segurança Alimentar

A empresa contempla as necessidades dos clientes, implementando uma estratégia de melhoria contínua, e atende aos requisitos das normas ISO 9001 (qualidade), ISO 22000 (segurança alimentar), IFS Food (segurança alimentar) apenas com certificado num dos centros produtivos, ISO 14001 (ambiente), OHSAS 18001 (segurança e saúde no trabalho) e ISO 50001 (energia), de forma a assegurar os seus princípios de sustentabilidade transversal a todas as áreas de negócio que detém.

O departamento da Qualidade controla os processos de compras, produção e distribuição, de forma a garantir que o consumidor recebe o produto em perfeita conformidade com as intenções e as especificações definidas pela administração da empresa. Uma das funções mais importantes da Qualidade é providenciar assistência técnica à área da produção, encontrando solução para problemas operacionais relacionados com a qualidade. Neste sentido, existe a equipa dos Serviços Técnicos.

Outra área integrante da Qualidade, e de extrema importância para a área da produção, é o Laboratório Central. Este laboratório analisa os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de todas as fases da produção das cervejas e sidras, assim como produtos de outros centros de produção, tais como as águas lisas e gasocarbónicas, e vinhos e sangrias. No laboratório de análises microbiológicas, para além de se

despistar possíveis contaminações ao longo de todo o processo de fabricação dos produtos, realiza-se a propagação de novas gerações de leveduras para fabricação de cerveja e de sidras. Também é no laboratório central que são analisadas as matérias-primas e os materiais de embalagem. O Laboratório Central realiza ainda auditorias e análises interlaboratoriais que permitem validar a sua proficiência, bem como análises às reclamações dos clientes, identificando os causadores dos motivos de insatisfação.

### 1.2.3. Inovação

O sucesso da empresa está associado à constante aposta na inovação, enquanto garante a qualidade das marcas que comercializa. Todos os anos são desenvolvidos e colocados no mercado novos produtos. No mundo das bebidas, a categoria das sidras é a que mais cresce. As cervejas artesanais são outra tendência do mercado.

### 1.3. Estrutura da dissertação

Esta dissertação de mestrado está dividida em quatro capítulos.

O primeiro capítulo, introdução, visa enquadrar o leitor no trabalho apresentado, procurando justificar a necessidade da sua realização e referindo os seus principais objetivos. Dá-se, de seguida, alguma ênfase ao processo de produção da cerveja onde se procura apresentar, de uma forma sucinta, as suas particularidades, nomeadamente no que respeita ao tipo de levedura utilizada e à sua monitorização ao longo de todo o processo. Por fim, é feita uma revisão bibliográfica sobre o tema principal do trabalho, os métodos tradicionais e automatizados utilizados na análise da concentração celular e da viabilidade celular.

No capítulo II são apresentados os materiais e métodos implícitos à realização do trabalho. Descrevem-se os métodos e as técnicas utilizadas na determinação da concentração celular e da viabilidade celular. Faz-se referência à metodologia estabelecida para o estudo da capacidade analítica do *Aber*, no que respeita a ensaios de repetibilidade, ensaios de intercomparação com outros equipamentos, ensaios com diferentes gamas de concentração, e ensaio térmico para provocar perda da viabilidade. Descreve-se ainda a metodologia utilizada para a validação do *Aber*, para diferentes leveduras e em diferentes fases do processo fermentativo, bem como para a otimização do mesmo.

O terceiro capítulo é constituído pelos resultados obtidos e pela sua discussão. Por questões de organização, dividiu-se este capítulo em quatro subcapítulos. O primeiro corresponde ao estudo da capacidade analítica do *Aber*. O segundo e terceiro subcapítulos dizem respeito ao ensaio da validação

do *Aber* para diferentes leveduras e em diferentes fases do processo fermentativo, respetivamente. O quarto refere-se à otimização do *Aber* para a medição da levedura em diferentes tipos de cerveja.

O último capítulo, capítulo IV, é constituído pelas conclusões mais importantes e por sugestões para trabalhos futuros neste domínio.

## 2. Processo de produção de cerveja

### 2.1. Contexto histórico e evolução

A cerveja é das bebidas alcoólicas mais conhecidas e apreciadas por todo o Mundo até à atualidade, e acredita-se ter sido das primeiras bebidas a ser criada pelo ser humano. Os sumérios, egípcios, mesopotâmicos e ibérios, há cerca de 6 000 a.C., aperceberam-se de que a massa do pão quando estava molhada começava a fermentar, surgindo assim uma forma primitiva de cerveja chamada “pão líquido” (EBlinger, 2009).

No século XVI, o duque Guilherme IV da Baviera decretou a Lei Alemã da Pureza (“Reinheitsgebot”), o mais antigo código de alimentos do mundo, com o objetivo de regulamentar o processo de fabricação da cerveja. Este código ditava que os únicos ingredientes que podiam ser utilizados na produção de cerveja eram apenas malte de cevada, lúpulo e água (Kunze & Weber, 2004).

A partir do século XVIII, com a Revolução Industrial, a produção começou a fazer em grande escala e o consumo expandiu-se. As descobertas de Louis Pasteur permitiram aprimorar o processo produtivo de cerveja com os fundamentos da microbiologia científica, através do uso da pasteurização no processo produtivo, que permite dar à cerveja mais durabilidade, possibilitando o transporte a grande distância (Boulton & Quain, 2001).

Ao longo dos anos, a cerveja foi tendo diferentes caracterizações. Contudo, foi no século XIX que o fabrico de cerveja sofreu um grande impulso, através da resolução de dois problemas essenciais: o isolamento das leveduras responsáveis pelo processo fermentativo, da responsabilidade do Professor Emil Hansen, do Laboratório da Carlsberg, e a possibilidade da manutenção dos tanques de fermentação e do armazenamento da cerveja em caves, ao longo de todo o ano, a baixa temperatura (EBlinger, 2009).

A palavra cerveja, etimologicamente, surge do latim “*cervesiam bibere*” que terá estado na origem das várias traduções europeias da palavra cerveja (“*bior*”, no Alemão, “*beer*”, no Inglês, “*bière*”, no Francês, etc) (Esslinger & Narziss, 2012).

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação alcoólica de um mosto constituído por malte de cereais, como a cevada, cereais não maltados, açúcares e outras matérias-primas ricas em amido, ao qual se adiciona água potável e lúpulo para dar sabor e aroma. Os açúcares mais simples, obtidos a partir do amido, presentes no mosto, são transformados essencialmente em etanol, pelas leveduras, mas também em numerosos outros produtos secundários (Kunze & Weber, 2004).

No século XIX, a indústria cervejeira já sabia da importância da levedura, e muitos cervejeiros criaram negócios novos com o seu próprio inóculo. A fermentação do mosto da cerveja é levada a cabo por leveduras do género *Saccharomyces*, pertencentes à família Saccharomycetaceae (Esslinger & Narziss, 2012).

## 2.2. Processo industrial

Atualmente, segundo a Portaria n.º 1/96, de 3 de janeiro, a cerveja é definida como uma “bebida obtida por fermentação alcoólica, por intermédio da utilização de leveduras do género *Saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual é adicionado lúpulo, ou seus derivados, e água potável”.

É possível produzir malte com outros cereais, por exemplo, trigo, centeio e sorgo, mas historicamente, por várias razões, o malte de cevada demonstrou ser o mais adequado para a produção de cerveja (Kunze & Weber, 2004).

A cerveja é o resultado de um processo biotecnológico, tradicionalmente descontínuo, que engloba um conjunto de processos biológicos (germinação e fermentação) e enzimáticos (brassagem – hidrólise do amido, proteínas e estruturas celulares), realizados com o apoio de diversas operações unitárias, como observado na Figura 1 (Cruz, 2007).

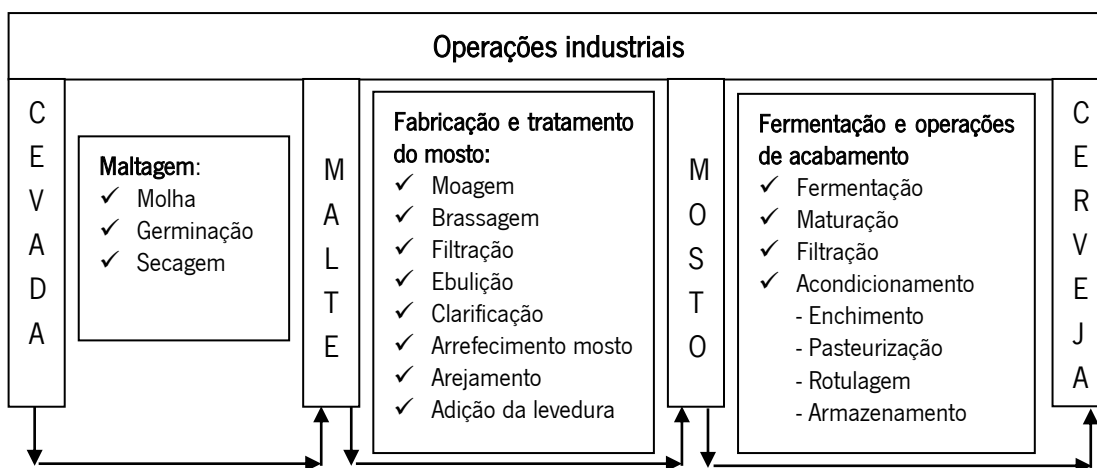


Figura 1 - Esquema geral do processo cervejeiro (adaptado de Cruz, 2007).

### 2.2.1. Matérias-primas

O malte é das matérias-primas mais marcantes no fabrico de cerveja. A produção de malte, a partir da cevada, é a primeira etapa.

O malte tem origem da germinação e posterior secagem da cevada sob condições controladas – maltagem. A maltagem tem como finalidade a obtenção de enzimas que convertem o amido em açúcares fermentescíveis, que são apenas produzidas durante a germinação. Estas enzimas, quando aplicados tempos e temperaturas diferentes, produzem cores diferentes e, conseqüentemente, numa fase posterior do processo, dão origem a diferentes cores de cerveja. No entanto, não é só a reação enzimática que altera a cor da cerveja, a reação química de Maillard também tem influência. Para além desta finalidade, as enzimas são essenciais para a fabricação do mosto, pois conferem ao grão uma boa friabilidade de forma a facilitar a sacarificação e a filtração do mosto, e concedem mais aroma, que contribuirá para as propriedades organoléticas da cerveja (Kunze & Weber, 2004).

Os cereais não maltados, não sofrem processo de maltagem e são diferenciados por não conterem enzimas e apresentarem um elevado teor de amido (acima de 75 %), 10 % a 15 % de humidade, conterem 1 % de matérias gordas (no máximo) e baixo teor em matérias azotadas, sendo por isso utilizados para aumentar a concentração de açúcares no mosto. Por não conterem proteínas solúveis, não formarão precipitados na cerveja depois da fermentação (Kunze & Weber, 2004). Estes cereais conferem à cerveja menos cor e características específicas, consoante o cereal escolhido, para além de apresentarem uma grande vantagem económica, visto que o seu preço é mais acessível, relativamente ao malte, o que possibilita a redução dos custos na produção (EBlinger, 2009).

Dos diferentes tipos de malte pode-se destacar o malte *Pilsen*, utilizado essencialmente em cervejas claras (Pilsen); malte chocolate, caracterizado por ser torrado e conseqüentemente ter uma cor escura, utilizado em cervejas escuras, do tipo *Stout*; e malte caramelo, obtido a partir da caramelização dos açúcares durante a maltagem (Kunze & Weber, 2004; Moreira *et al.*, 2013).

Outra matéria-prima de extrema importância é o lúpulo, que pertence à espécie *Humulus lupulus*, da família Cannabaceae. Hoje, a sua utilização industrial é feita sobretudo através de extratos desta planta, obtidos de forma a preservar as suas capacidades. Conforme a quantidade de resina e de óleos essenciais, as variedades de lúpulo são classificadas em variedades de amargor e variedades de aroma. O lúpulo, para além de conferir à cerveja aroma e um sabor amargo característico, contribui para a formação de uma boa espuma, e protege a cerveja contra contaminações microbiológicas (EBlinger, 2009).

A composição iónica da água usada na preparação do mosto exerce uma influência crucial no resultado bem-sucedido do processo de fermentação. A água utilizada na produção de cerveja deverá ser potável



e, idealmente, macia (baixa quantidade de sais — cálcio e magnésio). Porém, poderá variar consoante o tipo de cerveja pretendido, de modo que algumas águas duras sejam indicadas para alguns tipos (Boulton & Quain, 2001).

A água a utilizar deverá obedecer a determinadas propriedades específicas de forma a ser considerada aceitável para consumo e, conseqüentemente, adequada para o fabrico do mosto ou para a diluição da cerveja, e deverá cumprir as normas que regulam a sua qualidade, de acordo com as características do produto final a obter. Esta deve ser incolor, inodora e ter um pH entre os 6,5 e 8, gama ótima para que as enzimas do malte atuem durante a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. É ainda importante que a água não apresente sais de ferro, pois são muito prejudiciais para a cerveja, e que seja microbiologicamente pura (Kunze & Weber, 2004).

### 2.2.2. Fabricação do mosto

A qualidade do mosto é muito importante para garantir a estabilidade e as características da cerveja a obter. O intuito desta fase é extrair do malte, e de outras matérias-primas utilizadas, as substâncias solúveis ou transformar a maioria das substâncias insolúveis em solúveis.

As matérias-primas como o malte, a cevada e o *gritz* de milho são armazenadas em silos à chegada da área de fabrico. O fabrico do mosto começa com a moagem do malte e da cevada obtendo-se uma farinha mais espessa, a fim de possibilitar uma rápida extração e conversão dos seus componentes. Os outros cereais não maltados são habitualmente armazenados com um grau de moagem adequado. A moagem poderá ser húmida, onde o malte é moído com água, ou seca, quando não há adição de água ao moinho. Os dois tipos de moagem foram desenvolvidos para facilitar a filtração do mosto, dependendo do equipamento a usar. A moagem húmida é usada quando se aplica uma filtração por cuba-filtro e a moagem seca para uma filtração por filtro de placas. Outro aspeto importante da moagem é o tamanho das partículas de malte geradas, pois quanto mais pequenas forem, maior será a sua dispersão na água, facilitando a mobilidade das enzimas que vão converter o amido em açúcares fermentescíveis. Por outro lado, se as partículas forem muito finas irão dificultar bastante o passo de filtração do mosto (EBlinger, 2009).

Após a moagem segue-se a brassagem, que é realizada nas caldeiras de caldas e empastagem. Os cereais são enviados para caldeiras de empastagem onde se misturam com água quente, em geral a 65 °C. A brassagem consiste no aumento gradual da temperatura, de maneira a serem respeitados os intervalos de temperatura ótimos das enzimas de degradação, de modo a ativar as que estão presentes

nos grãos, as  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases (enzimas amilolíticas), e proteases e peptidases (enzimas proteolíticas) (Esslinger & Narziss, 2012). Estas enzimas promovem o desdobramento das moléculas complexas (hidratos de carbono de cadeia longa como o amido) em substâncias mais simples e solúveis em água, isto é, degradam o máximo de amido e proteínas possível.

Deste modo, as proteínas são convertidas em peptídeos e outras substâncias orgânicas azotadas e numa fase posterior em aminoácidos, enquanto que o amido é convertido em moléculas de glucose, maltose e maltotriose, assimiláveis pelas leveduras que irão realizar o processo fermentativo. Esta conversão é denominada por sacarificação e ocorre a temperaturas mais elevadas, cerca de 75 °C. A brassagem dura cerca de 2 h a 4 h e termina a uma temperatura de aproximadamente 75 °C (Esslinger & Narziss, 2012).

Em seguida, é necessário separar a componente sólida insolúvel, denominada de “drêche”, da parte solúvel (mosto), realizando-se uma filtração, sendo esta etapa de grande importância para a qualidade do produto final. Este passo é executado com o recurso a vários equipamentos, destacando-se o filtro de placas, estando dividido em duas fases. A primeira fase consiste na passagem do mosto nas membranas, ficando a “drêche” retida entre elas, e na segunda fase procede-se à sua lavagem, onde se faz passar água quente pelo filtro de modo a lavar o “drêche” e tentar extrair o máximo de açúcares possíveis. Esta etapa tem uma duração de cerca de 2 h e é realizada a uma temperatura entre os 77 °C e os 80 °C (Kunze & Weber, 2004).

Após a filtração do mosto, adiciona-se o lúpulo, e efetua-se uma ebulição entre 1 h a 2 h na caldeira de ebulição. Com esta fase pretende-se: a estabilização biológica do mosto de modo a destruir toda a flora microbiana que possa causar efeitos indesejáveis; a estabilização bioquímica, inativando as enzimas ainda presentes no mosto (caso da  $\alpha$ -amilase), que possam causar reações indesejáveis; a estabilização físico-química do mosto, promovendo a desnaturação de proteínas de peso molecular elevado que posteriormente precipitam e com elas arrastam polifenóis e outras substâncias – depois serão retiradas – e assim tornam o mosto mais limpo e estável em termos de espuma; a solubilização e a transformação dos componentes do lúpulo, ou seja, através da fervura efetua-se a isomerização os  $\alpha$ -ácidos provenientes do lúpulo (que são insolúveis) para os solúveis iso- $\alpha$ -ácidos que atribuem o amargor característico da cerveja. É também feita uma extração dos componentes voláteis, onde apenas uma parte fica no mosto, uma vez que a outra volatiliza e perde-se juntamente com o vapor inerente à ebulição. Durante a ebulição faz-se a evaporação do excesso de água deixando, assim, o mosto com o grau ideal de extrato. Para além da adição do lúpulo, também se poderão adicionar xaropes, para

aumentar o teor de açúcares ou a cor do mosto (Lewis, 2015).

O mosto é enviado para um decantador onde fica em repouso, e os constituintes mais pesados, como proteínas e polifenóis, agregam-se e sedimentam, constituindo o *trub*. O *trub* é recolhido e o mosto segue para o processo de fermentação (Lewis, 2015).

### 2.2.3. Fermentação, maturação, estabilização e clarificação

Após o processo de decantação, o mosto encontra-se bastante quente, por volta dos 90 °C. É, portanto, necessário arrefecê-lo para uma temperatura entre os 8 °C e os 17 °C, dependendo da levedura a utilizar conforme a cerveja pretendida, de forma a esta ter condições para o seu desenvolvimento. Esta etapa deverá ocorrer em condições de assépsia. Além disso, também deverá ser realizado o arejamento do mosto com oxigénio puro ou ar esterilizado. O arejamento é importante para permitir a respiração da levedura, sendo a quantidade mínima recomendada de oxigénio de 6 mg/L a 10 mg/L. Garantidos estes passos, o mosto é enviado para as cubas de fermentação, designadas de cilindrocónicas devido ao seu formato, e deverá ser adicionada a levedura (inoculação), de modo a obter-se uma concentração celular, no mosto, de  $12 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  a  $20 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  (Boulton & Quain, 2001).

Existem várias estirpes de levedura utilizadas, dependendo da cerveja a produzir, mas todas elas são do género *Saccharomyces* (Boulton & Quain, 2001).

A fermentação é a etapa mais importante de todo o processo cervejeiro, durante a qual as leveduras transformam os açúcares presentes no mosto (glucose, frutose, sacarose, maltotriose e maltose) em etanol e dióxido de carbono, através da via glicolítica de *Embden-Meyerhof-Parnas*. Formam-se ainda outros compostos que atribuem propriedades organoléticas à cerveja como, por exemplo, álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) e compostos sulfurados. Enquanto alguns desses compostos são desejáveis até certo ponto, outros podem afetar negativamente a qualidade da cerveja, conhecidos por *off-flavours*, como é o caso das dicetonas vicinais (DCV's), um grupo de compostos carbonílicos (Pires & Brányik, 2015).

Os precursores de DCV's, 2,3-butanodiona (diacetilo) e 2,3-pentanodiona, são os ácidos  $\alpha$ -acetolático e  $\alpha$ -acetohidroxibutírico, respetivamente. Ambos os compostos são intermediários na síntese de alguns aminoácidos (via metabólica isoleucina-leucina-valina). Concentrações muito altas de diacetilo podem ser um sinal de contaminação microbiana, seja por *Lactobacillus* spp. ou por *Pediococcus* spp.

A fase de maturação inicia-se quando são convertidos cerca de 70 % a 90 % dos açúcares presentes no mosto. Nesta fase, estão presentes na cerveja os *off-flavours*, e necessitam de ser reduzidos ou removidos para melhorar as propriedades organoléticas do produto. Primeiramente ocorre uma redução da temperatura até aproximadamente 7 °C promovendo a metabolização das DCV's a acetoina e a 2,3-butanodiol, que não possuem aroma, através da ação de redutases, sendo muito mais tolerados no produto final (Garcia *et al.*, 1994; Pires & Brányik, 2015). Atingido o valor pretendido de concentração de diacetilo, inferior a 0,08 mg/L, a cerveja deverá ser arrefecida até uma temperatura muito próxima dos -1 °C, provocando a precipitação dos polipéptidos e dos polifenóis presentes, facilitando assim a sua remoção na etapa seguinte de filtração/clarificação. Esta redução da temperatura melhora a estabilidade coloidal da cerveja, visto que a presença destes compostos no produto final causa turvação. Além disso, também auxilia na floculação da restante levedura em suspensão (Eblinger, 2009).

A fermentação em mostos de alta gravidade, isto é, com elevada concentração de açúcares, tornou-se uma prática comum entre as cervejeiras, nomeadamente na cervejeira artesanal da empresa, devido ao aumento da capacidade de produção, reduzindo os custos associados e melhorando a estabilidade do processo e a qualidade do produto (Erten *et al.*, 2007). No entanto, a repressão dos mecanismos de resistência ao stress, devido ao sistema de deteção da presença de glucose e à oxigenação insuficiente no estágio inicial da fermentação, pode levar a um baixo desempenho da fermentação e até à autólise da levedura (Pires & Brányik, 2015; Priest & Campbell, 1999).

No final da fermentação, procede-se à recolha da levedura e ao seu armazenamento em tanques de *stockagem*. Os tanques de *stockagem* são tanques de armazenamento da levedura após cada fermentação, para depois ser reutilizada em fermentações futuras, se a percentagem de viabilidade for superior a 90 %. É possível utilizá-la novamente para inocular novos mostos, mas não continuamente. Ao fim de, em média, oito fermentações, a levedura é vendida para ração animal.

Após esta estabilização a frio, e antes da cerveja seguir para o enchimento, é feita uma clarificação de modo a eliminar as partículas que irão conferir turvação, essencialmente células de levedura que não foram retiradas nas purgas e precipitados de proteínas. Numa primeira fase, a cerveja passa por um filtro de membranas ou filtro de *kieselguhr* para eliminar células de levedura, algumas proteínas e substâncias em suspensão. Na fase seguinte, a cerveja é encaminhada para o filtro PVPP (polivilpolipirrolidona) levando a que os polifenóis e as proteínas que se aglomeraram, anteriormente, sejam removidos. O último elemento de clarificação são os filtros *trap* utilizados com o objetivo de

aprimorar a operação de clarificação, já que estes são capazes de realizar uma filtração rigorosa e de remover microrganismos (Eblinger, 2009). No entanto, este passo de clarificação é feito apenas quando o objetivo é obter uma cerveja em conformidade com os requisitos do mercado de um produto límpido, transparente e brilhante.

Após a filtração da cerveja, o teor de extrato é corrigido, assim como o teor de dióxido de carbono e de dióxido de enxofre (que evita a sua oxidação), e é feito o ajuste de todos os valores dos parâmetros físico-químicos que caracterizam o produto, tais como a cor, o extrato, o teor alcoólico, o amargor e o pH (Eblinger, 2009).

Durante todo o processo de filtração devem ser garantidas baixas temperaturas e ausência de oxigênio. Foi demonstrado que o oxigênio tem um papel crucial na deterioração do sabor. Os ácidos gordos insaturados no mosto são oxidados, e por oxidação lipídica formam, entre outros, o *trans*-2-nonenal, que está na origem do sabor a cartão (Lea & Piggott, 1995).

Por fim, a cerveja é enviada e armazenada em Tanques de Cerveja Filtrada (TCF) até ao seu enchimento. A cerveja pode chegar ao consumidor final em quatro diferentes tipos de embalagem: em garrafa de vidro (tara perdida ou tara recuperável), em lata, em barril ou em camiões-cisterna (*beer-drive*) (Kunze & Weber, 2004).

De forma a fornecer ao cliente cerveja isenta de microrganismos é necessário tratá-la no último momento possível, logo após estar na embalagem fechada, isolada da exposição à atmosfera. Isto é conseguido através da pasteurização das garrafas capsuladas, de modo a eliminar microrganismos que possam estar presentes na embalagem. No final, as garrafas são devidamente rotuladas e embaladas.

### 3. Generalidades sobre leveduras utilizadas na produção de cerveja

#### 3.1. Características gerais

As leveduras são organismos eucariotas unicelulares, que taxonomicamente se encontram no grupo dos fungos. Destas, as que possuem maior importância comercial pertencem ao género *Saccharomyces*, as quais, devido à sua excelente capacidade fermentativa encontram grande aplicação, desde o fabrico de pão até produtos alcoólicos como cerveja, vinhos e destilados. As leveduras do género *Saccharomyces* são responsáveis pela maioria dos processos de fermentação alcoólica conhecidos (Kunze & Weber, 2004).

O conhecimento da estrutura e da composição das células de leveduras, bem como o seu metabolismo e crescimento é de extrema importância, visto que, as leveduras não produzem apenas etanol como resultado de seu metabolismo, mas também outros subprodutos que exercem uma grande influência no sabor e na qualidade da cerveja (Kunze & Weber, 2004).

#### 3.2. Estrutura, composição e morfologia da levedura

As leveduras apresentam a forma de uma elipse e dimensões bastante superiores às das bactérias, podendo ser, portanto, microscopicamente diferenciáveis destas, até porque também possuem organelos celulares característicos de células eucariotas. Estas células possuem um comprimento entre 8 µm e 10 µm e uma largura de 5 µm a 7 µm. Contêm cerca de 75 % de água e, a matéria seca varia na sua composição entre: proteína de 40 % a 60 %, hidratos de carbono de 25 % a 35 %, ácidos gordos (lípidos) de 4 % a 7 % e minerais de 6 % a 9 %. Em termos de minerais, contêm 20 mg/g de fosfatos, 24 mg/g de potássio, 2 mg/g de sódio, 0,2 mg/g de cálcio, 0,02 mg/g de magnésio, 0,07 mg/g de zinco, e vestígios de ferro, manganês e cobre (Kunze & Weber, 2004).

Cada célula de levedura é constituída por plasma celular (citoplasma e citosol) que é circundado por uma membrana celular e na qual uma série de organelos são incorporados, responsáveis pelas reações metabólicas (Kunze & Weber, 2004). A célula é envolvida por uma parede, dentro da qual está presente a membrana plasmática, que para além de oferecer força à célula, também desempenha um papel importante nas interações intercelulares. É através das ligações entre a parede celular e os componentes do meio fermentativo, como o cálcio, que as células floculam e migram para a base do fermentador. A função da membrana celular é regular o que entra e sai

da célula. Embora a levedura possua reservas alimentares intracelulares, esta depende dos componentes presentes no meio de crescimento, que no caso da cerveja é mosto, para a sua sobrevivência e crescimento (Bamforth, 2003).

### 3.3. Estirpes de levedura

A nível da indústria cervejeira, e dependendo das características genómicas, fisiológicas e fermentativas, as leveduras podem ser divididas em dois principais grupos, *Ale* e *Lager*. A espécie de levedura utilizada varia consoante o estilo de cerveja, mas, de forma clássica, para estilos de cerveja de alta fermentação (cervejas fermentadas a temperaturas mais altas, entre 18 °C e 22 °C; estilos *Ale*) recorrem a estirpes da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Geralmente estas leveduras ascendem ao topo dos fermentadores quando floculam no final da fermentação, devido ao facto da membrana celular ter fortes características hidrofóbicas, e também devido às bolhas de CO<sub>2</sub> libertadas durante o processo. Por outro lado, as leveduras de baixa fermentação (cervejas fermentadas a baixa temperatura, entre 6 °C e 15 °C; estilos *Lager*) são utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus*, um híbrido de *Saccharomyces cerevisiae*, antigamente referido como *Saccharomyces carlsbergensis*. Este tipo de levedura tem uma membrana com elevado carácter hidrofílico e, portanto, tende a assentar no fundo do fermentador quando começa a flocular, à medida que a fermentação se aproxima do fim (Boulton & Quain, 2001; Esslinger & Narziss, 2012; Pires & Brányik, 2015).

### 3.4. Metabolismo da levedura

O crescimento de leveduras requer fontes de carbono e nitrogénio, fatores de crescimento, vitaminas, minerais, oxigénio, água, e condições ideais de temperatura e pH (EBlinger, 2009). O mosto é considerado como meio de crescimento, já que atende à maioria dos requisitos nutricionais das leveduras. Para o seu metabolismo, a levedura utiliza vários compostos presentes no mosto, nomeadamente: os açúcares como fonte de carbono e energia; os aminoácidos, também designados por FAN (*Free Amino Nitrogen*), como fonte de azoto; e vários iões e vitaminas necessários para o seu desenvolvimento (Bamforth, 2003). Por vezes, suplementos de levedura podem ser adicionados ao mosto para compensar qualquer insuficiência, especialmente minerais. Relativamente à metabolização dos açúcares, estes atravessam a membrana celular da levedura pela ação de sistemas de transporte específicos, dada a sua reduzida permeabilidade. As

moléculas de açúcar mais pequenas, como é o caso da glucose e da frutose são admitidas por difusão facilitada com o auxílio da permease, interrompendo o transporte quando as concentrações forem iguais dentro e fora da célula, aproximadamente cerca de 24 h após o início da fermentação. Estas moléculas poderão ser consumidas durante a fermentação sem sofrerem qualquer tipo de hidrólise (Boulton & Quain, 2001; Cruz, 2007). No que concerne às moléculas de açúcar de maior dimensão, pode-se especificar a maltose, a maltotriose, e a sacarose. A metabolização da sacarose é controlada pela invertase, enzima extracelular excretada pela levedura. Esta enzima hidrolisa a sacarose em glucose e frutose que são, então, conduzidas para dentro da célula pelos mecanismos já descritos, difusão facilitada pela permease. A maltose e a maltotriose penetram na célula por um mecanismo de transporte ativo, mediado pela ATPase, juntamente com um ião de hidrogénio. No interior da célula, a maltose é degradada em duas moléculas de glucose pela enzima maltase, enquanto, a maltotriose dá origem a três moléculas de glucose (Boulton & Quain, 2001; Cruz, 2007). Por outro lado, outros açúcares presentes no mosto, como dextrinas, não são fermentescíveis (Hornsey, 1999). Em resposta a condições de stresse nutricional, as leveduras desenvolveram mecanismos de deteção. É o caso da repressão catabólica, que ocorre quando a glucose, ou um produto inicial do metabolismo da glucose, reprime a síntese de várias enzimas glicolíticas e respiratórias, independentemente da presença ou ausência de oxigénio. Esse fenómeno é conhecido como o efeito *Crabtree*, que induz leveduras a um estado fermentativo em vez de metabolizar a glucose pela respiração (Bamforth, 2003; Rolland *et al.*, 2002).

Outra fonte importante de hidratos de carbono é o glicogénio. Serve como hidrato de carbono de reserva e é produzido na célula durante as fases anaeróbias mais tardias da fermentação. Depois de transferida a levedura para o mosto arejado, o glicogénio é utilizado para iniciar as atividades enzimáticas e o metabolismo. É importante preservar o glicogénio durante o armazenamento de leveduras para garantir um início rápido da fermentação (EBlinger, 2009).

Como fatores de crescimento, as vitaminas são necessárias em baixas concentrações, e o mosto é geralmente capaz de fornecer uma quantidade suficiente desses componentes. Entre as vitaminas, a biotina é essencial para a maioria das estirpes cervejeiras (Hornsey, 1999).

Alguns minerais desempenham um papel crucial na fisiologia da levedura, entre os quais, o potássio, o magnésio, o cálcio, o manganês, o ferro, o cobre e o zinco (EBlinger, 2009). É uma



prática recorrente suplementar o mosto com zinco, uma vez que a maior parte deste mineral permanece nos grãos de cereais. Um limite crítico desse elemento deve ser mantido durante a fermentação, pois afeta a atividade da álcool-desidrogenase, estimula a ingestão de maltose e maltotriose e contribui para as estruturas proteicas.

O oxigênio é um nutriente limitante durante a propagação da levedura e o *pitching* do mosto (inoculação do mosto). As leveduras precisam de oxigênio para o crescimento e para a sua manutenção (Hornsey, 1999).

Após o transporte dos açúcares para o interior da célula inicia-se a fermentação propriamente dita. A fermentação visa a produção de energia por parte da célula, mas também de etanol e dióxido de carbono, utilizando a glucose ou a frutose (Kunze & Weber, 2004).

### 3.5. Armazenamento de leveduras em laboratório

A utilização de culturas puras no processo de fabrico de cerveja é uma prioridade, contribuindo para a consistência e confiabilidade do processo. As empresas podem optar por laboratórios externos ou internos para isolar e manter as suas leveduras (Priest & Campbell, 1999). A seleção do melhor procedimento dependerá da política da empresa, todavia, a abordagem mais flexível inclui armazenamentos de longo e curto prazo (Boulton & Quain, 2001). Além dos custos de manutenção e capital, tempo de manuseamento, logística e segurança do transporte, a fisiologia, a viabilidade e a estabilidade genética das leveduras devem ser os fatores que mais influenciam na escolha do método de armazenamento. Independentemente dos métodos selecionados, as melhores práticas requerem o controlo fisiológico e microbiológico das leveduras antes e após o armazenamento (Boulton & Quain, 2001).

Os métodos de armazenamento mais comuns são subcultura (de 1 °C a 4 °C em agar líquido), criopreservação (a -196 °C), congelamento (de -80 °C a -150 °C) e liofilização (de 1 °C a 4 °C, no escuro). Enquanto a subcultura é um armazenamento de curto prazo, devido à instabilidade genética e ao elevado risco de contaminação, a criopreservação ou o congelamento são métodos de armazenamento de longo prazo que permitem maior conservação da levedura, preservam a estabilidade genética e têm um risco de contaminação quase insignificante (Bond, 2007). Devido à possibilidade de falha mecânica ou perda de energia, os *backups* das células devem sempre ser mantidos em meio sólido a 4 °C (Priest & Stewart, 2006).

A liofilização consiste no congelamento rápido das culturas, seguido de uma secagem a vácuo para que a água seja removida por sublimação. Apesar da sua popularidade como método de armazenamento a longo prazo, a reputação de liofilização tem vindo a perder robustez desde que alguns estudos relataram que a secagem e o congelamento provocavam a perda de viabilidade, alterações na flocculação e interferências no genoma da levedura de amostras (Boulton & Quain, 2001). No entanto, o desenvolvimento de novos métodos de liofilização, nomeadamente através da utilização de trealose como protetor, permitiu atenuar estas limitações, aumentando, assim, a viabilidade das leveduras armazenadas (Bond, 2007).

### 3.6. Propagação da levedura

A propagação periódica em meios frescos permite a renovação de leveduras, garantindo a manutenção da sua identidade e limitando possíveis fontes de variação no processo. A periodicidade da propagação varia conforme a política da cervejeira, com as leveduras utilizadas e com as condições do processo. Além disso, não há um método padrão para o processo de propagação; apenas depende dos requisitos do processo e das instalações disponíveis. Porém, o aumento do volume entre as etapas deve respeitar o fator recomendado de aumento de escala, geralmente 10 a 20 vezes, que evita a inibição do crescimento (Bamforth, 2016).

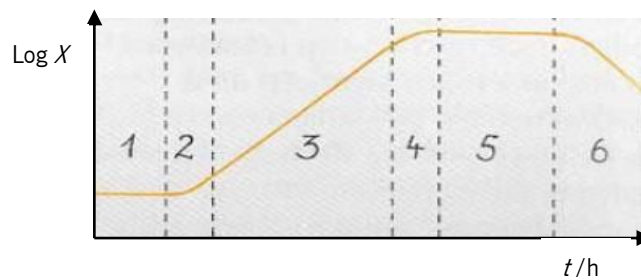
O objetivo dos novos sistemas de propagação é alcançar o maior rendimento no menor tempo de ciclo, manipulando a temperatura e a taxa de oxigenação (Boulton & Quain, 2001). No entanto, apenas algumas cervejeiras aproveitam a otimização desses dois parâmetros, já que a maioria dos propagadores não são agitados e são arejados periodicamente, resultando numa baixa transferência de massa. É assumido, geralmente, que a convecção natural gerada pelo metabolismo ativo da levedura é suficiente para manter as células em suspensão, excluindo a necessidade de agitação (Priest & Stewart, 2006). A temperatura ótima de crescimento é maior do que a temperatura de fermentação, mas, a temperatura de propagação não deve ser superior à temperatura de fermentação em mais de 2 °C a 4 °C, para evitar choque térmico durante o *pitching* do mosto (Eblinger, 2009).

#### 3.6.1. Crescimento anaeróbio

A fermentação é a etapa mais importante durante todo o processo de produção de cerveja, devido ao facto de ser nesta etapa que as leveduras convertem os açúcares presentes do mosto em etanol

e dióxido de carbono, sobretudo. Para além destes produtos, formam-se ainda outros subprodutos que contribuem para as propriedades organoléticas da cerveja (Lewis, 2015).

A fermentação divide-se em 6 fases distintas, fase *lag* ou de latência (1), fase de aceleração (2), fase exponencial (3), fase de desaceleração (4), fase estacionária (5) e fase de declínio ou morte (6), ilustradas na Figura 2. O crescimento de leveduras num propagador é descrito pelas equações padrão do crescimento microbiano numa cultura descontínua (Priest & Campbell, 1999).



**Figura 2** – Gráfico representativo das fases de crescimento da levedura, expresso em número total de células viáveis ( $X$ ) durante o tempo de fermentação ( $t$ ) (adaptado de Kunze & Weber, 2004).

Na primeira fase, fase de latência, existe uma ativação do metabolismo no qual as leveduras são transferidas de um meio para outro, com condições diferentes. Esta fase de adaptação celular às novas condições do meio depende de vários fatores, como a idade e o fenótipo do inóculo, as condições ambientais (temperatura, arejamento, pH) e a composição do meio (Kunze & Weber, 2004). Consomem o  $O_2$  presente no mosto e utilizam as suas reservas de glicogénio, visto que a assimilação de açúcares é praticamente inexistente. Também absorvem aminoácidos, vitaminas e minerais presentes no mosto e produzem enzimas e constituintes da parede celular necessários ao seu crescimento e à sua reprodução. A fase de latência termina com a primeira divisão celular (Boulton & Quain, 2001).

Na fase de aceleração, que se segue à fase de latência, a taxa específica de crescimento aumenta continuamente.

A fase seguinte é a fase de crescimento exponencial ou logarítmico, na qual a taxa de crescimento é constante e máxima. É caracterizada pela multiplicação intensa das células de levedura. Durante a fase exponencial, a taxa de crescimento, em cada instante, é proporcional ao número respetivo de células (Equação 1) e o número de células aumenta na progressão geométrica  $2^n$ . Assim, após

$n$  duplicações (ou gerações), o número de células é dado por  $2^n X_0$  ( $X_0$  é o número inicial de células).

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_t \quad (\text{Equação 1})$$

$X_t$  representa o número de células no momento  $t$ , e  $\mu$  é a taxa específica de crescimento. O tempo que uma célula leva para se dividir é chamado de tempo de duplicação ( $t_d$ ). Reorganizando e integrando a Equação 1, é possível determinar o tempo de duplicação demonstrado na Equação 2.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Equação 2})$$

É, também, na fase exponencial que o oxigénio é todo consumido, a levedura entra em condições de anaerobiose, iniciando assim a fermentação propriamente dita. Ocorre o transporte dos açúcares do mosto para o interior da levedura e inicia-se a oxidação da glucose e da frutose a piruvato. A metabolização destes componentes, explicada no subcapítulo 3.4, resulta na produção de etanol e dióxido de carbono. Nesta fase a maioria das células encontra-se no mesmo estado fisiológico e é extremamente sensível/suscetível a alterações do meio ambiente (Kunze & Weber, 2004).

Devido a vários fatores, como por exemplo, redução na quantidade de substratos nutricionais ou aumento da quantidade de produtos metabólicos que inibem o crescimento, a fase logarítmica ocorre apenas por um tempo limitado. É seguida pela fase de desaceleração, durante a qual a taxa de crescimento diminui gradualmente (Kunze & Weber, 2004).

À medida que os nutrientes no meio se esgotam, e se vão acumulando produtos inibitórios ao seu crescimento, este vai retardando e eventualmente estabiliza, e a cultura entra na fase estacionária de crescimento. Ocorre quando já não existem açúcares fermentescíveis no mosto e começam a depositar-se, no fundo cónico do fermentador, agregados de levedura (floculação). Algumas leveduras podem começar a flocular precocemente e, por isso, é importante verificar o grau de atenuação (medida do consumo de açúcares) para se confirmar que a levedura completou a fermentação. Nesta fase a taxa de crescimento iguala a taxa de morte. Quando o número de células mortas excede o número de células vivas, a cultura encontra-se na fase de declínio (Kunze & Weber, 2004).

### 3.6.2. Propagação à escala laboratorial

A propagação no laboratório consiste numa série de etapas de aumento progressivo de volume, durante as quais a levedura é transferida do meio sintético para o mosto esterilizado (Boulton & Quain, 2001). A propagação de leveduras em ágar inclinado deve obedecer a alguns requisitos. Primeiro, esta deve ser realizada num local apropriado, separado da restante fábrica de cerveja e com acesso restrito. Para minimizar o risco de contaminação, a sala deve ser mantida sob pressão negativa e ter a sua própria ventilação de ar filtrado. Além disso, o funcionamento do propagador deve atender aos requisitos de higiene de alta qualidade e o número de passagens deve ser minimizado para evitar possíveis contaminações. Além disso, as passagens devem ser realizadas em condições assépticas, idealmente numa câmara de fluxo laminar. O número de células deve ser monitorizado para garantir que as células se encontram em fase de crescimento exponencial antes de serem transferidas para a etapa seguinte (Priest & Campbell, 1999).

### 3.6.3. Propagação à escala industrial

Após terminar a propagação à escala laboratorial, o inóculo de um ou de mais propagadores, consoante os requisitos da cervejeira, é transferido para o propagador industrial de produção de cerveja, aplicando pressão máxima através da entrada de ar. O local de amostragem, pelo qual o inóculo é introduzido no fermentador “*seed*” (fermentador industrial de dimensão intermédia), deve ser esterilizado a vapor. O mosto, que se adicionará ao fermentador “*seed*”, deve ser esterilizado previamente e mantido num tanque de conservação, ou pode ser esterilizado *in situ* antes da inoculação no fermentador de dimensão intermédia (Boulton & Quain, 2001). Quando o inóculo, presente no fermentador “*seed*”, atinge o pico de crescimento exponencial, deve ser transferido para o tanque de fermentação (tanque de maior dimensão).

Por vezes, a densidade celular no final da propagação pode não ser suficiente para induzir fermentações fortes, o que pode provocar um risco maior de contaminação bacteriana (Bamforth, 2016). Além disso, uma reduzida taxa de “*pitching*” pode induzir a um baixo grau de fermentação e/ou instabilidade no sabor da cerveja. Nesses casos, pode ser necessário realizar uma fermentação de primeira geração, em fermentadores menores, ou encher parcialmente fermentadores maiores, para aumentar a densidade celular até ao volume pretendido (Boulton & Quain, 2001).

## 4. Controlo da Qualidade

### 4.1. Monitorização e Controlo da Fermentação

O controlo da fermentação permite a identificação precoce de comportamentos não esperados, maximizar a produtividade do fermentador, e também promover a consistência do processo e a qualidade do produto (Boulton & Quain, 2001). O progresso da fermentação é avaliado através do extrato, do teor alcoólico, do grau de atenuação e da monitorização de pH (Kunze & Weber, 2004). O extrato é uma medida da concentração de açúcares presentes no mosto, determinado a partir da sua densidade relativa (Bamforth, 2016). No início da fermentação, o mosto é acidificado devido à excreção, pela levedura, de vários ácidos orgânicos e à libertação de protões durante a assimilação dos açúcares. Assim, a supervisão da variação do pH é uma forma de avaliar o progresso da fermentação (Boulton & Quain, 2001).

Os níveis de dicetonas vicinais (DCV's) são estritamente monitorizados durante as últimas fases da fermentação e na maturação, devido ao sabor indesejável que conferem às cervejas (Boulton & Quain, 2001).

A eficiência da fermentação é de, aproximadamente, 26 %, o que significa que 74 % da energia é dissipada como calor (Priest & Campbell, 1999). Portanto, o controlo da temperatura durante a fermentação é essencial para garantir a consistência do processo e do produto. A montante da fermentação, a composição do mosto, a taxa de “pitching” e a concentração de oxigénio dissolvido no mosto, devem ser controladas (Boulton & Quain, 2001).

Paralelamente, também é importante a realização de medições da contagem celular de levedura, que irá aumentar numa fase inicial, na fase de crescimento e de multiplicação, e diminuir ao longo da fermentação, devido à floculação.

### 4.2. Controlo microbiológico

Apesar de ser um produto resultante de um processo biológico, o conhecimento profundo da complexa rede de fatores que afetam a qualidade da cerveja e de como os controlar é notável numa indústria cervejeira (Bamforth, 2016).

Apesar das características antimicrobianas inerentes à cerveja, como o alto teor alcoólico, o pH baixo, as baixas concentrações de oxigénio e nutrientes e, em alguns casos, a presença de ácidos

provenientes do lúpulo, com propriedades antissépticas, algumas leveduras selvagens e bactérias podem ainda causar deterioração do produto (Bamforth, 2009). A implementação de um plano de controlo microbiológico durante todo o processo de fabrico da cerveja é de grande importância para a consistência do produto e do processo. Além disso, contribui para a integridade da marca, reduzindo a quantidade de resíduos formados e a necessidade da recolha de produtos contaminados (Bamforth, 2016). O grau de perigo de um contaminante dependerá da fase do processo em que é detetado. À medida que se avança rumo ao produto final, os custos associados à deterioração microbiana aumentam (Vaughan *et al.*, 2005).

Os organismos de deterioração mais comuns da cerveja são as bactérias ácido lácticas (LAB) dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. A presença destas bactérias está associada a fermentações atrasadas/prolongadas e ao desenvolvimento de sabores e cheiros desagradáveis (Bamforth, 2009). Também as leveduras selvagens, que incluem todas as estirpes de leveduras que não são introduzidas intencionalmente no processo de fermentação, quando presentes, provocam impactos, tais como, o baixo desempenho da fermentação e o desenvolvimento de aromas e sabores desagradáveis (Vaughan, *et al.*, 2005).

Embora os métodos tradicionais de determinação microbiana por incubação em placas de *Petri* estéreis sejam lentos, e não tenham especificidade nem sensibilidade, continuam a ser os mais usados entre as cervejeiras (Jespersen & Jakobsen, 1996). As particularidades do ambiente da produção de cerveja e as crescentes necessidades da indústria promoveram o desenvolvimento de meios de cultura específicos para a deteção de organismos de deterioração. Esses meios destacam-se por possuírem cerveja na sua composição, geralmente da própria cervejeira, estimulando o crescimento de determinados microrganismos que aí possam crescer (Jespersen & Jakobsen, 1996). O meio ideal para cada aplicação depende das características inerentes ao processo e aos produtos, o que implica um profundo conhecimento de natureza microbiológica.

Antes de cada inoculação, é necessário confirmar se a levedura está adequada para o efeito. Três tipos de teste de qualidade podem ser aplicados. Primeiro, a levedura deve estar livre de contaminação microbiana. Segundo, é comum determinar a viabilidade da levedura, isto é, a quantidade de células viáveis. Na maioria das cervejeiras a levedura é rejeitada se a viabilidade se encontrar abaixo de um limite predefinido, normalmente abaixo de 85 % a 90 %. Além disso, os valores da viabilidade são usados para determinar a quantidade de levedura que é necessário

adicionar para atingir a taxa de *pitching* desejável. O terceiro indicador de qualidade consiste em testes de vitalidade, que procuram investigar aspetos da condição fisiológica da levedura (Boulton & Quain, 2001).

#### 4.3. Sistemas de gestão da qualidade

É crucial obter produtos de forma consistente, atendendo aos requisitos dos clientes, embora a perceção da qualidade seja uma questão subjetiva (Bamforth, 2016).

O manual da qualidade é o primeiro documento num sistema de gestão da qualidade (SGQ), no qual, o âmbito, as políticas e os requisitos do sistema da qualidade são descritos em pormenor (Bamforth, 2016). Procedimentos e instruções de trabalho de todas as principais operações também devem ser incluídos no sistema documental. Simultaneamente, é fundamental garantir registos que comprovem a conformidade dos requisitos e que os funcionários sejam qualificados para executar tarefas críticas que não possam comprometer a qualidade do produto. Um SGQ bem estabelecido também requer programas de calibração.

A abordagem de garantia de qualidade garante que o produto está dentro das especificações em todas as etapas do processo de produção (Boulton & Quain, 2001). Portanto, as análises microbiológicas e físico-químicas devem ser orientadas em relação aos pontos críticos de controlo do processo. Os planos teste e de inspeção (ITP – *Inspection and test plans*) devem ser projetados para atender às especificações exigidas, detalhando a frequência de amostragem e o volume da amostra e, os respetivos métodos de análise.



## 5. Métodos de contagem celular e de viabilidade celular

O conhecimento da viabilidade celular das leveduras, e da contagem precisa do número de células, são vitais durante todo o processo fermentativo para obter fermentações consistentes e cerveja de qualidade.

A avaliação da viabilidade celular é imperativa para controlar a quantidade de levedura que é necessário adicionar a um fermentador (taxa de *pitching*) após a propagação em laboratório, ou para determinar o que fica em suspensão após a fermentação, essencial para propagações futuras (Priest & Campbell, 1999). Um controlo deficiente poderá conduzir a problemas durante a filtração e consequências económicas negativas no processo fermentativo (Boyd *et al.*, 2003).

Do mesmo modo que a grande maioria das técnicas analíticas foi sofrendo evoluções ao longo dos tempos, também os métodos de contagem de células de levedura e da viabilidade celular evoluíram. Assim, têm vindo a ser aplicados métodos cada vez mais automatizados e expeditos, ao invés dos métodos unicamente dependentes do operador, como por exemplo o microscópio (Boyd *et al.*, 2003).

### 5.1. Métodos tradicionais

#### 5.1.1. Visual ou Lupa

Tradicionalmente, a contagem de células viáveis de levedura pode ser efetuada por simples observação direta ou com recurso a uma lupa. As análises de viabilidade são baseadas na replicação celular realizadas por plaqueamento de um determinado número de células em placas de *Petri* estéreis sobre um meio de cultura propício ao desenvolvimento do microrganismo em análise, procedendo-se depois à incubação destas (Boulton & Quain, 2001). Para tal, assume-se que cada célula viável dará origem apenas a uma colónia. As células não viáveis não sofrem replicação para criar colónias. As unidades formadoras de colónias (*UFC*) são então contadas para determinar o conteúdo de células viáveis. O resultado pode ser expresso em termos de concentração celular, por exemplo, por unidade de volume de amostra. No entanto, este método apresenta algumas limitações, tais como, a incubação em placas ser muito lenta (Thomson *et al.*, 2015), e os erros observados tendem a ser maiores do que com recurso a análises microscópicas, necessitando assim de um maior número de amostras para analisar. Estes erros devem-se ao facto de que as células agregadas podem dar origem a apenas uma colónia, o que contraria o que

inicialmente se assume, ou seja, que apenas uma célula dará origem a uma colónia (McLean *et al.*, 2001).

Outra desvantagem está relacionada com a ausência de colónias após o período de incubação. Tal facto leva a concluir que as células se encontravam mortas no momento da amostragem, o que pode não corresponder à realidade, uma vez que existem evidências de estados intermediários das células que permanecem indetetáveis aos métodos tradicionais. As células em estados intermediários são geralmente mencionadas na literatura como viáveis, mas não cultiváveis (VBNC – “*viable but non-culturable*”), dificultando assim a classificação das células como viáveis ou não viáveis. Isto deve-se ao facto de o meio de incubação no laboratório não corresponder exatamente ao meio em que as células se encontram durante o processo industrial (Díaz, *et al.*, 2010).

Este método é utilizado normalmente para detetar possíveis contaminações microbiológicas em vários pontos do processo produtivo, e não na contagem de células propriamente dita.

#### 5.1.2. Microscopia

Uma alternativa ao método tradicional para determinar a concentração celular e a viabilidade celular é a microscopia. Os microscópios transmitem uma imagem ampliada da amostra, de forma a conseguir visualizar, a olho humano, todos os detalhes nela presentes (Abramowitz & Davidson, 2007). O microscópio ótico tem um limite de resolução, com a objetiva de 40×, de aproximadamente 200 nm, determinado pelo comprimento de onda mínimo da radiação visível, que é 500 vezes superior que o limite de resolução do olho humano (0,1 mm) (Goodhew *et al.*, 2001).

Existem diversos tipos de microscópios óticos, dependendo do modo como o feixe de luz atinge a amostra, tais como, microscópio de campo claro, microscópio de luz de contraste de fase, microscópio de campo escuro, microscópio de luz polarizada e microscópio de luz de fluorescência.

Os métodos de microscopia usados para a determinação da viabilidade celular são baseados no uso de corantes celulares que medem a capacidade de replicação e a atividade de determinadas enzimas intracelulares. De uma forma geral, o que se verifica é uma coloração diferencial entre as células vivas e as mortas, que respondem de forma diferente, podendo incorporar ou não o

corante, ou ainda, transformando-o intracelularmente por ação enzimática. Os corantes utilizados industrialmente incluem o azul de metileno e violeta de metileno, que são adicionados às amostras para permitir a análise da viabilidade, e baseiam-se no princípio de exclusão, ou seja, as células não viáveis vão apresentar coloração quando observadas ao microscópio. Esta coloração permite determinar as células viáveis, ou seja, células que são capazes de se reproduzir, pois o corante fica apenas retido nas células sem capacidade de reprodução (células não viáveis) deixando-as com uma cor azul, enquanto que as células com atividade metabólica e capacidade de reprodução permanecem incolores (Chilver *et al.*, 1978).

Esses dois métodos, microscopia e visual, ainda permanecem como as mais usadas para determinar a concentração celular e a viabilidade celular (Bouix *et al.*, 2000; Boyd *et al.*, 2003). No entanto, apresentam uma característica comum, o facto de serem lentos e de precisão limitada. Os erros associados ao procedimento por microscopia são altos, cerca de 20 % a 30 %, geralmente devido a erro humano, interpretação humana e, também possivelmente, ao reduzido volume de amostra que se usa, normalmente de 0,1  $\mu$ L. Além disso, os operadores precisam distinguir as células de levedura de outra biomassa microbiana que possa estar presente (Thomson *et al.*, 2015).

## 5.2. Métodos automatizados

Muitas cervejeiras pretendem adotar métodos de contagem e viabilidade celular que possam ser executadas por operadores de processo não qualificados ou para automatizar o processo de contagem de células, de forma a permitir uma tomada de decisão imediata e também a redução de custos da empresa (Thomson *et al.*, 2015).

Para ultrapassar as dificuldades associadas à contagem manual de células, foram desenvolvidas tecnologias automatizadas de contagem de células, envolvendo técnicas de processamento digital de imagens com recurso a microscopia, a citometria de fluxo, a métodos eletroquímicos baseados no princípio de *Coulter*, e também a monitorização da quantidade de células viáveis em tempo real (Thomson *et al.*, 2015). Uma variedade de contadores automáticos está disponível para analisar a grande diversidade de células. Estes têm tido sucesso, visto que aumentaram a consistência e reduziram o tempo para avaliar as amostras (Barber *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 1997).

### 5.2.1. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia de análise quantitativa que permite a contagem e análise das células através de um feixe de luz. Um citômetro de fluxo consiste em vários sistemas integrados para a detecção de células. O sistema ótico consiste numa ou mais fontes de luz (normalmente é usada luz laser, mas em alguns instrumentos é usada uma lâmpada de mercúrio) e uma série de lentes para focar o feixe de luz. Os filtros óticos combinados com detetores de luz (fotodíodos ou tubos fotomultiplicadores) permitem a detecção sensível dos sinais de interesse. O *Sheath fluid* é a solução usada num citômetro de fluxo. Uma vez que este fluido está a funcionar em fluxo laminar, as células são injetadas para o centro da corrente, a uma pressão ligeiramente mais alta. Os princípios do Foco Hidrodinâmico fazem com que as células se alinhem, em fila única, na direção do fluxo. Os citômetros de fluxo e os classificadores de células utilizam uma ou mais fontes de excitação e, um ou dois corantes fluorescentes, para medir e caracterizar milhares de células por segundo (Comas & Rius, 2009).

A intensidade dos sinais óticos produzidos, que são sinais de dispersão e/ou de fluorescência (no caso do uso de corantes fluorescentes), está correlacionada com os parâmetros estruturais e/ou funcionais das células. A principal característica dos citômetros de fluxo analítico é sua capacidade de medir um número grande de partículas (com uma frequência de leitura celular de  $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  em citômetros comuns, até  $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  ou mais em equipamentos especializados) enquanto mede vários parâmetros celulares em simultâneo. Desta forma, numa amostra, é possível distinguir partículas de células, ou até detetar células raras ou em pequenas quantidades, com base nas diferenças estatísticas entre variáveis que possam ser medidas ao mesmo tempo. Um citômetro de fluxo pode ser descrito como um “microscópio automático” possuindo algumas vantagens, tais como, a objetividade, a alta taxa de análise, a precisão e a sensibilidade (Díaz *et al.*, 2010).

A combinação de um corante *cell-permeant* (como a maioria da família SYTO) com um corante *cell-impermeant*, como o iodeto de propídio, pode ser usada para distinguir entre células vivas e mortas, suspensas em meios de cultura. Assim, as células são coradas com um dos dois fluorocromos, dependendo do seu estado fisiológico, enquanto as partículas não celulares, presentes na solução, permanecerão sem coloração (Comas & Rius, 2009).

Porém, a maioria dos contadores de células automatizados capazes de detetar a viabilidade de leveduras, usam corantes fluorescentes que apresentam maiores riscos do que os corantes de

microscopia clássica e, são mais caros (Chan *et al.*, 2012). O iodeto de propideo é considerado cancerígeno, e para além de não ser saudável para o operador, apresenta um potencial risco de contaminação numa cervejeira (Thomson *et al.*, 2015).

#### 5.2.2. Métodos eletroquímicos

Muitos dos equipamentos que utilizam métodos eletroquímicos baseiam-se no princípio de Coulter, designados também por “*Aperture Impedance method*”. De uma forma geral, os equipamentos que se baseiam neste princípio são constituídos por dois elétrodos, um externo e outro interno, mergulhados numa solução eletrolítica que possibilita a manutenção de um fluxo de corrente constante. As células que serão analisadas, ou seja, as células que vão ser contadas, encontram-se suspensas nessa solução. Para iniciar a medição, os dois elétrodos encontram-se imersos na suspensão de levedura, e é criado vácuo no orifício (“*aperture*”). Este orifício tem um tamanho específico, permitindo que a análise seja efetuada com o mesmo volume de amostra. Quando uma célula passa por esse orifício, a resistência total aumenta porque a célula não condutora substitui o eletrólito que é bom condutor de corrente. Tendo como base a lei de Ohm, pode-se concluir que o aumento da resistência num meio em que a intensidade de corrente é constante vai resultar num aumento de tensão (Beckman Coulter, 2011). Estas alterações de tensão são amplificadas como pulsos elétricos. O número de pulsos elétricos obtidos durante a contagem corresponde ao número de células contadas e quanto maior a intensidade do pulso elétrico maior será o volume da célula (Beckman Coulter, 2011).

A contagem de células de levedura efetuada na empresa, recorre ao *BECKMAN COULTER® Z2*, que se baseia no princípio de *Coulter*, e será descrito no subcapítulo 5.3.1.

Embora o *Coulter* permita efetuar uma contagem de células de levedura em pouco tempo e obter resultados precisos, não permite a distinção entre células vivas e células mortas. Assim, na empresa é utilizado o método de coloração com azul de metileno por observação microscópica para a determinação da viabilidade da levedura, que será detalhado em pormenor no subcapítulo 5.3.2.

#### 5.2.3. Monitorização em tempo real

Novos desenvolvimentos têm surgido para superar a limitação dos métodos eletroquímicos, e para automatizar o processo de contagem de células, em tempo real durante a fermentação.

Existem já dispositivos “*lab-on-chip*” que conciliam o princípio de *Coulter* com a dielectroforese, permitindo a contagem de células, bem como a determinação da sua viabilidade, devido ao facto de serem separadas em diferentes canais provocadas pelas diferentes propriedades dielétricas quando submetidas a determinadas frequências. Após a separação das células, a sua contagem é efetuada por medições de impedância, como descrito pelo princípio de Coulter (Mernier *et al.*, 2009).

As vantagens deste tipo de dispositivos passam pela possibilidade de efetuar análises em tempo real e pela rapidez na obtenção de resultados. Este equipamento concilia a capacidade de contagem de células com a determinação da viabilidade de forma automática e precisa (Mernier *et al.*, 2009).

Muitas cervejeiras estão a tentar adotar métodos de contagem e viabilidade celular que possam automatizar o processo de contagem de células, em tempo real durante a fermentação, usando instrumentação online, como a “*Radio frequency impedance spectroscopy – RFIS*”. A técnica é baseada na aplicação de um campo elétrico a uma suspensão de células e na criação de uma separação de carga dentro de cada célula. Como as células vivas possuem membranas plasmáticas intactas, uma polarização é induzida através da suspensão onde estas estão presentes, para fornecer uma leitura do seu conteúdo. As células mortas, as células danificadas, e outros sólidos não são medidos, pois não possuem uma membrana intacta e, portanto, não podem apresentar carga. Desta forma, a corrente elétrica medida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Essa é uma excelente maneira de monitorizar a concentração de células vivas numa amostra de suspensão de leveduras e tornou-se amplamente usada nas indústrias de cerveja e farmacêutica, monitorizando a quantidade de células viáveis em tempo real durante a fermentação ou para o controlo das taxas de *pitching* (Harris *et al.*, 1987; Thomson *et al.*, 2015).

Para efetuar este tipo de medições, utiliza-se uma sonda ligada a um instrumento principal denominado de *Yeast Monitor*. Esta sonda pode situar-se, por exemplo, na tubagem, enquanto o instrumento principal pode situar-se próximo do local de medição ou mesmo numa sala de controlo (Carvell & Turner, 2003).

As vantagens associadas a este tipo de medições, relativamente aos métodos clássicos, passam por se tratar de um método não invasivo, por não se basear na coloração de células e por diminuir

os erros associados aos métodos laboratoriais tradicionais. O facto de tornar possível o controlo *online* do processo, permite também que sejam tomadas medidas imediatas no caso de algo não correr conforme o previsto (Carvell & Turner, 2003).

#### 5.2.4. Microscopia digital

Para além das tecnologias mencionadas anteriormente neste capítulo, e mantendo estes desafios em mente, algumas cervejeiras preferem seguir metodologias padrão que removam a variabilidade entre operadores e o trabalho/tempo intensivo na contagem de células manualmente (Thomson *et al.*, 2015). É cada vez mais importante desenvolver técnicas mais familiares, mas com maior facilidade de uso e consistência.

No entanto, em 2015, foi relatado o funcionamento e os benefícios de um novo contador de células automatizado, o *Aber Countstar*, que analisa a viabilidade de leveduras usando o método de exclusão de corante azul de metileno, e fornece informações sobre a concentração de células totais, vivas e mortas (ASBC, 2015).

### 5.3. Equipamentos de análise utilizadas na empresa

No laboratório central da empresa, mais concretamente na área da microbiologia, para além de se despistarem possíveis contaminações ao longo de todo o processo de elaboração dos produtos, realiza-se a propagação de novas gerações de leveduras para fabricação de cervejas e de sidras. De forma a garantir fermentações consistentes e cerveja de qualidade, é essencial o conhecimento da viabilidade de leveduras e a contagem precisa de células vitais durante todo o processo de fermentação.

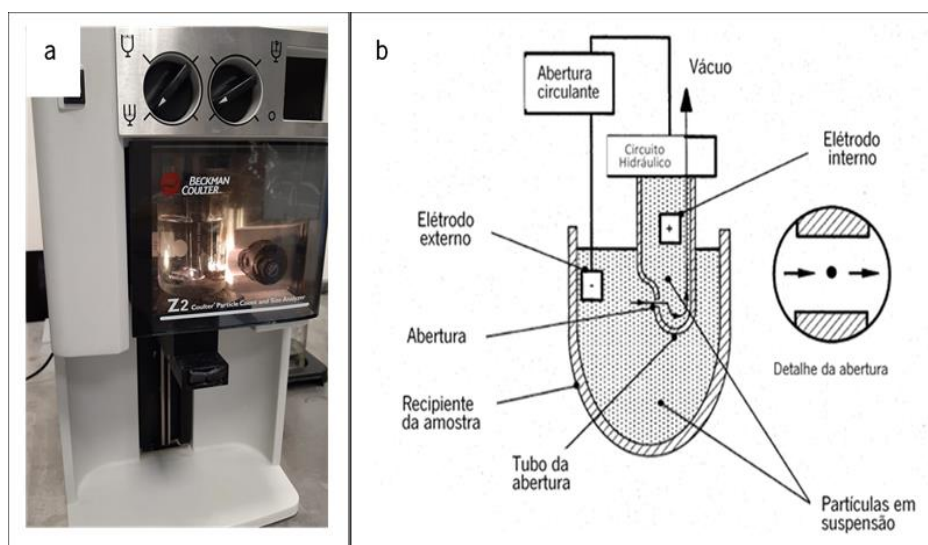
O crescimento de leveduras durante a propagação e fermentação pode ser avaliado por diferentes equipamentos, através do contador eletrónico de partículas (*BECKMAN COULTER® Z2*), do microscópio ótico (*Eclipse E600*) e de um equipamento automatizado (*Aber Countstar*). Quanto à viabilidade celular, ou seja, à contagem de células viáveis, pode ser analisada apenas no microscópio ótico e no *Aber Countstar*.

#### 5.3.1. *BECKMAN COULTER® Z2*

O *BECKMAN COULTER® Z2*, apresentado na Figura 3a, é um contador eletrónico de partículas frequentemente usado para contagem de células de leveduras, e baseia-se no princípio de *Coulter*

mencionado no subcapítulo 5.2.2. Dois elétrodos são responsáveis pela detecção de células que passam por uma pequena abertura, designada na Figura 3b de “abertura”. O tubo da abertura é submerso no recipiente da amostra e os elétrodos são responsáveis pela detecção de variações na resistência elétrica devido ao movimento de partículas através da abertura (Beckman Coulter, 2011).

A seleção eletrônica do número de pulsos elétricos permite a contagem seletiva de partículas e a amplitude do pulso elétrico produzido fornece informações sobre o volume da partícula (Beckman Coulter, 2011).



**Figura 3** – a) Contador eletrônico; b) Representação do sistema de contagem de células *BECKMAN COULTER@ Z2* (adaptado de Beckman Coulter, 2011).

Embora o contador eletrônico de partículas seja a técnica mais conveniente, não permite distinguir entre células únicas e em *budding* (em gemulação), e entre agregados celulares ou outra biomassa presente (Beckman Coulter, 2011). Portanto, as amostras devem ser analisadas primeiro quanto à sua morfologia celular, por observação microscópica.

### 5.3.2. Microscópio

Uma maneira tradicional de determinar a viabilidade, é por coloração das células com um corante celular e por contagem das células manualmente num microscópio ótico. É utilizado o microscópio ótico *Eclipse E600* (Nikon, EUA) com a ampliação de 400× e uma câmara de *Neubauer* na qual são colocadas as células após coloração, apresentados na Figura 4.



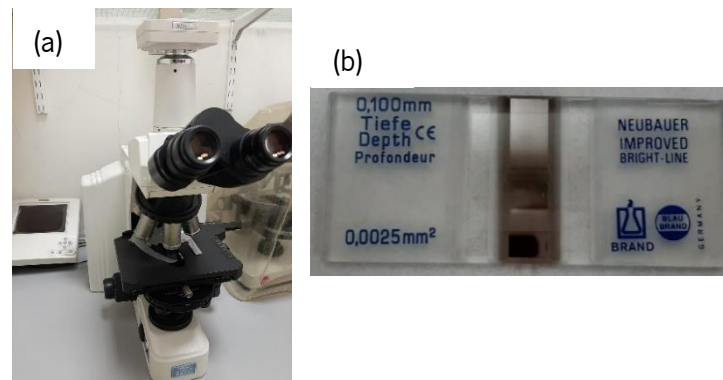


Figura 4 – a) Microscópio ótico Eclipse E600; b) Câmara de contagem de *Neubauer*.

### 5.3.3. *Aber Countstar Yeast*

Alternativamente ao *Coulter* e ao microscópio, um método automatizado pode ser usado, como o *Aber Countstar*. Esse método combina a microscopia de campo claro (*bright-field*) e o método de exclusão de corante azul de metileno com o processamento digital de imagens. Com uma câmara industrial de 5 megapíxeis, usando foco automático e um sofisticado algoritmo de análise de imagem digital, a medição de uma amostra de 20  $\mu\text{L}$  leva menos de 20 s, para fornecer a contagem de células (totais, vivas e mortas), a percentagem de viabilidade, o diâmetro médio da célula e o grau de agregação (Thomson *et al.*, 2015). Além disso, a variabilidade entre operadores é removida com o método automatizado de contagem (ASBC, 2015).

### 5.4. Equipamento *Aber CountStar Yeast*

O *Aber Countstar Yeast* automatiza o método de exclusão de corantes utilizado na microscopia normal, usando uma câmara e um *software* avançado para a contagem rápida de células de levedura e para estimar a viabilidade da levedura, permitindo que as cervejeiras persistam com o padrão tradicional de análise, mas removam a variabilidade entre operadores e o trabalho/tempo intensivo no processo manual (Aber Trusted Technology, 2015; Thomson *et al.*, 2015). É o primeiro instrumento de análise de imagens computacionais de células de levedura e pode ser usado com os mesmos corantes tradicionais, e seguros, usados em microscopia. O equipamento é simples de operar e elimina a operação demorada, aborrecida e potencialmente suscetível a erros de contagem manual (Aber, 2020).

Este equipamento automatizado apresenta benefícios, tais como: o manuseamento e o descarte seguro das amostras com corantes tradicionais (azul de metileno); dados facilmente comparáveis à microscopia tradicional; preparação mais simples do que os métodos baseados em corantes fluorescentes alternativos, de duas etapas; fornece de dados reprodutíveis, através da análise exclusiva da imagem com foco automático; necessita de um pequeno volume de amostra, apenas 20  $\mu\text{L}$ ; apresenta baixo custo e desperdício por teste, usa laminas de plástico descartáveis e embaladas individualmente com 5 compartimentos; permite análises numa grande faixa de concentrações celulares, entre  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  e  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  (Aber, 2020).

O sistema *Countstar* consiste em três componentes principais, o instrumento *Countstar*, os *slides* descartáveis e o *software*.

#### Instrumento *Countstar*

O instrumento *Countstar* automatizado, apresentado na Figura 5, contém o *hardware* principal do instrumento. Dentro da caixa de metal há uma câmara acoplada a uma lente de microscópio. Contém um mecanismo mecânico onde se coloca o *slide Countstar*. A amostra que irá ser medida é iluminada usando uma luz LED (Aber Trusted Technology, 2015).



**Figura 5** – Instrumento *Aber Countstar Yeast*.

#### *Slide Countstar*

O *slide Countstar* é um pequeno dispositivo de plástico com cinco câmaras de amostra, isto é, cada *slide* pode ser usado para analisar 5 amostras diferentes, como se pode observar na Figura 6. O utilizador tem de pipetar amostras de 20  $\mu\text{L}$  nas câmaras antes de inserir a lâmina no instrumento *Countstar* para ser medido. A lâmina é de uso único, de modo que cada câmara de

amostra possa ser usada apenas para uma amostra. O *Slide Countstar* opera com os tradicionais corantes azul de metileno e violeta de metileno (Aber Trusted Technology, 2015).



**Figura 6** – Imagem de *slide Countstar*.

### *Software Countstar*

O *software Countstar* funciona em computadores com o *Windows 7* e fornece uma interface fácil de usar. O software contém algoritmos complexos que analisam as imagens do microscópio *Countstar* e produzem resultados quantitativos, como contagem total de células, viabilidade e tamanho da célula. O software possui opções para guardar, exportar ou imprimir os dados gravados pelo instrumento. A imagem das células pode ser visualizada no ecrã do computador e armazenada no formato JPEG, como se pode ver na Figura 7 (Aber Trusted Technology, 2015).

O *software* já tem instaladas algumas configurações padrão a serem usadas para efetuar as análises a várias estirpes de leveduras. No entanto, de modo a obter contagens precisas de leveduras, é necessário otimizar os parâmetros consoante o tipo de levedura que se pretende analisar, visto que diferentes estirpes possuem diferentes características e comportamentos. Para se conseguir otimizar as leituras, consoante o tipo de levedura, existe no *software* uma janela chamada “Yeast Type”, no qual se modificam alguns parâmetros, tais como, “Min\_Size”, “Max\_Size”, “Grey\_Contrast”, “Alive\_Dead\_param”, “Big Yeast” e “Overlap mode”.

Os parâmetros “Min\_Size” e “Max-Size” podem variar entre 0 e 200, e determinam o tamanho mínimo e máximo do diâmetro da levedura que será incluído na contagem, respetivamente. Estes parâmetros são extremamente úteis para permitir que o *Countstar* consiga distinguir os resíduos das células. São ainda essenciais para que o equipamento contabilize o tamanho de células que se pretende considerar (Aber Trusted Technology, 2015).

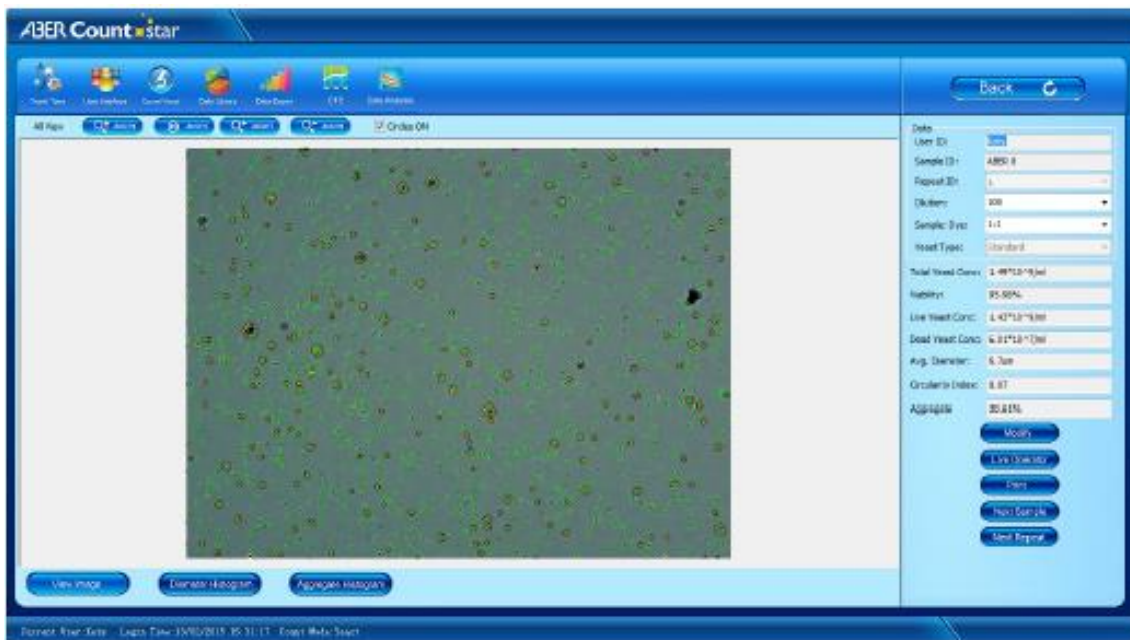


Figura 7 – Imagem do *software Countstar*.

Quanto ao parâmetro “Grey\_Contrast”, pode variar entre 0 e 30, e indica a percentagem de contraste em relação aos objetos de segundo plano que necessitam para serem incluídos na contagem. Quanto maior o valor deste parâmetro, significa que os objetos mais escuros são incluídos na contagem. A redução deste valor para um valor padrão de 7 permite que partículas de cor cinza mais claro (mais semelhantes à cor das células) sejam contadas. O valor padrão é 7, pois funciona bem para amostras pouco turvas. Contudo, pode ser benéfico alterar isso caso haja muito lixo presente nas amostras. Como a cor do *trub* tende a ser mais clara do que a das células de levedura, é recomendável aumentar o valor do parâmetro para impedir a inclusão do *trub* na contagem de células (Aber Trusted Technology, 2015).

O Parâmetro “Alive\_Dead” determina a probabilidade de uma célula de levedura ser considerada como viva ou morta e varia entre 0 e 10, sendo recomendável que esteja entre 0,1 e 1,2. Se o valor for alto, algumas células da levedura tendem a ser contadas como mortas e a percentagem de viabilidade diminuirá e vice-versa. É necessário otimizar este parâmetro porque algumas células viáveis de levedura podem não ser detetadas pelo *Aber* como vivas devido à presença de uma cor mais escura no seu centro (*Dark Centre*), pelo que podem ter um risco maior de serem diagnosticadas como células mortas (Aber Trusted Technology, 2015).

O modo “Big Yeast” pode ser selecionado quando a levedura a analisar tem um tamanho grande

ou tem a forma característica de bacilo. Se este modo for selecionado, o *countstar* irá contar estas células de levedura como uma única célula, em vez de contar como duas ou mais leveduras agregadas (Aber Trusted Technology, 2015).

Por fim, o modo “overlap” é apenas selecionado quando a levedura a analisar possui elevados níveis de agregação. Ao selecionar este modo, permite uma simulação diferente para células agregadas que, de outra forma, não seriam incluídas na contagem (Aber Trusted Technology, 2015).

No caso de existirem células de leveduras em *budding* (gemulação), o *Aber Counstar* não as deteta, pelo que é necessário ajustar alguns parâmetros mencionados. O parâmetro “min\_size” pode ser alterado para incluir células em *budding* de um determinado tamanho e excluir células em *budding* abaixo desse tamanho especificado, para não confundir com células agregadas (Aber Trusted Technology, 2015).

## II – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo faz-se referência aos métodos utilizados para levar a cabo o trabalho idealizado. De forma a determinar se o novo equipamento automatizado, o *Aber Counstar Yeast*, é um equipamento confiável e preciso, para realizar contagens de células e avaliar a viabilidade celular, foi necessário executar vários ensaios. Foi estabelecido um plano experimental, onde são referidos os materiais e procedimentos utilizados para a determinação da concentração celular da levedura, bem como a determinação da viabilidade celular. Engloba também, a descrição da metodologia usada para o estudo da capacidade analítica do *Aber*, da validação da sua resposta analítica para diferentes leveduras e em diferentes fases do processo fermentativo. É ainda descrito o ensaio da otimização do novo equipamento para a medição de amostras de suspensão de levedura em diferentes tipos de cerveja. Por fim, é feita referência ao tipo de análise estatística efetuada aos resultados obtidos ao longo de todo o trabalho.

É ainda necessário relembrar que todo o equipamento *Countstar* usado para os testes foi obtido na Aber Instruments Ltd (Aberystwyth, Reino Unido).

6. Determinação da concentração celular de levedura	55
7. Determinação da viabilidade celular de levedura	58
8. Capacidade analítica do <i>Aber</i>	59
9. Validação da resposta analítica do <i>Aber</i> para diferentes leveduras	60
10. Validação analítica do <i>Aber</i> em diferentes fases do processo fermentativo	60
11. Otimização do <i>Aber</i> para medição de levedura em diferentes tipos de cerveja	61
12. Análise estatística	62

## 6. Determinação da concentração celular de levedura

A determinação da concentração celular foi executada em três equipamentos diferentes, no *Aber Countstar*, no *Beckman Coulter* e no microscópio ótico.

As amostras em análise foram retiradas periodicamente do tanque de propagação e do tanque de fermentação, numa quantidade suficiente (cerca de 100 mL) para determinar a concentração celular da levedura. Na impossibilidade de as analisar dentro de um intervalo de tempo de 1 h, conservaram-se 100 mL de cada amostra adicionando 5 mL de uma solução de sulfato de cobre pentahidratado a 30,5 g/L (Merck), por um tempo máximo de 48 h. O sulfato de cobre funciona como inibidor do crescimento da levedura. Foram adicionadas, a todas as amostras, três a quatro gotas de uma solução de ácido sulfúrico 2 mol/L (Merck) para promover a desfloculação da levedura (White and Zainasheff, 2010).

No caso do tanque de armazenamento (tanque de *stockagem*), de forma a analisar o estado da levedura para propagações futuras, foi retirada uma quantidade suficiente (cerca de 100 mL) para avaliar o mais rápido possível a sua concentração celular, neste caso não se adicionou sulfato de cobre nem ácido sulfúrico. Para promover a desfloculação as soluções foram submetidas a vórtice. Para a realização das diluições e para a colocação das amostras nas lâminas, foram utilizadas pipetas de 5 mL, 1 mL e 20  $\mu$ L (Eppendorf Research, PhysioCare Concept, EUA).

### 6.1. Método eletrónico – *BECKMAN COULTER® Z2*

No caso das amostras retiradas do tanque de propagação e do tanque de fermentação (leveduras presentes no mosto), o volume recolhido foi diluído por um fator de 500 com uma solução eletrolítica ISOTON® II (BECKMAN COULTER), num balão volumétrico de 200 mL.

No caso das amostras do tanque de *stockagem*, pesou-se 1 g de amostra para um balão volumétrico de 100 mL, perfez-se o restante volume com água destilada, e homogeneizou-se muito bem a suspensão. De seguida, retiraram-se 5 mL desta solução homogeneizada para um balão volumétrico de 50 mL e diluiu-se com água destilada. Por fim, colocaram-se 4 mL da última solução diluída num balão de 200 mL, e completou-se o restante volume com ISOTON® II, atingindo um fator de diluição no final de 50 000.

As amostras foram analisadas pelo contador eletrónico *BECKMAN COULTER® Z2* e o intervalo de contagem foi definido para diâmetros de partículas entre os 2,7  $\mu$ m e os 8  $\mu$ m (previamente

otimizado pela empresa). Para cada amostra fizeram-se 10 medições (10 réplicas). No entanto, para amostras muito turvas e com elevado número de partículas, ocorria um bloqueio constante da abertura do contador impedindo novas medições, sendo necessário recorrer ao microscópio.

A determinação da concentração celular ( $C$ ), nas amostras retiradas durante a fase de propagação e de fermentação, foi feita conforme a Equação 4, na qual o valor do número de células fornecido pelo equipamento ( $X$ ) foi dividido por 1000 (fator intrínseco ao *Coulter*).

$$\frac{C}{\text{mL}^{-1}} = \frac{X}{1000} \times 10^6 \quad (\text{Equação 4})$$

No caso das amostras retiradas do tanque de *stockagem*, a concentração celular de levedura em função da massa de suspensão ( $C$ ), foi determinada segundo a Equação 5. Foi necessário ter em consideração a massa de levedura utilizada ( $m$ ) e ainda o fator intrínseco ao equipamento (10).

$$\frac{C}{\text{g}^{-1}} = \left( \frac{X}{\frac{m}{\text{g}}} \right) \times \frac{1}{10} \times 10^6 \quad (\text{Equação 5})$$

## 6.2. Método microscópico

A preparação da amostra é crítica para uma contagem precisa no microscópio ótico. Portanto, as amostras foram diluídas com água destilada até que o número de células por área de contagem se situasse entre 100 e 300. O fator de diluição necessário para a obtenção de resultados satisfatórios depende da natureza da amostra. Ou seja, amostras em que se esperam reduzidas concentrações de células (por exemplo, na fase inicial da propagação) requerem poucas diluições (fator de diluição de 2, 5 e 10). Amostras em que se espera uma concentração elevada (por exemplo, na cerveja em fermentação e em fases finais da propagação ou no caso das amostras de *stockagem*) requerem fatores de diluição superiores (50, 100 e 500).

Após a colocação da amostra na câmara de *Neubauer* (BLAUBRAND), foi observada no microscópio ótico Eclipse E600 (Nikon) com a ampliação de 400×. Para eliminar as contagens de células repetidas, uma técnica padrão foi seguida, apresentada no Anexo A.1.

Neste caso, a determinação da concentração celular de levedura ( $C$ ), nas amostras retiradas durante a fase de propagação e de fermentação, foi realizada de acordo com a Equação 6, na qual



o número de células ( $X$ ) foi multiplicado pelo respetivo fator de diluição ( $D$ ) e dividido pelo volume da câmara de *Neubauer* [ $V = ((0,25 \times 10^{-3}) \times 16 \times 25) \times 10^{-3} \text{ mL} = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ ].

$$\frac{C}{\text{mL}^{-1}} = \frac{X \times D}{\frac{V}{\text{mL}}} \quad (\text{Equação 6})$$

No caso das amostras retiradas do tanque de *stockagem*, a que se usou para determinar a viabilidade foi a mesma que se usou para a contagem de células, para diminuir assim os erros associados à diluição, sendo o número total de células contadas a soma do número de células vivas e mortas. Neste caso, retiraram-se 0,5 mL da amostra previamente diluída para um tubo de ensaio, e diluiu-se a amostra para metade (fator de diluição 2) com a adição de 0,5 mL de uma solução de azul de metileno (Anexo A.2). Neste caso, antes da leitura no microscópio, esperou-se 2 min a 3 min de forma a que o corante interagisse com todas as células. A concentração celular de levedura ( $C$ ) foi determinada segundo a Equação 7, na qual a concentração celular é calculada em função da massa. O número de células contadas ( $X$ ) foi multiplicado pelo fator de diluição ( $D$ ) e, dividido pelo volume da câmara de *Neubauer* ( $V = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$ ). Por fim, foi dividido pela massa de suspensão de levedura utilizada ( $m$ ), para ter a concentração celular expressa em função da massa.

$$\frac{C}{\text{g}^{-1}} = \left( \frac{X \times D}{\frac{V}{\text{mL}} \times \frac{m}{\text{g}}} \right) \quad (\text{Equação 7})$$

### 6.3. Método automatizado – *Aber Countstar Yeast*

A contagem de leveduras no *ABER Countstar* (ABER Instruments) exigiu uma preparação mínima da amostra. As amostras foram diluídas com água destilada, até que a concentração celular final estivesse dentro da gama de leitura, isto é, entre  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  e  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ , e depois submetidas a agitação com vórtice. Esta concentração celular foi controlada pelo microscópio ótico, visto ser o método mais preciso até ao momento. Usaram-se, quase sempre, diluições com fatores de diluição de 2, 10, 50, 100 e 500, dependendo das amostras a analisar, em tubos de ensaio. Antes de introduzir na lâmina, as amostras foram homogeneizadas num vórtice.

No caso das amostras de propagação e de fermentação, não se adicionou o azul de metileno visto que o objetivo não era avaliar a viabilidade, mas no caso das amostras de *stockagem*,

adicionaram-se 0,5 mL de azul de metileno a 0,5 mL de uma amostra diluída.

Após as diluições, 20  $\mu$ L de cada amostra foram introduzidos numa lâmina descartável contendo cinco câmaras, que devem ser mantidas limpas para não interferir na medição do sistema ótico. O slide foi inserido no sistema, de acordo com as instruções do fabricante, e respeitou-se o tempo de repouso de cerca de 3 min. O tempo de descanso não deve ser superior a 10 min para evitar a evaporação da amostra dentro do sistema. A posição do slide foi ajustada para colocar a câmara de interesse no ângulo da câmara. Finalmente, o fator de diluição da amostra foi introduzido no sistema e o perfil de contagem apropriado foi selecionado, bem como os parâmetros associados a cada tipo de levedura. Dez repetições de contagem de células foram realizadas, para cada amostra.

## 7. Determinação da viabilidade celular de levedura

A viabilidade é a percentagem de células vivas numa amostra, e foi apenas analisada para leveduras presentes no tanque de *stockagem*, visto que é necessário analisar o estado da levedura para utilizar em propagações futuras, e conseqüentemente em fermentações futuras. A amostra que se usou para determinar a viabilidade foi a mesma que se usou para a contagem de células, para diminuir assim os erros associados à diluição. Neste caso, o número total de células contadas é a soma do número de células vivas e mortas.

### 7.1. Método microscópico

A preparação da amostra foi igual à da determinação da concentração celular, explicada no subcapítulo 6.2. Após a espera de 3 min, e a colocação da amostra na câmara de *Neubauer* (BLAUBRAND), foi observada a presença de células coradas e não coradas no microscópio ótico Eclipse E600 (Nikon), com a ampliação de 400 $\times$ . As células coradas representam as células mortas visto que o corante fica retido nas células sem capacidade de reprodução, enquanto que as células com atividade metabólica e com capacidade de reprodução permanecem incolores.

A determinação da viabilidade ( $V_{cel}$ ), em percentagem, foi determinada segundo a Equação 8, na qual o número de células vivas ( $X_{vivas}$ ) foi dividido pelo número de células totais (soma de células vivas ( $X_{vivas}$ ) e mortas ( $X_{mortas}$ ) e multiplicado por 100.

$$\frac{V_{\text{cel}}}{\%} = \frac{X_{\text{vivas}}}{X_{\text{vivas}} + X_{\text{mortas}}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

### 7.2. Método automatizado – *Aber Countstar Yeast*

A amostra usada para determinar a viabilidade e a concentração celular pelo método microscópico foi a mesma que se usou para o método automatizado de forma a diminuir assim os erros associados à diluição. A amostra, devidamente preparada, foi colocada no *Aber* pelo mesmo procedimento explicado no subcapítulo 6.3. Após selecionados os melhores parâmetros, bem como o fator de diluição, cada amostra foi analisada, sendo os resultados fornecidos pelo *Aber*: concentração celular (total, viva e morta), percentagem de viabilidade, diâmetro médio das células e grau de agregação.

## 8. Capacidade analítica do *Aber*

A levedura C retirada do tanque de *stockagem* foi usada nas experiências iniciais para determinar a capacidade analítica do *Aber Countstar*, em termos de concentração celular e de viabilidade, usando a configuração padrão (Standard) presente no seu software.

### 8.1. Repetibilidade de leitura no *Aber* e no microscópio

Misturaram-se 500 µL de uma suspensão de levedura previamente diluída (fator de 1000) com 500 µL de uma solução de azul de metileno (Anexo A.2). De seguida, leu-se a viabilidade celular e a concentração celular tanto no *Aber* ( $n = 30$ ), como no microscópio ótico ( $n = 30$ ), sendo  $n$  o número de réplicas. No *Aber* colocaram-se 5 amostras a analisar no mesmo *slide*.

### 8.2. Intercomparação com outros equipamentos – *Aber*, *Coulter* e microscópio ótico

A determinação da concentração celular foi executada em três equipamentos diferentes, no *Aber Countstar*, no *Beckman Coulter* e no microscópio ótico, de acordo com o procedimento 6. Preparou-se uma suspensão de levedura C diluída 1000 vezes, e efetuaram-se 10 réplicas de leitura, usando a mesma amostra, nos três equipamentos.

### 8.3. Validação do equipamento em diferentes gamas de concentração

Diluiu-se a levedura C de *stockagem* em várias proporções, e à medida que se aumentou a diluição analisou-se tanto no *Aber* como no microscópio ótico, a concentração total de células de cada amostra diluída ( $n = 10$ ), bem como a viabilidade celular de acordo com o procedimento explicado em 6.2 e 6.3. Para isso, 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra diluída foram misturados com 500  $\mu\text{L}$  da solução de azul de metileno. A concentração celular e a viabilidade celular foram lidas no microscópio e no *Aber* usando 4 parametrizações diferentes, ST, US3, US4 e US5, para diferentes fatores de diluição (200, 500, 1000 e 2000).

### 8.4. Resposta analítica da perda da viabilidade recorrendo a ensaio térmico

Neste caso preparou-se uma suspensão de levedura a 10 g/L num balão volumétrico, e colocou-se em banho-maria a 70 °C de forma a diminuir gradualmente a viabilidade. Retirou-se 1 mL de amostra para um tubo de ensaio, de 2 min em 2 min, até a viabilidade ser nula. Depois diluiu-se com 9 mL de água destilada de forma a obter um fator de diluição de 1000. Retiraram-se 500  $\mu\text{L}$  desta solução diluída para um tubo de ensaio e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de azul de metileno, e analisou-se no microscópio ótico e no *Aber* a viabilidade celular de cada amostra ( $n = 3$ ).

## 9. Validação da resposta analítica do *Aber* para diferentes tipos de leveduras

Para testar a capacidade do *Aber* em medir diferentes estirpes de leveduras, foram retiradas amostras da fase da propagação e de fermentação, para cada estirpe de levedura usada na empresa (A, B, C, D, E). Cada estirpe de levedura foi analisada, quanto à concentração celular, no *Aber* ( $n = 5$ ) usando a configuração padrão, no microscópio ótico ( $n = 5$ ) e no *Coulter* ( $n = 5$ ) para fins de comparação. Deve-se notar que cada amostra medida, usando os dois métodos (*Aber* e microscópio), foi processada a partir da mesma diluição, para garantir consistência entre as técnicas de medição.

## 10. Validação analítica do *Aber* em diferentes fases do processo fermentativo

Para testar a capacidade do *Aber* para contar diferentes estirpes de leveduras em condições fisiológicas diferentes foram retiradas amostras da fase da propagação, da fermentação e da

*stockagem*. Na fase de propagação analisaram-se apenas as estirpes de levedura A, B, C e D. Na fase de fermentação, para além das estirpes analisadas na fase de propagação, também se analisou a levedura E. No caso da *stockagem*, apenas as estirpes C e D. Para cada estirpe de levedura, a concentração celular foi analisada da mesma forma mencionada no subcapítulo 9.

Quanto à viabilidade, analisaram-se apenas as leveduras de *stockagem* C e D, pois a empresa só analisa nestas duas amostras. Para isso colocaram-se 500 µL de amostra previamente diluída e 500 µL de solução de azul de metileno num tubo de ensaio, para se proceder à análise no microscópio ótico ( $n = 5$ ) e no *Aber* ( $n = 5$ ) usando a configuração padrão.

Fez-se também um acompanhamento de fermentação da levedura do tipo C, no qual se analisou a sua concentração celular ao longo do tempo de fermentação, bem como o extrato aparente e o teor alcoólico de cada amostragem para se efetuar um acompanhamento da fermentação. O extrato aparente e o teor alcoólico foram analisados no equipamento *Anton Paar*.

## 11. Otimização do *Aber* para medição da levedura em diferentes tipos de amostras

O *software Countstar* já tem instalado a configuração padrão que foi usada nas análises das amostras dos ensaios dos capítulos 8, 9, 10 e 11. No entanto, foi necessário otimizar os parâmetros (“Min\_Size”, “Max\_Size”, “Grey\_Contrast”, “Alive\_Dead\_param”, “Big Yeast” e “Overlap mode”) consoante o tipo de amostra que se pretende analisar, visto que diferentes produtos possuem características, que dependendo do tipo de levedura e do tipo de mosto fermentado.

Analisaram-se vários tipos de cerveja produzidas por diferentes tipos de leveduras, e diferentes tipos de mosto. Analisaram-se as cervejas F, G, C, C sem álcool, H e I, todas elas fermentadas com o mesmo tipo de levedura, C, variando apenas o tipo de mosto a analisar. Analisaram-se também as cervejas A, B e C, a sidra E e, as *stockagem* C e D, estas com diferentes tipos de levedura.

Foram colocadas no *Aber* as amostras previamente diluídas na gama recomendada, pelo mesmo procedimento explicado no subcapítulo 6.3. Antes de se proceder à sua análise, escolheram-se alguns parâmetros de forma a executar testes de tentativa-erro, para, após várias leituras, escolher o valor que mais se aproxima do método atualmente utilizado pela empresa, o *Coulter*. Neste

ensaio, apenas se comparou a concentração celular e a viabilidade celular, pois são as variáveis que têm uma importância mais relevante na qualidade e na produção da cerveja.

Na Tabela 1, apresentam-se as parametrizações testadas no *Aber CountStar* para cada padrão.

**Tabela 1** – Diferentes parametrizações testadas no *Aber CountStar*

Parâmetro Padrões	Min_Size	Max_Size	Alive-Dead	Grey_Contrast	Overlap
Standard	5	15	0,5	7	Não
US	5	10	0,5	7	Não
US3	5	13	0,5	7	Não
US4	3	13	0,5	7	Não
IPA 1/Weiss 1	5	10	1	2	Sim
IPA 2/Weiss 2	5	10	1	7	Sim
IPA 3/Weiss 3	5	10	1	0	Sim
IPA 4/Weiss 4	5	10	1	10	Sim
IPA 5/Weiss 5	5	10	1	20	Sim
US5	2	15	1	7	Não
Coulter 1	2,7	8	0,5	7	Não
Coulter 3	2,7	8	0,2	7	Não
Coulter 4	2,7	8	0,1	7	Não
Coulter 5	2,7	8	0,1	10	Não

## 12. Análise estatística

A relação entre os dois equipamentos foi analisada por análise de regressão através da ferramenta “*Regression*” do “*Analysis ToolPak*” do *Microsoft Excel 2020*.

O erro associado à média das repetições ( $E$ ) foi determinado pelo teste *t-student* bi-caudal com um intervalo de confiança de 95 %.

Para determinar se duas ou mais médias experimentais são significativamente diferentes com 95 % de confiança recorreu-se à análise de variância (ANOVA a um fator). Os valores com

$p_{\text{value}} < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes. Nos casos em que isto aconteceu, foram realizados testes post-hoc (teste *Turkey HSD*) com nível de significância 0,05, recorrendo ao software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22.0 (IBM SPSS Statistics 22.0, Chicago, Estados Unidos da América).

Para quantificar a concordância entre métodos quantitativos foi usado o gráfico de *Bland Altman*. Este método quantifica a concordância entre duas medidas quantitativas pelo cálculo dos limites de concordância. Estes limites estatísticos são calculados através da média e do desvio padrão das diferenças entre duas medidas. O gráfico de *Bland Altman* é representado no eixo do YY pelas diferenças entre duas médias, e no eixo do XX pela média das medições (Giavarina, 2015; Stralen *et al.*, 2008).

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas. Para isso foi calculado o coeficiente de variação da repetibilidade, *CV* (Miller & Miller, 2010).

A presença de valores discrepantes (*outliers*) foi avaliada aplicando o teste de *Dixon* (teste Q) que compara o desvio do valor suspeito relativamente à média obtida para um conjunto de resultados (Miller & Miller, 2010).

### III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

De forma a cumprir o objetivo raiz deste trabalho, foi necessário realizar todas as etapas de validação do equipamento, para ser possível a introdução, na empresa, de um novo equipamento de contagem de células e de viabilidade celular. Foi necessário recolher várias amostras ao longo de todo o processo de propagação da levedura, e de fermentação de vários tipos de cerveja, e efetuar a contagem celular e a viabilidade celular pelo método tradicional (microscópio ótico) e pelo *Coulter*, e também através do novo equipamento a ser implementado (*Aber*).

Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos com a execução do trabalho e a discussão pormenorizada dos mesmos. Por questões de organização, está dividido em quatro subcapítulos. O primeiro corresponde ao estudo da capacidade analítica do *Aber*, em comparação com microscópio, onde é avaliada a repetibilidade, é feita uma comparação entre o *Aber*, o *Coulter* e o microscópio ótico, apresentam-se os testes de leitura no *Aber* com diferentes gamas de concentração, e, por fim, demonstra-se a resposta analítica da perda da viabilidade com recurso a ensaio térmico. O segundo e terceiro subcapítulos dizem respeito aos ensaios efetuados da validação do *Aber* para diferentes leveduras e em diferentes fases do processo fermentativo, respetivamente. O quarto descreve a otimização efetuada no novo equipamento para a medição da levedura em diferentes tipos de cerveja.

13. Capacidade analítica do <i>Aber</i>	65
14. Validação da resposta analítica do <i>Aber</i> para diferentes leveduras	75
15. Validação analítica do <i>Aber</i> em diferentes fases do processo fermentativo	82
16. Otimização do <i>Aber</i> para medição da levedura em diferentes tipos de cerveja	90

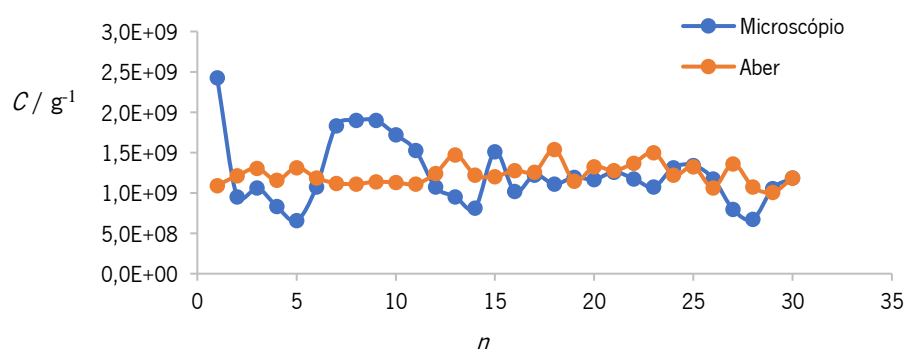


### 13. Capacidade analítica do *Aber*

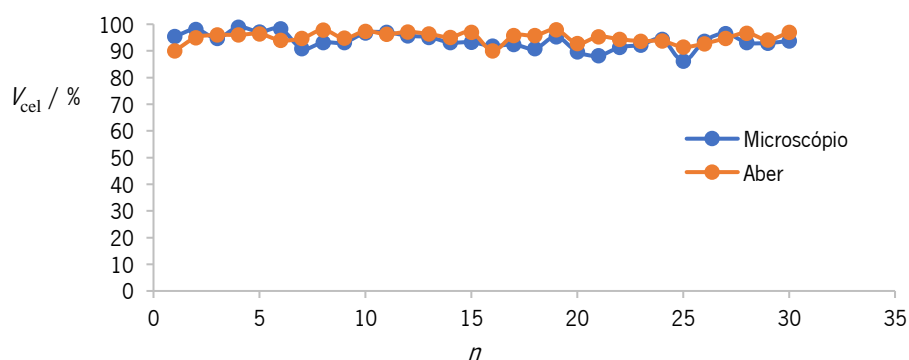
Para o estudo da repetibilidade e precisão do *Aber* foi utilizada a levedura C do tanque de *stockagem*, e usou-se a configuração padrão presente no seu *software*. Esta levedura foi utilizada, em todos os ensaios apresentados abaixo, por ser facilmente acessível e suficiente para os requisitos de teste da funcionalidade do *Countstar*.

#### 13.1. Repetibilidade das leituras no *Aber* e no microscópio ótico

Analisou-se a repetibilidade das leituras em dois equipamentos, no microscópio ótico e no *Aber*. Na Figura 8, está apresentado o gráfico da variação da concentração celular nas 30 repetições efetuadas e em ambos os equipamentos. Deve-se notar que para garantir consistência entre as técnicas de medição, foi sempre usada a mesma amostra. Também para a viabilidade celular procedeu-se a uma análise semelhante, representada na Figura 9.



**Figura 8** – Gráfico da variação da concentração celular ( $C$ ) das 30 repetições ( $n$ ) efetuadas para a mesma amostra diluída, e em ambos os equipamentos (*Aber* e microscópio).



**Figura 9** – Gráfico da variação da Viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) das 30 repetições ( $n$ ) efetuadas para a mesma amostra diluída, e em ambos os equipamentos (*Aber* e microscópio).

Pela observação da Figura 8, verificou-se que a leitura no *Aber*, para a mesma amostra, foi constante em comparação com a leitura no microscópio, sofrendo oscilações de leitura no caso do microscópio. Relativamente à viabilidade celular, verificou-se que as leituras em ambos os equipamentos foram muito constantes, não havendo grande variabilidade, visto que seguiram a mesma tendência nas 30 repetições, como é observável na Figura 9.

Na Tabela 2, é apresentada a média das 30 repetições nos dois equipamentos, bem como o erro associado e o coeficiente de variação, tanto para a concentração celular como para a viabilidade celular.

**Tabela 2** – Média das repetições efetuadas no *Aber* e no microscópio ( $n=30$ ) em termos de concentração celular média ( $\bar{C}$ ) e de viabilidade celular média ( $\bar{V}_{cel}$ ), bem como o seu erro associado, com 95 % de confiança, ( $E$ ), e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV$ )

	Concentração celular			Viabilidade celular		
	$\bar{C} / g^{-1}$	$E / g^{-1}$	$CV / \%$	$\bar{V}_{cel} / \%$	$E / \%$	$CV / \%$
<i>Aber</i>	$1,23 \times 10^9$	$4,87 \times 10^7$	10,58	95,02	0,77	3,15
Microscópio	$1,23 \times 10^9$	$1,49 \times 10^8$	32,37	93,78	1,10	2,17

Pelo que se pode observar na Tabela 2, para a média das 30 repetições, tanto para a concentração celular como para a viabilidade celular, foi igual em ambos os equipamentos, não existindo diferenças significativas ( $p_{value} > 0,05$ ). No entanto, o erro associado à média das leituras no microscópio foi maior do que o erro associado à média no *Aber*, em ambos os casos.

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas, ou seja, ensaios realizados sobre uma mesma amostra, no mesmo laboratório, com o mesmo analista, equipamento e tipo de reagentes e em curtos intervalos de tempo. Para isso determinou-se o coeficiente de repetibilidade ( $CV$ ) para cada equipamento. Este foi mais elevado no microscópio, no caso da concentração celular, encontrando-se fora dos limites aceitáveis de repetibilidade (limite de aceitação – na empresa:  $\leq 10 \%$ ). Já em relação à viabilidade celular, este apresentou-se dentro dos limites de aceitação.

Este ensaio demonstrou que as medições no *Aber* são comparáveis às contagens manuais, mas também são mais repetíveis e consistentes em relação às realizadas no microscópio.

### 13.2. Intercomparação de equipamentos – *Aber*, *Coulter* e microscópio

Este ensaio foi realizado com o intuito de comparar o *Aber*, não só com o microscópio, mas também com o equipamento que atualmente a empresa utiliza para a contagem de células, o *Coulter*. Na Tabela 3, estão apresentados os valores da concentração celular de uma amostra de *stockagem C* obtidos nos 3 equipamentos, tal como o erro associado à média das 10 repetições para cada equipamento, e o coeficiente de variação de repetibilidade.

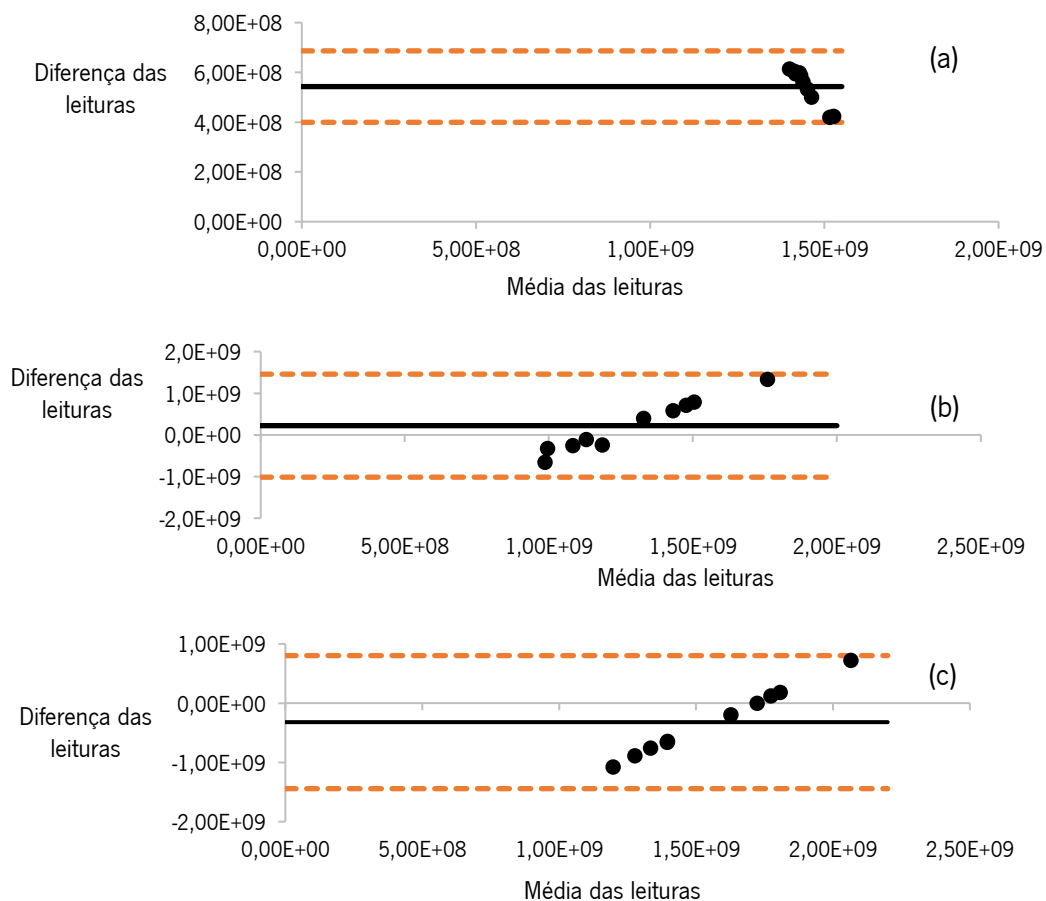
**Tabela 3** – Média da concentração celular dos 3 equipamentos, tal como o seu erro associado ( $E$ ) e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV$ )

Equipamento	$\bar{C} / g^{-1}$	$E / g^{-1}$	$CV / \%$
<i>Aber</i>	$1,18 \times 10^9$	$5,62 \times 10^7$	6,68
<i>Coulter</i>	$1,72 \times 10^9$	$6,31 \times 10^6$	0,51
Microscópio	$1,40 \times 10^9$	$4,06 \times 10^8$	40,57

Pela observação da Tabela 3, constata-se que existem diferenças entre as médias da concentração celular dos 3 equipamentos para a mesma amostra de *stockagem C*, e após análise de variância (ANOVA a um fator) confirmou-se a existência de diferenças significativas entre as três médias ( $p_{value} = 0,004$ ). O teste *Post-hoc* (teste *Turkey*) permitiu verificar que apenas existem diferenças significativas entre o *Aber* e o *Coulter*.

Em relação ao valor do erro associado à média, no microscópio, foi 64 vezes maior do que o do *Coulter*, e 8 vezes maior do que o do *Aber*, denotando-se assim uma variabilidade maior no microscópio, tal como se verificou no ensaio apresentado no subcapítulo 13.1. O mesmo se conclui pelo coeficiente de variação de repetibilidade, estando o valor do microscópio fora do limite de aceitação definido pela empresa. No entanto, o *Aber* e o *Coulter* podem-se considerar repetíveis e consistentes, visto que o coeficiente de variação de repetibilidade se encontra dentro do limite de aceitação (< 10 %).

Para avaliar o grau de concordância, a abordagem estatística correta não é óbvia. Muitos estudos utilizam como um indicador de concordância, o coeficiente de correlação de Pearson ( $r^2$ ) dos resultados de dois métodos de medição. No entanto, a correlação estuda a relação entre duas variáveis, não as diferenças, e não é recomendada como um método para avaliar a comparabilidade entre métodos, visto que uma correlação alta não implica automaticamente que haja uma boa concordância entre os dois métodos. Assim, para quantificar a concordância entre métodos quantitativos foi usado o gráfico de *Bland Altman* (Giavarina, 2015; Stralen *et al.*, 2008). Na Figura 10, estão apresentados os gráficos de *Bland Altman* entre o *Aber* e o *Coulter* (Figura 10a), entre o *Aber* e o microscópio (Figura 10b), e entre o microscópio e o *Coulter* (Figura 10c).



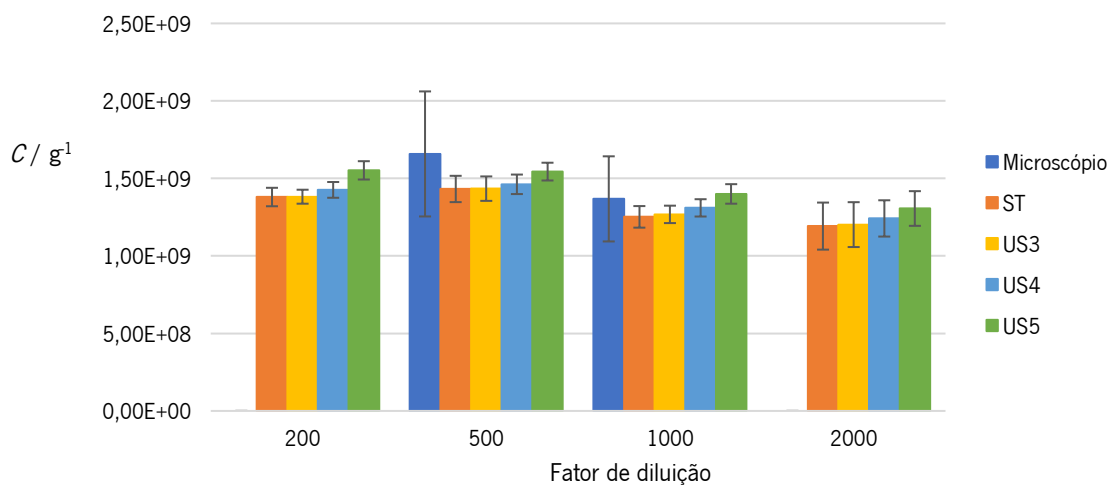
**Figura 10** – Gráfico das diferenças das leituras da concentração celular ( $C$ ) em função da média das leituras, entre o *Aber* e o *Coulter* (a), entre o *Aber* e o microscópio (b), e entre o *Coulter* e o microscópio (c).

O método *Bland Altman* calcula a diferença média entre dois métodos de medição e os intervalos de concordância para 95 % de confiança. Espera-se que estes limites incluam 95 % dos resultados

das diferenças entre os dois métodos de medição. A comparação entre o *Aber* e o microscópio e entre o *Coulter* e o microscópio apresentaram melhor concordância, pois o intervalo entre os limites de concordância foi menor em comparação com o *Aber* e o *Coulter*. Para além disto, verificou-se que a média das diferenças entre os dois equipamentos (*Aber* e microscópio, e *Coulter* e microscópio) foi inferior à média das diferenças entre o *Aber* e o *Coulter*. O parâmetro “Standard” no *Aber* pode ter influenciado nestas diferenças de leitura em relação ao *Coulter*, tendo sido feita a otimização de leitura *a posteriori*, com outros parâmetros.

### 13.3. Validação do equipamento em diferentes gamas de concentração

A análise de repetibilidade com testes de diluição foi feita apenas no *Aber* e no microscópio porque no *Coulter* o fator de diluição foi sempre o mesmo (50 000). Usando uma amostra de *stockagem C* fizeram-se sucessivas diluições, tendo por base a diluição de 100× preparada previamente para o *Coulter*, e a partir desta procedeu-se às diluições seguintes: 200, 500, 1 000 e 2 000. Na Figura 11, é apresentada a concentração celular lida no microscópio e no *Aber* usando 4 parametrizações diferentes (ST, US3, US4 e US5) em função dos fatores de diluição.



**Figura 11** – Concentração celular ( $C$ ) lida no microscópio e no *Aber* usando 4 parametrizações diferentes (ST, US3, US4 e US5) em função dos fatores de diluição (200, 500, 1000 e 2000). As barras apresentam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ )

A amostra utilizada neste ensaio foi também lida no *Coulter* tendo-se obtido um valor de  $(1,53 \times 10^9 \pm 8,05 \times 10^6) \text{ g}^{-1}$ . Comparando com os valores apresentados na Figura 11, verificou-se um desvio de, aproximadamente, 6,5 % entre o *Coulter* e o *Aber* com a parametrização

“Standard – ST” para um fator de diluição de 200. No caso do fator de diluição 500, existiu um desvio de 8,5 % entre o *Coulter* e o microscópio, e um desvio de 3 % entre o *Coulter* e o *Aber* com a parametrização “Standard”. Para os fatores de diluição de 1 000 e 2 000 apresentaram-se desvios na ordem dos 18 % a 20 %, respetivamente, entre o *Aber* e o *Coulter*.

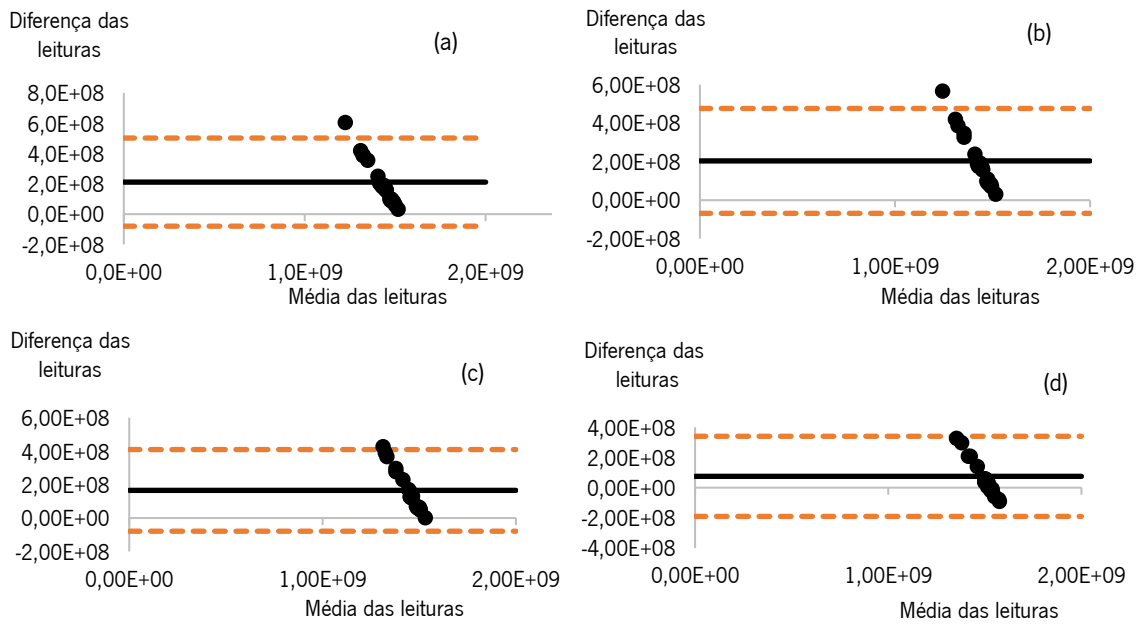
No microscópio, apenas foi possível determinar a concentração celular para os fatores de diluição 500 e 1 000, pois eram os únicos que se encontravam dentro da gama de leitura apropriada (entre 100 e 300 células por área de contagem).

A análise ANOVA, a um fator, entre fatores de diluição diferentes e para cada parametrização, permitiu verificar que existem diferenças significativas de leitura. Contudo, todas as suspensões encontravam-se dentro da gama de leitura do *Aber* ( $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  a  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ). Estas diferenças foram detetadas para o fator de diluição de 2 000 em comparação com os restantes fatores de diluição. Isto pode dever-se ao facto de as amostras muito concentradas serem difíceis de se contar, e das amostras diluídas poderem fornecer contagens erradas, principalmente quando são efetuadas por operadores, e não de forma automatizada.

Em relação ao erro associado à média das 10 repetições para cada parâmetro, verificou-se que no *Aber* existe menos variabilidade em comparação com os valores do microscópio, podendo ser esta a causa da discrepância existente entre os dois equipamentos.

Para cada fator de diluição foi feita a leitura da concentração celular no *Aber* utilizando 4 parâmetros diferentes, ST, US3, US4 e US5, variando entre os três primeiros a especificação do diâmetro, e no US5 foi alterada a especificação do diâmetro, bem como do *Alive\_Dead*. Nos parâmetros ST, US3 e US4 não existiram diferenças significativas de leitura em todos os fatores de diluição, segundo a análise ANOVA efetuada. Já o parâmetro US5 foi o que apresentou diferenças significativas em relação aos restantes parâmetros testados no *Aber*, no entanto, foi o que se aproximou mais do valor do *Coulter* visto que a especificação do diâmetro mínimo deste é igual ao predefinido para o *Coulter* (2,7  $\mu\text{m}$ ). Estes parâmetros precisam, contudo, de serem otimizados de forma a não haver diferenças significativas de leitura entre o *Aber* e o *Coulter* para possível substituição do último pelo primeiro.

Na Figura 12, estão apresentados os gráficos de *Bland Altman* entre o *Aber* e o *Coulter*, utilizando parametrizações diferentes no *Aber*, ST, US3, US4 e US5, de forma a quantificar a concordância entre os dois equipamentos.

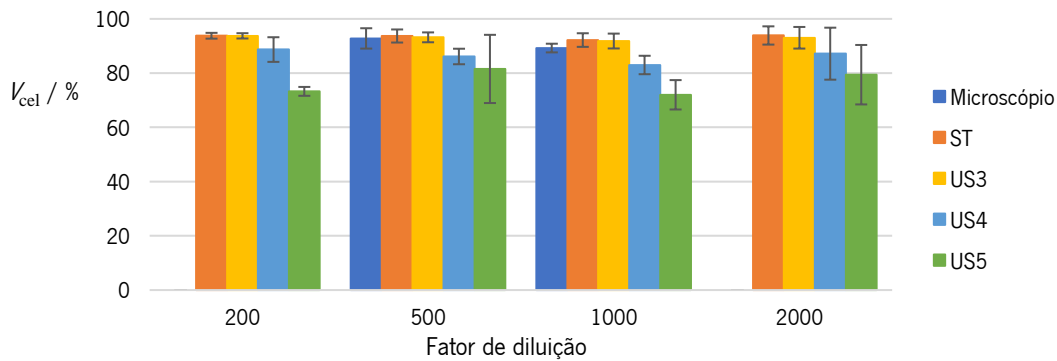


**Figura 12** – Gráficos das diferenças das leituras da concentração celular em função da média das leituras entre o *Coulter* e o *Aber* usando a parametrização ST (a), US3 (b), US4 (c) e US5 (d).

Verifica-se que, utilizando o parâmetro US5 no *Aber*, todas as leituras se encontram dentro do intervalo de concordância, independentemente do fator de diluição associado. Utilizando os restantes parâmetros, apenas um valor se encontrava fora do limite de concordância superior, que corresponde ao fator de diluição 2 000. A concordância é verificada quando, na maioria dos casos, os valores se apresentam distribuídos aleatoriamente próximos do valor zero e dentro dos limites superior e inferior (Giavarina, 2015; Stralen *et al.*, 2008). Para o parâmetro US5, na análise da concentração celular, verificou-se que os valores se apresentavam distribuídos aleatoriamente próximos do valor zero e dentro dos limites de concordância superior e inferior, verificando-se uma maior concordância entre o *Aber* e o microscópio. Nos restantes casos, denotou-se que o limite inferior de concordância é que se encontra próximo do valor zero, e não a média das diferenças.

O parâmetro US5, em todos os fatores de diluição, foi o que apresentou melhor concordância em relação ao *Coulter* (Figura 12d), e o que se aproxima mais do valor de concentração celular obtido por este, visto que a especificação do diâmetro mínimo deste parametro ser igual ao predefinido para o *Coulter* (2,7  $\mu\text{m}$ ). No entanto, verificou-se uma diferença significativa quando aplicados fatores de diluição diferentes (Figura 11), sendo um parâmetro a otimizar *a posteriori* para cada tipo de amostra a analisar no *Aber*.

A mesma análise de validação, com testes de diluição, foi feita para o caso da viabilidade celular, mas neste caso comparando apenas entre o *Aber* e o microscópio, visto que o *Coulter* não consegue contabilizar as células vivas e mortas, mas apenas as células totais (Figura 13).



**Figura 13** – Viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) lida no microscópio e no *Aber*, usando 4 parametrizações diferentes (ST, US3, US4 e US5) em função dos fatores de diluição (200, 500, 1 000 e 2 000). As barras apresentam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ )

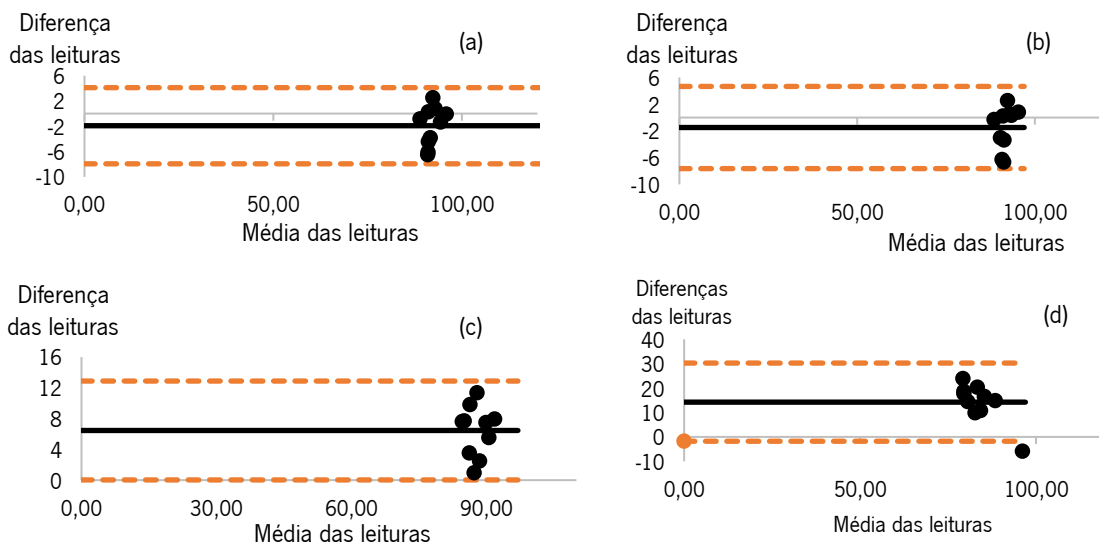
No caso da viabilidade celular, foi apenas possível analisar no microscópio para os fatores de diluição de 500 e 1 000, pois foram os únicos que se encontravam dentro da gama de leitura apropriada. Verificou-se uma proximidade entre o *Aber* e o microscópio quando aplicados os parâmetros ST e US3, e uma grande discrepância para os parâmetros US4 e US5. Entre os parâmetros ST, US3 e US4 apenas varia a especificação do diâmetro mínimo e máximo, sendo respectivamente, 5  $\mu\text{m}$  e 15  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  e 13  $\mu\text{m}$ , e 3  $\mu\text{m}$  e 13  $\mu\text{m}$ , levando apenas à alteração da quantidade de partículas contabilizadas como células. Dependendo do diâmetro das partículas, o *Aber* considera uma determinada partícula como uma célula se estiver dentro da especificação predefinida para o diâmetro. No caso do parâmetro US5, variou-se a especificação do diâmetro e o Alive\_dead, sendo 2  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$  o diâmetro mínimo e máximo, e 1 o Alive\_Dead. Neste caso, como se aumentou o Alive\_dead de 0,5 para 1, incrementou-se, de igual forma, a probabilidade de contabilizar mais células como mortas, diminuindo assim a viabilidade celular. Isto vai de encontro ao que aconteceu neste ensaio (Figura 13), onde o parâmetro US5 foi o que apresentou um valor mais baixo de viabilidade celular. Estes parâmetros precisam, contudo, de serem otimizados de forma a não apresentarem diferenças significativas de leitura entre o *Aber* e o *Coulter*, em termos de concentração celular, para possível substituição do *Coulter* pelo *Aber*, e de



modo a encontrar um parâmetro ótimo para a contagem celular e para a viabilidade celular ao mesmo tempo.

Quando aplicados fatores de diluição diferentes não se verificaram diferenças significativas de leitura para a viabilidade celular (segundo a análise ANOVA), devido ao facto deste parâmetro ser expressa em percentagem, não dependendo diretamente do número total de células por área de contagem.

Na Figura 14, estão apresentados os gráficos *Bland Altman* entre os dois equipamentos (microscópio e *Aber*) utilizando fatores de diluição diferentes e parametrizações diferentes no *Aber* (ST, US3, US4 e US5).



**Figura 14** – Gráfico das diferenças das leituras da viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) em função da média das leituras entre o microscópio e o *Aber* usando a parametrização ST (a), US3 (b), US4 (c) e US5 (d).

Para o caso da viabilidade celular, utilizando o parâmetro US5 no *Aber*, verificou-se uma diferença de leitura maior entre o *Aber* e o microscópio, já que o intervalo de concordância foi maior, comparado com os restantes parâmetros (ST, US3 e US4). Também foi neste caso que um dos pontos de leitura se encontrou fora dos intervalos de concordância. No caso em que se utilizaram os parâmetros US4 e US5 verificou-se que os valores estavam distantes do valor zero, mas encontravam-se dentro dos limites superior e inferior. No entanto, nas Figuras 14a e 14b, verifica-se que os valores se apresentam distribuídos aleatoriamente próximos do valor zero e dentro dos limites de concordância superior e inferior, verificando-se uma maior concordância

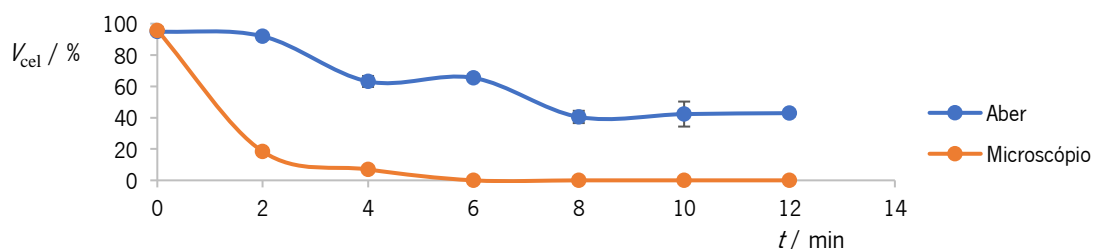
entre o *Aber* e o microscópio, para a análise da viabilidade celular, quando são utilizados os parâmetros ST e US3.

Em termos de concordância, não foi encontrado o mesmo padrão de leitura para a análise da concentração celular e da viabilidade celular, sendo, no primeiro caso, o parâmetro US5 o que apresentou melhor concordância entre o *Aber* e o *Coulter*, e no caso da viabilidade celular são os parâmetros ST e US3 os que apresentaram melhor concordância entre o *Aber* e o microscópio.

Estes parâmetros precisam, contudo, de serem otimizados de forma a não existirem diferenças significativas de leitura entre o *Aber* e o *Coulter*, e entre o *Aber* e o microscópio, para uma possível substituição do *Coulter* e do microscópio pelo *Aber*. Além disso, deve ser encontrado um parâmetro ótimo no *Aber* para a análise da concentração celular e da viabilidade celular em simultâneo.

#### 13.4. Resposta analítica da perda da viabilidade recorrendo a ensaio térmico

O desempenho do *Aber* também foi avaliado numa gama de viabilidade celular. Para isso, uma suspensão de “*stockagem C*” previamente diluída foi colocada em banho-maria a 70 °C, para reduzir gradualmente a viabilidade da amostra ao longo do tempo. As amostras foram retiradas desta suspensão a cada 2 min e analisadas no *Aber* e no microscópio até que atingissem uma viabilidade nula. Deve-se notar que a perda da viabilidade provocada pelo calor a 70 °C foi apenas usada para determinar a funcionalidade do *Aber* para medir valores mais baixos de viabilidade celular, não sendo a melhor representação do que acontece num fermentador ou num tanque de *stockagem*. Para além disto, é muito improvável que acontecesse este declínio tão rápido de viabilidade celular numa cervejeira. Na Figura 15, está apresentada a perda de viabilidade ao longo do tempo de aquecimento da solução.



**Figura 15** – Análise da perda de viabilidade ( $V_{cel}$ ), provocada pelo banho-maria a 70 °C durante 10 min, através do microscópio e do *Aber* (com a parametrização Standard), com  $n = 3$  para cada amostra.

Quando as células de levedura foram incubadas a 70 °C, estas perderam a viabilidade em 6 min, conforme se observa na Figura 15, usando a medição do microscópio. A viabilidade no *Aber* parece estagnar nos 40 %, embora a viabilidade no microscópio tenha atingido os 0 % passado 6 min. Passados os 2 min do ensaio, os resultados não se correlacionam bem entre o *Aber* e o microscópio, dando no *Aber* uma viabilidade à volta dos 90 % e no microscópio desceu para os 20 %. O calor poderá ter provocado a rutura física das membranas celulares e levado à perda de conteúdo intracelular, contribuindo para o aumento da interferência do fundo, podendo ser a causa desta discrepância grande entre o *Aber* e o microscópio. Porém, de acordo com a literatura, o azul de metileno não é recomendado para amostras com viabilidade < 80 %, pois este pode superestimar a viabilidade da amostra quando o número fica abaixo desse limite (OIV, 2010). Na realidade, num processo produtivo, a maioria dos cervejeiros rejeita a levedura para reutilização com uma viabilidade inferior a 90 %.

#### 14. Validação da resposta analítica do *Aber* para diferentes leveduras

A capacidade do *Aber* em medir, com precisão, diferentes estirpes de levedura, é de fundamental importância para a sua utilização numa empresa cervejeira que usa rotineiramente vários tipos. Portanto, o *Aber* foi testado para as leveduras A, B, C, D e E, usadas na empresa. Para fins de comparação, foram analisadas várias amostras, desde a propagação até à fase final da fermentação, no microscópio, no *Aber*, e no *Coulter*. Para cada amostra analisada foram feitas 10 repetições para determinar a repetibilidade, e utilizou-se o parâmetro “Standard” no *Aber* em todas as leituras.

Na Tabela 4 está apresentado o coeficiente de correlação de *Pearson* obtido na análise de regressão (Anexo B), entre equipamentos, e para cada tipo de levedura.

Através deste ensaio, da capacidade do *Aber* de medir diferentes estirpes, verificou-se, para leveduras com características morfológicas diferentes, a existência de alguma discrepância entre o microscópio e o *Aber* em termos de igualdade, exceto para o tipo de levedura B e E, apresentando, contudo, uma forte correlação entre os dois equipamentos. No entanto, entre o *Coulter* e o *Aber*, de uma forma geral, verificou-se, através da análise de regressão linear, uma desigualdade de leitura entre os dois equipamentos, e uma correlação baixa comparando com a correlação entre o microscópio e o *Aber*. Por último, entre o *Coulter* e o microscópio, existe alguma

discrepância em termos de igualdade e uma fraca correlação entre os dois equipamentos, exceto para o tipo de levedura A (Anexo B).

**Tabela 4** – Coeficiente de correlação de *Pearson* ( $r^2$ ) entre equipamentos obtido pela análise de regressão para cada tipo de levedura (A, B, C, D e E)

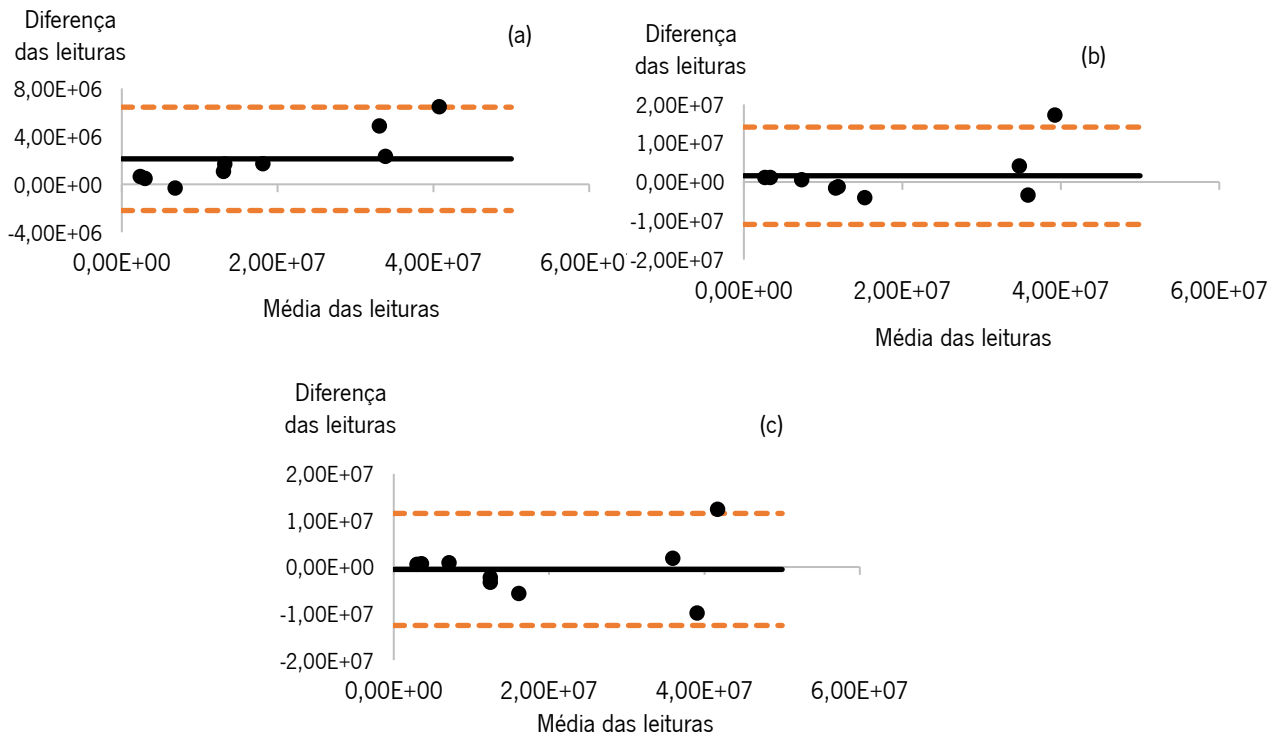
$r^2$	A	B	C	D	E
<i>Aber vs. microscópio</i>	0,9953	0,9713	0,9748	0,9524	0,7992
<i>Aber vs. Coulter</i>	0,8607	0,2102	0,7425	0,7488	0,9179
<i>Coulter vs. microscópio</i>	0,8598	0,2693	0,7615	0,8451	0,8347

Através da análise da Tabela 4, denotou-se uma forte relação nas leituras da concentração celular obtidas entre o *Aber* e o microscópio, utilizando o parâmetro “Standard”. Contudo, para o tipo de levedura B, verificaram-se discrepâncias entre o *Aber* e o *Coulter*, e entre o *Coulter* e o microscópio. Esta discrepância é normal acontecer para uma levedura do tipo B, pois esta agrega-se muito facilmente provocando erros de leitura no *Coulter*, no microscópio e no *Aber*. Por vezes, quando duas ou mais partículas estão muito agregadas e atravessam o orifício do *Coulter*, em vez de serem contabilizadas como duas ou mais células, são contabilizadas apenas como uma célula levando a erros de leitura. O mesmo pode acontecer tanto no *Aber* como no microscópio: duas ou mais partículas podem estar sobrepostas, umas em cima de outras, e contabiliza-se apenas como uma célula, estando presente mais do que uma célula.

Tal como já foi mencionado no capítulo 12, o coeficiente de correlação e a regressão linear às vezes são inadequados para avaliar a concordância, porque avaliam apenas a associação linear de dois conjuntos de observações. Para descrever a concordância entre duas medidas quantitativas utilizou-se o gráfico de *Bland Altman* (B&A) no qual usam uma abordagem gráfico onde são calculados os limites de concordância (Giavarina, 2015; Stralen *et al.*, 2008).

#### Levedura do tipo A

Na Figura 16 encontra-se o gráfico de *Bland Altman* entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c), utilizando no *Aber* a parametrização Standard.



**Figura 16** – Gráfico das diferenças das leituras da concentração celular ( $C$ ) em função da sua média entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c) para a levedura do tipo A.

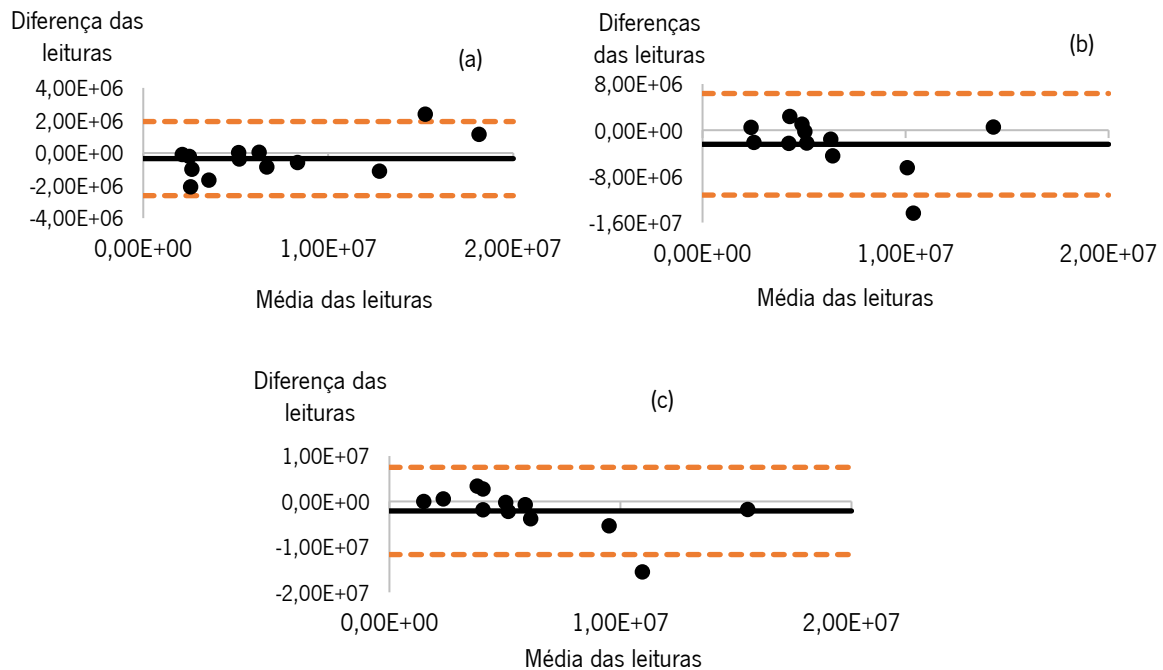
A concordância é verificada, quando na maioria dos casos, os valores se apresentam distribuídos aleatoriamente próximos do valor zero e dentro dos limites superior e inferior. Para este caso da levedura do tipo A, verificou-se que 67 % dos valores analisados no *Aber* e no microscópio são concordantes visto que se encontram dentro dos limites de concordância e próximos do valor zero, os outros 33 % encontravam-se dentro dos limites inferior e superior, mas mais distantes do valor zero. Os valores obtidos entre o *Aber* e o *Coulter* foram concordantes visto que se encontravam dentro dos limites de concordância e próximos do valor zero, exceto um valor que se encontra fora. O mesmo se verificou entre o *Coulter* e o microscópio.

Denotou-se que existe uma concordância entre os três equipamentos para este tipo de levedura utilizando o parâmetro “Standard” no *Aber*, visto que a média das diferenças entre os dois se encontrava próxima do valor zero, e todos os valores encontravam-se distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância.

#### Levedura do tipo B

Na Figura 17 encontra-se o gráfico de *Bland Altman* entre o *Aber* e o microscópio (Figura 17a),

entre o *Aber* e o *Coulter* (Figura 17b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (Figura 17c), utilizando no *Aber* a parametrização “Standard”.



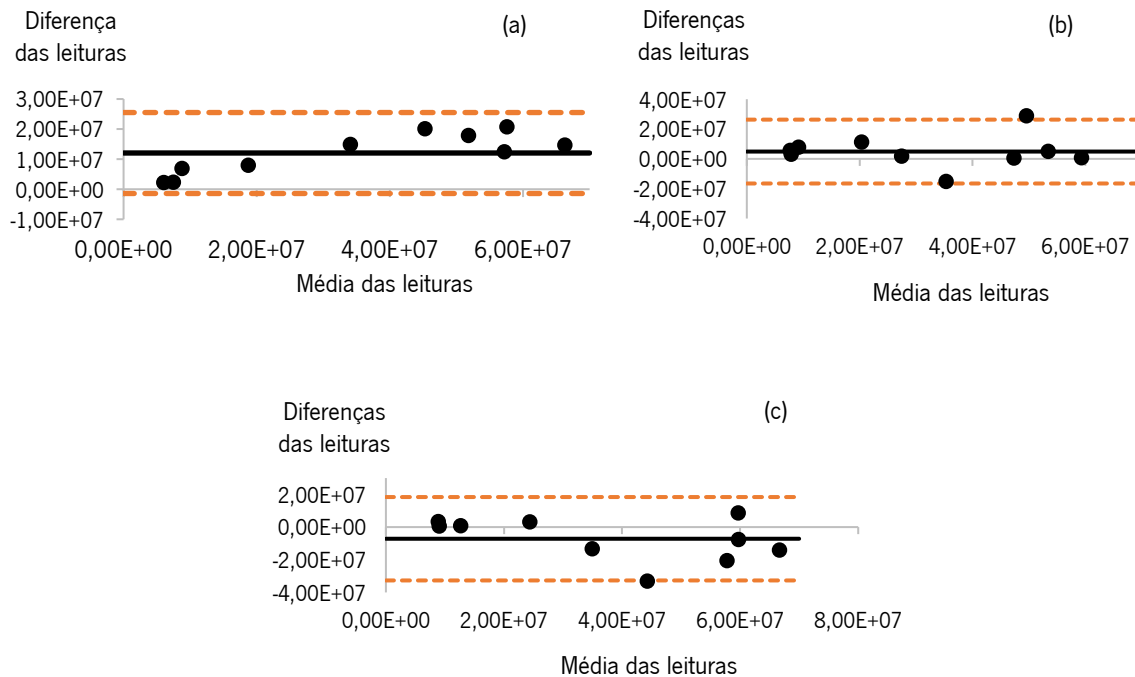
**Figura 17** – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular ( $C$ ) em função da média das leituras entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c), para a levedura B.

Para este caso, da levedura do tipo B, apesar de não se ter verificado uma tendência linear entre os três equipamentos, verificou-se que os valores analisados nas três comparações são concordantes visto que se encontravam dentro dos limites de concordância e próximos do valor zero, exceto um valor.

Para além de se ter verificado uma boa correlação entre o *Aber* e o microscópio (Tabela 4), também se verificou uma melhor concordância entre estes dois equipamentos, do que entre o *Aber* e o *Coulter* (Figura 17b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (Figura 17c), visto que os intervalos de concordância entre o *Aber* e o microscópio são inferiores aos restantes. Denotou-se, assim, uma maior igualdade de leituras entre o *Aber* e o microscópio, podendo para este tipo de levedura o *Coulter* não ser o melhor equipamento de análise.

## Levedura do tipo C

Analisou-se a concordância através do gráfico *Bland Altman*, apresentada na Figura 18, entre o *Aber* e o microscópio (Figura 18a), entre o *Aber* e o *Coulter* (Figura 18b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (Figura 18c).



**Figura 18** – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c), para a levedura do tipo C.

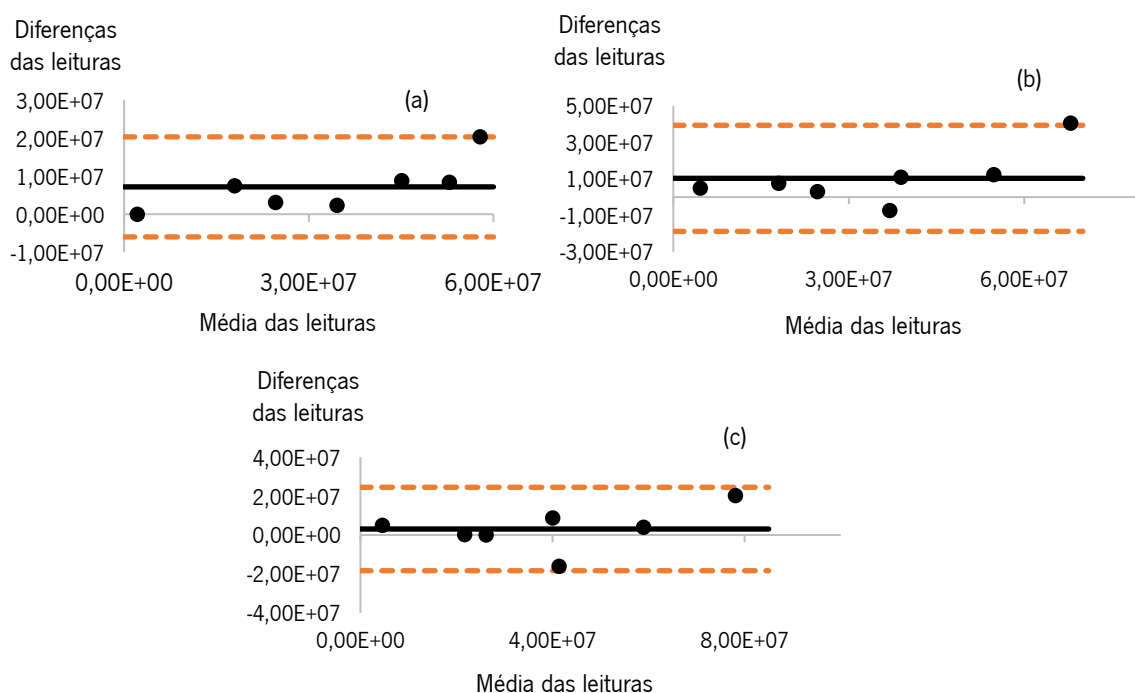
Comparando o *Aber* e o microscópio, apesar de não se ter verificado uma tendência linear, observando a Figura 18a verifica-se que não existe uma concordância de leitura nos dois equipamentos, visto que os valores das diferenças entre os dois equipamentos se encontram distantes do valor zero, sendo o valor médio das diferenças de  $1,20 \times 10^7$ . Contudo, todos os valores encontram-se dentro do intervalo de concordância. Visto que apenas 40 % dos valores se encontram próximos do valor zero e dentro do limite de concordância, em simultâneo, não se pode afirmar que existe uma concordância entre o *Aber* e o microscópio usando o parâmetro “Standard”, pois a concordância é verificada quando na maioria dos casos os valores se apresentam distribuídos aleatoriamente próximos do valor zero e dentro dos limites superior e inferior.

Em relação ao *Aber* e ao *Coulter* constatou-se, pela Figura 18b, uma concordância entre os dois equipamentos, visto que quase todos os valores das diferenças entre eles se encontram próximos do valor zero e dentro do intervalo de concordância. Constatou-se a existência de concordância entre o *Aber* e o *Coulter* usando o parâmetro “Standard”, visto que 80 % dos valores se encontram próximos do valor zero e dentro dos limites de superior e inferior de concordância.

Entre o *Coulter* e o microscópio, verifica-se uma concordância de leitura nos dois equipamentos, visto que 90 % dos valores se encontravam próximos do valor zero e dentro do intervalo de concordância.

#### Levedura do tipo D

O estudo da concordância entre *Aber* e o microscópio (Figura 19a), entre o *Aber* e o *Coulter* (Figura 19b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (Figura 19c), através do gráfico *Bland Altman*, está apresentado na Figura 19.



**Figura 19** – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c), para a levedura do tipo D.

Pela análise da Figura 19a, onde é apresentada o gráfico da análise de concordância entre *Aber* e o microscópio através do gráfico *Bland Altman*, constata-se que não existe uma concordância

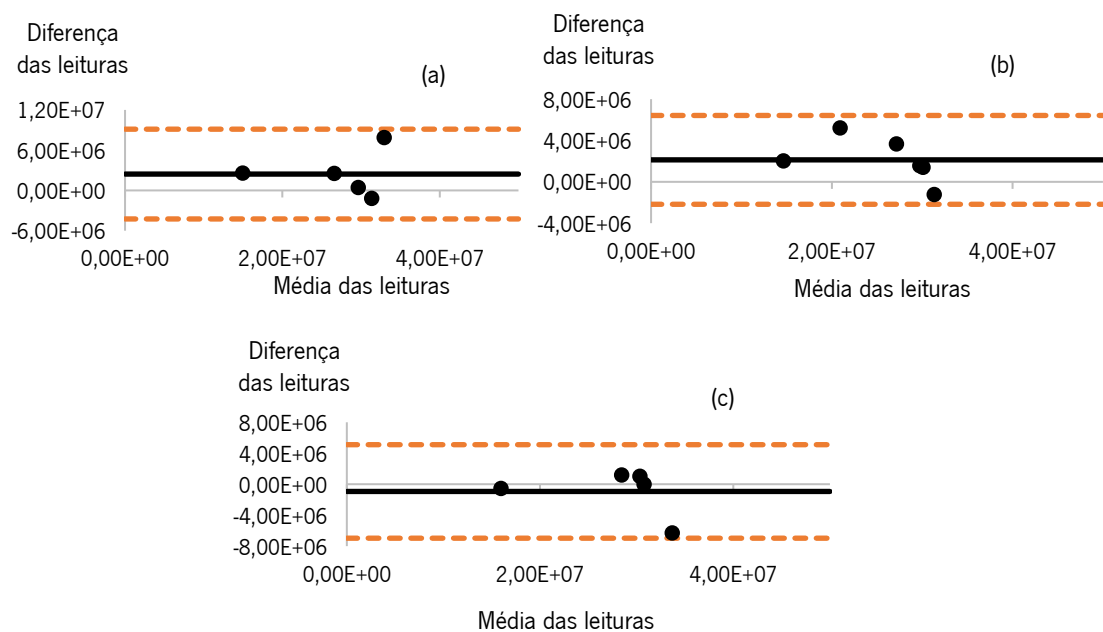


entre os dois equipamentos, visto que os valores não estão distribuídos aleatoriamente perto do valor zero do eixo dos  $YY$ , concluindo-se que existem diferenças nas leituras. Tal como se concluiu em relação à comparação feita entre o *Aber* e ao microscópio, o mesmo aconteceu entre o *Aber* e o *Coulter*.

Ao contrário do que se conclui entre o *Aber* e o microscópio, e entre o *Aber* e o *Coulter*, verificou-se uma concordância entre o *Coulter* e o microscópio, visto que os valores estavam distribuídos aleatoriamente perto do valor zero. Assim, não existem diferenças entre o *Coulter* e o microscópio, sendo necessário otimizar a leitura do *Aber* para este tipo de levedura.

#### Levedura do tipo E

Para descrever a concordância das leituras da concentração celular obtidas entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b), e entre o *Coulter* e o microscópio (c) construíram-se os gráficos de *Bland Altman*, representados na Figura 20.



**Figura 20** – Gráfico das diferenças de leitura da concentração celular em função da média das leituras entre o *Aber* e o microscópio (a), entre o *Aber* e o *Coulter* (b) e, entre o *Coulter* e o microscópio (c), para a levedura do tipo E.

Através da análise *Bland Altman* apresentada na Figura 20a, corroborou-se uma boa concordância entre os dois equipamentos, visto estarem distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância. Tal como se concluiu em relação à comparação feita entre o *Aber* e

ao microscópio, o mesmo aconteceu comparando o *Aber* e o *Coulter*. Observou-se a existência de concordância entre os dois equipamentos, visto que os valores estavam distribuídos aleatoriamente perto do valor zero do eixo dos *YY*, concluindo-se que não existem diferenças nas leituras. O mesmo se constatou entre os valores de concentração celular obtidos entre o *Coulter* e o microscópio.

Através da análise destes gráficos apresentados acima (Figura 16 a Figura 20), denotou-se, para os tipos de levedura B e E, uma boa concordância entre o *Aber* e o microscópio. Entre o *Aber* e o *Coulter* existiu boa concordância de leitura para todos os tipos de levedura, no entanto será necessária uma otimização, *a posteriori*, do parâmetro “Yeast Type” no *Aber*, mais concretamente, em relação à especificação do diâmetro mínimo e máximo, para leveduras com características morfológicas diferentes, de forma a diminuir os limites de concordância. Através da observação dos gráficos *Bland Altman*, verifica-se que a relação entre *Coulter* e o microscópio é muito idêntica à que existe entre o *Aber* e o *Coulter*.

O motivo dos limites de concordância serem um pouco elevados em alguns dos casos pode-se dever ao facto da especificação dos diâmetros do parâmetro “Standard” no *Aber* (5  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$ ) não ser igual à especificação pré-definida no *Coulter* (2,7  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ ). Com isto, apresentaram-se algumas diferenças de leitura, continuando, contudo, a haver concordância entre os equipamentos visto que a maioria dos pontos se encontravam distribuídos aleatoriamente perto do valor zero do eixo dos *YY* (média da diferença entre os dois equipamentos) e dentro dos limites de concordância.

Todavia, para a validação do *Aber* e, uma possível substituição do *Coulter*, é necessário uma igualdade de leituras entre o *Coulter* e o *Aber*, sendo necessário uma otimização, *a posteriori*, dos parâmetros a usar no *Aber*.

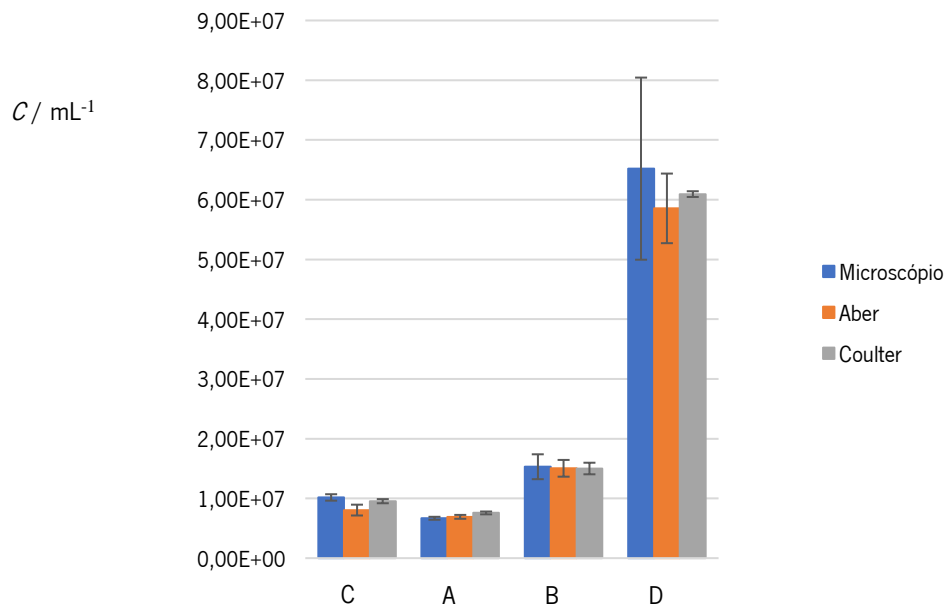
## 15. Validação analítica do *Aber* em diferentes fases do processo produtivo

A capacidade do *Aber* de medir diferentes estirpes de levedura em condições fisiológicas diferentes foi testada com amostras retiradas da fase da propagação, da fermentação e da *stockagem*.

### 15.1. Amostras em propagação

Os quatro tipos de levedura (A, B, C e D) foram analisadas no microscópio, no *Aber* e no *Coulter* para fins de comparação. Para cada amostra analisada foram feitas 5 repetições em cada

equipamento para determinar a repetibilidade, e utilizou-se o parâmetro “Standard” no *Aber* em todas as leituras. Na Figura 21, está apresentado o gráfico da concentração celular analisada nos três equipamentos e para cada uma das quatro estirpes de levedura, bem como o erro associado à média das 5 repetições.



**Figura 21** – Concentração celular ( $C$ ) durante a fase da propagação, para cada estirpe de levedura (A, B, C e D) em três equipamentos diferentes. As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ )

Verificou-se que para cada tipo de levedura, o valor da concentração celular lido nos três equipamentos é muito idêntico, exceto no caso da levedura do tipo D que o valor da concentração celular obtido no *Aber* aparenta ser inferior ao microscópio e ao *Coulter* [microscópio:  $(6,52 \times 10^7 \pm 1,52 \times 10^7)$  mL<sup>-1</sup>; *Aber*:  $(5,86 \times 10^7 \pm 5,82 \times 10^6)$  mL<sup>-1</sup>; *Coulter*:  $(6,09 \times 10^7 \pm 4,80 \times 10^5)$  mL<sup>-1</sup>]. Posto isto, realizou-se a análise ANOVA e concluiu-se que não existiam diferenças significativas entre a leitura obtida nos três equipamentos para cada tipo de levedura ( $p_{\text{value}} > 0,05$ ).

Determinou-se o coeficiente de repetibilidade para cada equipamento e para cada estirpe sendo estes apresentados na Tabela 5. Tanto para o *Aber* como para o *Coulter*, verificou-se que os valores obtidos, para todos os tipos de levedura, se encontravam dentro dos limites aceitáveis definidos pela empresa ( $\leq 10\%$ ). Já no caso do microscópio e para os tipos de levedura B e D, denotou-se que os valores do coeficiente de repetibilidade se encontram fora dos limites aceitáveis. Pode ser devido a isto que o valor da concentração celular lido para o tipo de levedura D tenha sido um pouco elevado e discrepante do valor obtido no *Aber* e no *Coulter*. Tal como se verificou nos

ensaios de repetibilidade realizados no capítulo 13, o microscópio apresentou uma variabilidade maior quando comparada com o *Aber* e com o *Coulter*, podendo estar em causa a presença de erro humano nas leituras e o pequeno volume usado para a contagem de células na câmara de *Neubauer*.

**Tabela 5** – Coeficiente de variação (*CV*) da leitura da concentração celular das 5 repetições efetuadas para cada estirpe de levedura em cada equipamento, em fase de propagação da levedura

Equipamento Tipo de levedura	Microscópio <i>CV</i> /%	<i>Aber</i> <i>CV</i> /%	<i>Coulter</i> <i>CV</i> /%
C	4,27	9,08	2,93
A	3,71	3,76	3,11
B	10,97	7,52	5,20
D	18,83	9,95	0,63

Pode-se concluir, através deste ensaio, que para amostras em propagação, as medições no *Aber* (usando o parâmetro “Standard”) foram comparáveis às contagens no *Coulter* e às contagens manuais, visto não se terem detetado diferenças significativas de leitura entre os três equipamentos.

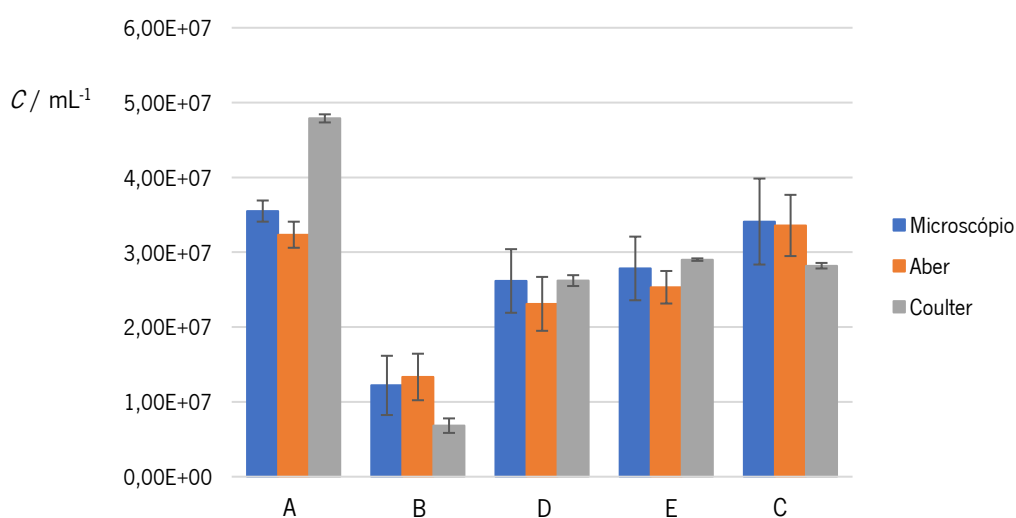
### 15.2. Amostras em fermentação

Na Figura 22 é apresentada a variação da concentração celular durante a fermentação alcoólica, analisada nos três equipamentos (*Aber*, *Coulter* e microscópio) para cada uma das cinco estirpes de levedura (A, B, C, D e E).

Para cada tipo de levedura, o valor da concentração celular lido no microscópio e no *Aber* foi muito idêntico, no entanto, em comparação com o valor lido no *Coulter*, verifica-se a existência de diferenças significativas para os tipos de levedura A, B e C ( $p_{\text{value}} < 0,05$ ). Em contrário, no caso das leveduras C e D, não existem diferenças significativas entre os três equipamentos. O facto da especificação de diâmetro pré-definido para o *Coulter* ser diferente da especificação do parâmetro “Standard” do *Aber*, pode ser a causa da discrepância de valor entre os dois equipamentos.

Para o microscópio, os erros associados à média ( $n = 5$ ) encontram-se dentro da gama de erro

associado à contagem manual, entre os 20 % e os 30 %, considerando aceitáveis quando comparados com a ordem de grandeza de leitura da concentração celular (Thomson *et al.*, 2015). Em relação ao *Aber* e ao *Coulter*, os seus erros de leitura encontram-se abaixo do erro de leitura do microscópio, e são relativamente pequenos em comparação com a ordem de grandeza do valor da concentração celular. Uma vez que não há evidências da presença de erros grosseiros, será apenas necessário otimizar o melhor parâmetro de leitura no *Aber* para cada tipo de levedura no caso de amostras em fermentação.



**Figura 22** – Concentração celular ( $C$ ) durante a fase de fermentação, para cada estirpe de levedura (A, B, C, D e E) nos 3 equipamentos diferentes. As barras representam o erro associado à média para 5 repetições ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Também foi determinado o coeficiente de variação para cada equipamento e para cada estirpe, estando apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Coeficiente de variação ( $CV$ ) da leitura da concentração celular das 5 repetições efetuadas para cada estirpe de levedura em cada equipamento, em fase de fermentação

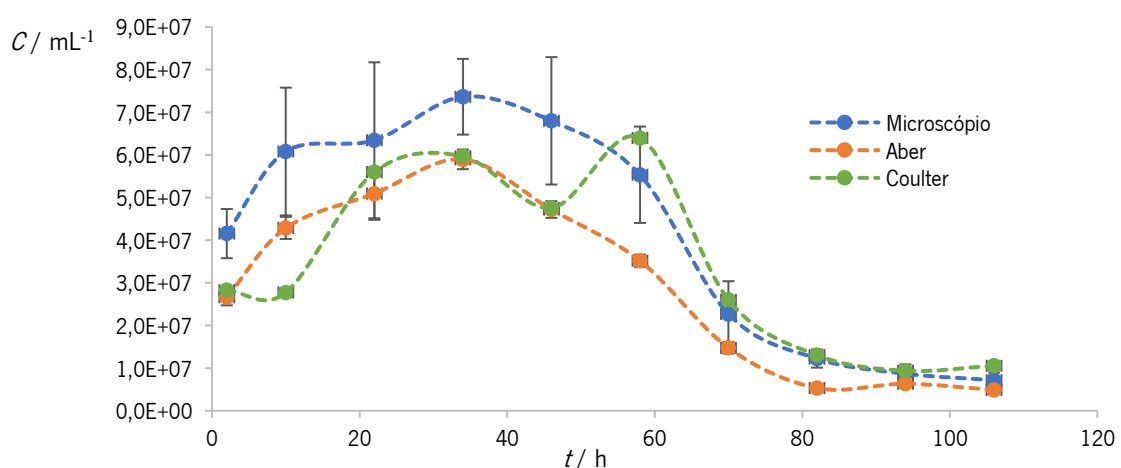
Equipamento \ Tipo de levedura	Microscópio $CV/\%$	Aber $CV/\%$	Coulter $CV/\%$
C	13,57	9,81	1,06
A	3,98	4,34	1,13
B	32,45	23,33	14,20
D	21,35	12,56	2,23
E	14,28	6,92	0,46

Tanto para o *Aber* como para o *Coulter*, verificou-se que os valores do coeficiente de variação, para todos os tipos de levedura, encontravam-se dentro dos limites de variação ( $\leq 10\%$ ), exceto no caso do tipo de levedura B que apresentou valores superiores a  $10\%$ . Sendo que a levedura B apresenta dificuldades de desagregação, torna-se difícil manter uma suspensão homogênea, o que provoca erros na análise. Já no caso do microscópio, denotou-se que os valores do coeficiente de variação encontram-se fora dos limites de variação ( $\leq 10\%$ ) pelo que neste equipamento poderão estar presentes erros na leitura da concentração celular. Tal como se verificou no subcapítulo 13, o microscópio apresenta uma variabilidade maior comparando com o *Aber* e com o *Coulter*.

Para amostras em fermentação, as medições no *Aber* (usando o parâmetro “Standard”) foram comparáveis às contagens no *Coulter* e às contagens manuais, apenas para os tipos de levedura D e E. No caso das leveduras A, B e C, as medições no *Aber* foram apenas comparáveis às contagens manuais, necessitando de otimizações no *Aber* de forma a não haver discrepância em relação ao *Coulter*.

#### Acompanhamento da fermentação da levedura C

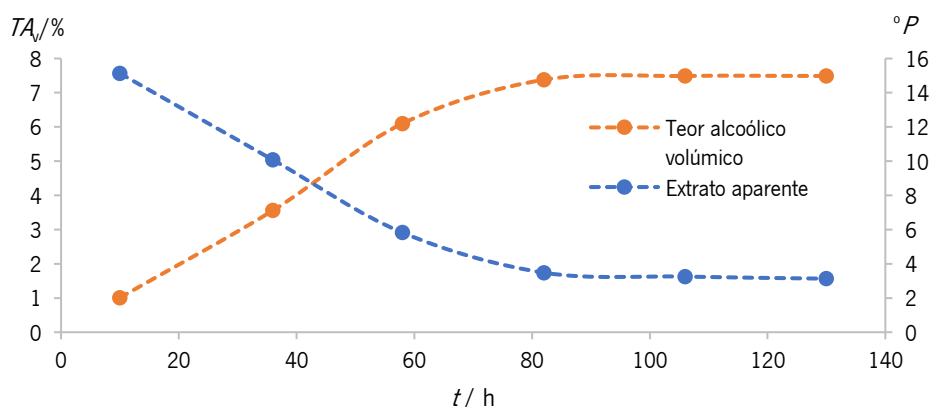
O acompanhamento de fermentação alcoólica, conduzida pela levedura C, foi realizado pela medição da concentração celular (Figura 23), do teor alcoólico e do extrato aparente (Figura 24) ao longo do tempo. A amostragem foi realizada de 12 h em 12 h, e a determinação da concentração celular foi medida com três equipamentos: *Aber*, *Coulter* e microscópio ótico.



**Figura 23** – Concentração celular ( $C$ ) da levedura do tipo C ( $n = 10$ ), lida em três equipamentos, em função do tempo ( $t$ ) de fermentação.

A fermentação divide-se em 6 fases distintas, fase *lag* ou de latência, a fase de aceleração, a fase exponencial, a fase de retardação, a fase estacionária e fase de declínio ou morte (Priest & Campbell, 1999). Na Figura 23, conseguiu-se observar algumas destas fases, não sendo possível observar todas pois seria necessário maior tempo de amostragem. Verificou-se, também, que a curva de fermentação delineada pelas leituras no microscópio apresentou a mesma tendência da curva delineada no caso das leituras efetuadas no *Aber*. No entanto, comparando com a curva obtida pelo *Coulter* esta não seguiu a mesma tendência, ocorrendo algumas oscilações de leitura neste equipamento para este tipo de levedura, podendo justificar a diferença de leitura da concentração celular observada na Figura 22 entre o *Coulter* e o *Aber*, e o *Coulter* e o microscópio em relação à levedura do tipo C. Conseguiu-se concluir que, para a levedura C, e usando o parâmetro “Standard”, no *Aber*, os valores aproximam-se mais aos do *Coulter* do que aos do microscópio. Há, contudo, pontos com alguma discrepância nas leituras efetuadas no *Coulter*, podendo estar presente algum erro de leitura no equipamento, visto ser uma contagem eletroquímica e não visual.

Efetuuou-se um acompanhamento da fermentação da levedura C em termos de extrato aparente e de teor alcoólico. É nesta etapa do processo de produção de cerveja que as leveduras convertem os açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono. Para além destes produtos, formam-se ainda outros subprodutos que contribuem para as propriedades organoléticas da cerveja (Lewis, 2015).



**Figura 24** – Acompanhamento da fermentação em termos de extrato aparente ( $^{\circ}P$ ) e de Teor alcoólico volúmico ( $TA_v$ ).

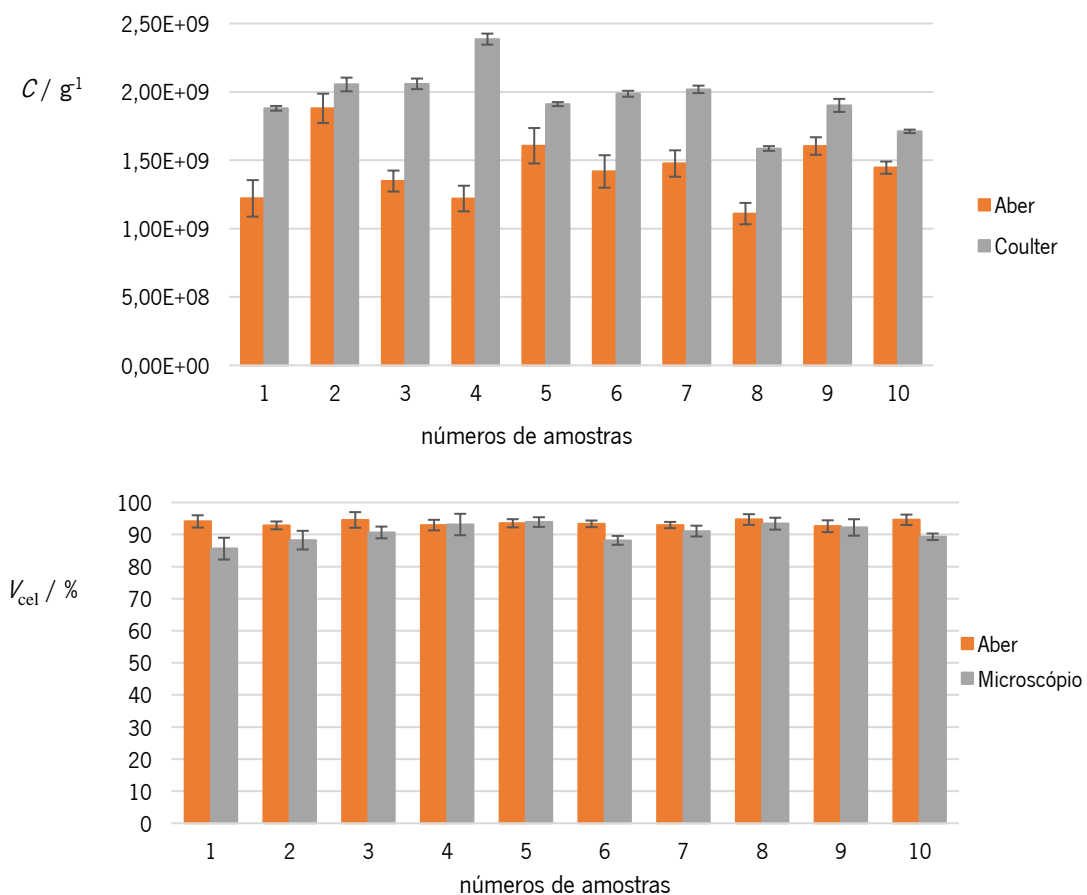
Observando a Figura 24, verifica-se que, ao longo do tempo de fermentação, o teor alcoólico aumentou e a concentração de extrato diminuiu, tal como era de esperar. Ao longo da fermentação

as leveduras convertem os açúcares em etanol e dióxido de carbono, essencialmente (Cruz, 2007; Kunze & Weber, 2004).

### 15.3. Amostras em *stockagem*

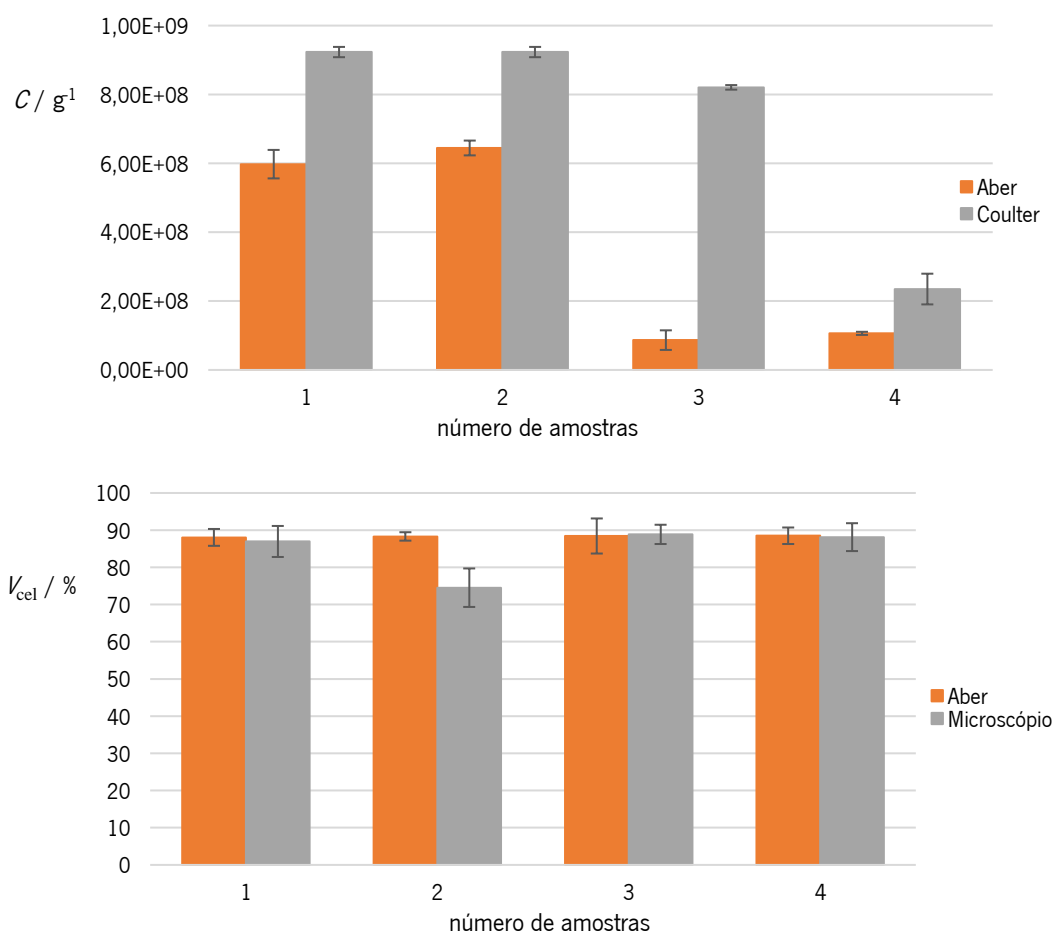
Tal como se procedeu para as amostras retiradas da fase da propagação e da fermentação, o mesmo aconteceu para as amostras retiradas da *stockagem*, mantendo como intuito, o estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular e a viabilidade celular de diferentes estirpes de leveduras nas diferentes fases do processo fermentativo.

O estudo da análise da concentração celular e da viabilidade celular da levedura C em fase de *stockagem* é apresentado na Figura 25, respetivamente, e para a levedura D, na Figura 26. A análise da concentração celular foi efetuada apenas no *Aber* e no *Coulter*, enquanto que a viabilidade foi analisada no *Aber* e no microscópio.



**Figura 25** – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) da levedura C em fase de *stockagem* ( $n = 10$ ), determinada no *Aber* e no *Coulter*. As barras representam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).





**Figura 26** – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) da levedura D em fase de *stockagem* ( $n = 10$ ), determinada no *Aber* e no *Coulter*. As barras representam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).

No caso de amostras em *stockagem*, verificou-se, para quase todas as amostras analisadas, a existência de desigualdade na análise da concentração celular efetuada no *Aber* e no *Coulter*, tanto para a levedura C como para a D. No entanto, concluiu-se que o *Coulter* contabilizou sempre mais partículas como células do que o *Aber*, em todas as amostras analisadas. Isto pode-se dever ao facto da especificação dos diâmetros do parâmetro “Standard” no *Aber* (5  $\mu m$  a 15  $\mu m$ ) não ser igual à especificação pré-definida no *Coulter* (2,7  $\mu m$  a 8  $\mu m$ ), apresentando, com isto, algumas diferenças de leitura. Contudo, observaram-se bons resultados quanto à análise da viabilidade celular no *Aber* e no microscópio visto que os valores se encontram muito próximos nos dois equipamentos.

Todavia, para a validação do *Aber* e uma possível substituição do *Coulter*, é necessária uma igualdade de leituras entre os dois equipamentos, sendo necessário uma otimização, *a posteriori*, do parâmetro “Yeast Type” a usar no *Aber*, de forma a não haver discrepâncias entre eles, e de

modo a encontrar um parâmetro ótimo de análise, em simultâneo, da viabilidade celular e da concentração celular.

## 16. Otimização do *Aber* para medição da levedura em diferentes tipos de amostras

Tal como foi mencionado ao longo de todos os ensaios efetuados, foi necessário proceder a otimizações no *Aber* consoante o tipo de amostra que se pretende analisar, visto que diferentes amostras possuem diferentes características dependentes do tipo de levedura e do tipo de mosto.

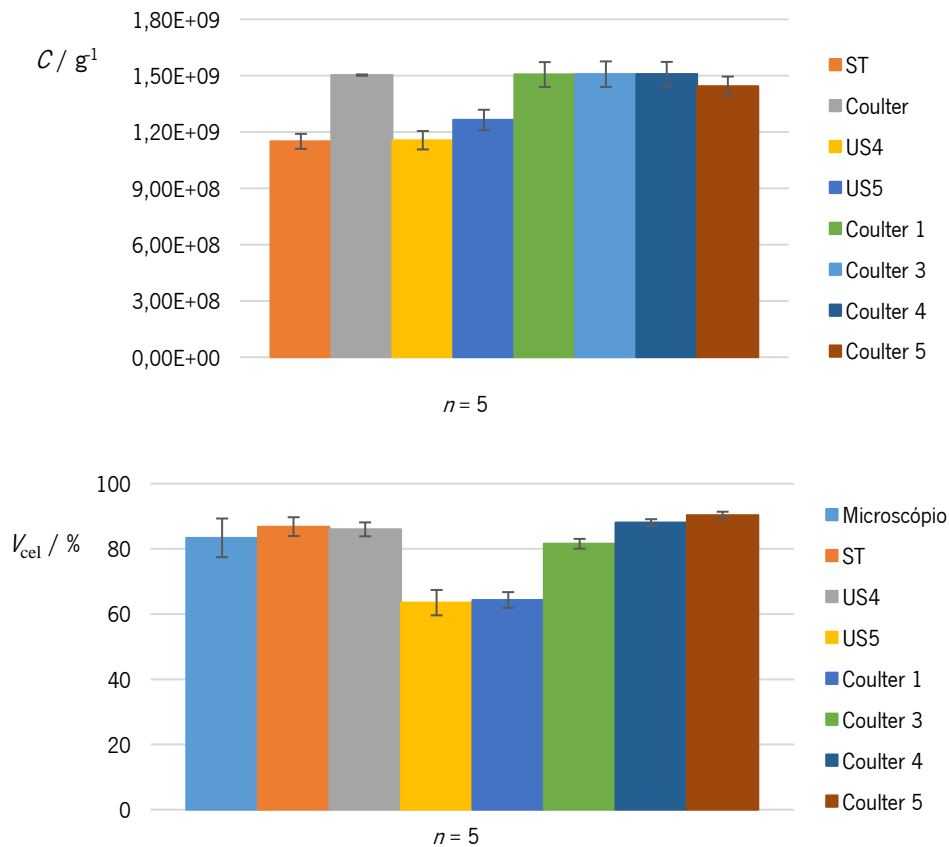
Analisaram-se vários tipos de amostras, tendo-se variado, entre estas, o tipo de levedura e o tipo de mosto utilizado no seu processo produtivo. Em primeiro lugar, analisaram-se as leveduras de *stockagem* C e D que serão reutilizadas para novas fermentações. De seguida, as cervejas C, F, G, C sem álcool, H e I, todas produzidas com a levedura C, variando apenas o tipo de mosto na fermentação. E por último, a cerveja A e B, a cerveja D e a sidra E.

De forma a encontrar o melhor parâmetro, executaram-se testes de tentativa-erro com vários parâmetros selecionados, para, após várias leituras, escolher o valor que se aproxima mais do método atualmente utilizado pela empresa, o *Coulter*. Neste ensaio, apenas se comparou a concentração celular e a viabilidade celular, pois são as propriedades que têm uma importância mais relevante na qualidade e na produção de cerveja e sidra.

### 16.1. Amostras de levedura C em *stockagem*

Foram testados vários parâmetros no *Aber*, tendo-se variado a especificação do diâmetro, o “*Alive\_Dead*” e o “*Grey\_contrast*”, e comparados com os valores de concentração celular obtidos no *Coulter*, e com os valores de viabilidade celular obtidos no microscópio. Na Figura 27, estão apresentados os histogramas de comparação entre equipamentos utilizando parâmetros diferentes para medir a concentração celular e a viabilidade celular, para o tipo de levedura C em *stockagem*.

Em relação à análise da concentração celular, verifica-se através da Figura 27, que os parâmetros nomeados por “*Coulter 1*, *Coulter 3*, *Coulter 4* e *Coulter 5*” foram os que aproximaram do valor obtido no *Coulter*, e os que não apresentaram diferenças significativas ( $p_{\text{value}} > 0,05$ ), enquanto que para os restantes parâmetros apresentaram diferenças significativas em comparação com o valor do *Coulter*.



**Figura 27** – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) na *stockagem C*, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).

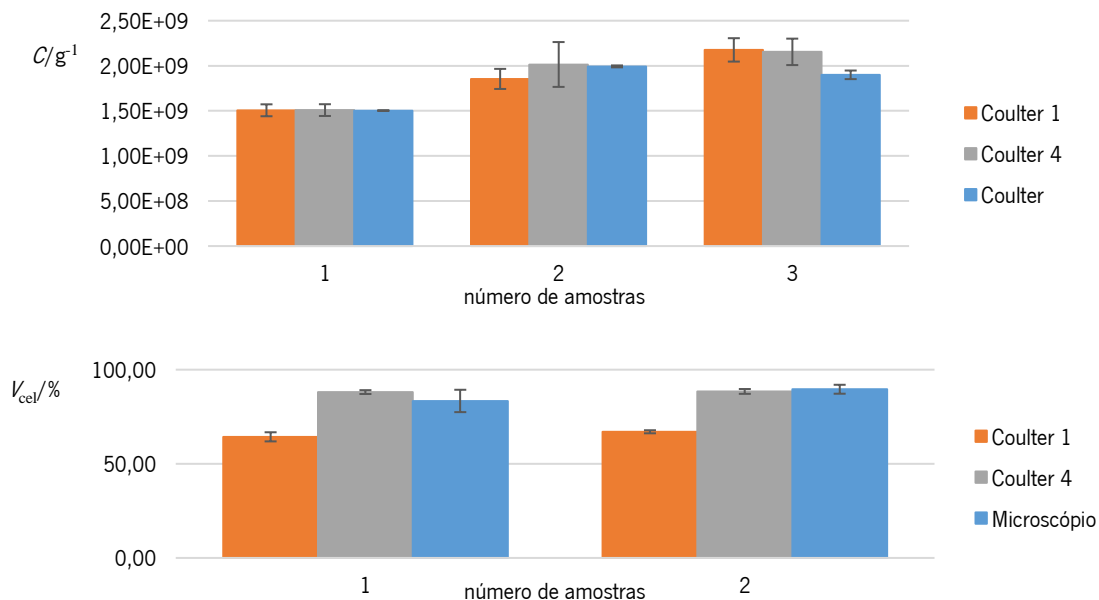
O facto de a especificação dos diâmetros destes parâmetros mencionados ser igual à especificação pré-definida no *Coulter* ( $2,7 \mu m$  a  $8 \mu m$ ) fez com que não se observassem diferenças significativas de leitura entre o *Aber* e o *Coulter*. Contudo, para os parâmetros “ST, US4 e US5” observaram-se diferenças significativas em relação ao valor do *Coulter* pois a especificação do diâmetro destes parâmetros é diferente da especificação do *Coulter*. Concluiu-se assim que, o parâmetro que mais influência teve na discrepância de leituras, para amostras de *stockagem C*, foi a especificação do diâmetro mínimo e máximo.

Já na análise efetuada para a viabilidade celular, o mesmo não se observou. Os parâmetros ótimos observados para a análise da concentração celular não foram os mesmos para a análise da viabilidade celular, sendo que apenas os parâmetros “Coulter 3”, “Coulter 4” e “Coulter 5” se aproximaram do valor obtido no microscópio. A única especificação que diferencia os parâmetros “Coulter 1”, “Coulter 3” e “Coulter 4” é o “Alive\_Dead” que determina a probabilidade de uma célula de levedura ser considerada como viva ou morta, sendo utilizado, respetivamente, os

seguintes valores: 0,5; 0,2; 0,1. No entanto, entre os parâmetros “Coulter 4” e “Coulter 5”, o que os diferencia é, apenas, a especificação “Grey\_Contrast”, que determina qual a percentagem de contraste em relação aos objetos de segundo plano que precisa de ter para ser incluído na contagem, sendo utilizados os valores 7 e 10, respetivamente.

Posto isto, verificou-se que a diminuição o valor da especificação “Alive\_Dead” provocou um aumento da viabilidade celular (verificado entre o “Coulter 1” e “Coulter 3”), e aumentando o “Grey\_Contrast” levou a um aumento da viabilidade celular (entre o “Coulter 4” e “Coulter 5”). Contudo, destes quatro parâmetros (“Coulter 1”, “Coulter 3”, “Coulter 4” e “Coulter 5”) o valor que se aproxima mais do valor obtido no microscópio foi o parâmetro “Coulter 4”, tendo sido considerado como o parâmetro ótimo para analisar a viabilidade celular e a concentração celular, em simultâneo.

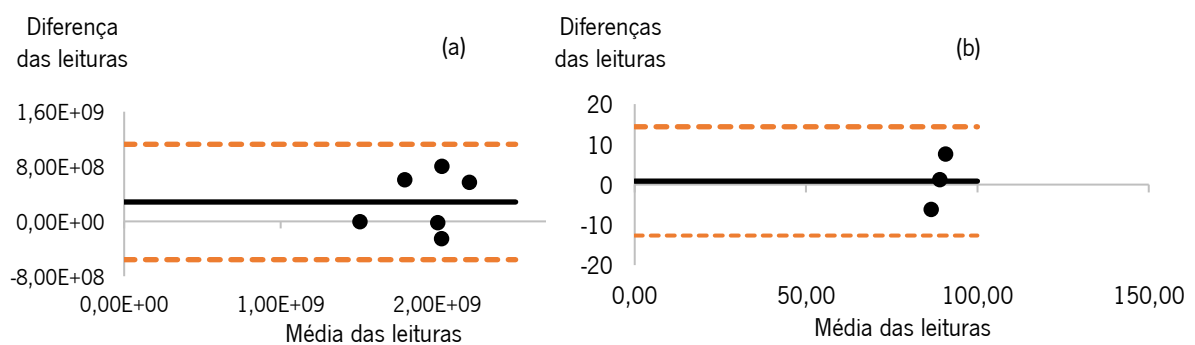
De forma a sustentar ainda mais a escolha do parâmetro “Coulter 4”, foi ainda feita uma análise para três amostras diferentes de *stockagem* C, tendo-se programado no *Aber* os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4”, e realizada a avaliação da concentração celular e da viabilidade celular no *Coulter* e no microscópio, respetivamente. Na Figura 28, estão apresentados os gráficos da análise da concentração celular e da viabilidade celular na *stockagem* C, com os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4”.



**Figura 28** – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{cel}$ ) na *stockagem* C, com os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4” medida no *Aber* ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{value} = 0,05$ ).

Analisando a capacidade do *Aber* de medir a concentração celular na *stockagem* C utilizando os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4” e comparando com o valor do *Coulter*, verificou-se que não existiram diferenças significativas entre os três valores obtidos para as três amostras analisadas ( $p_{\text{value}} > 0,05$ ). Já em relação à viabilidade celular, denotaram-se diferenças significativas entre os parâmetros “Coulter 1 e Coulter 4”, sendo o parâmetro “Coulter 4” o valor que se aproximou do valor obtido pelo microscópio, para ambas as amostras analisadas.

Na Figura 29, estão apresentados os gráficos de *Bland Altman* entre o *Aber* e o *Coulter* (para a concentração celular), e entre o *Aber* e o microscópio (para a viabilidade celular). O método *Bland Altman* calcula a diferença média entre dois métodos de medição e os intervalos de concordância de 95 %. Espera-se que estes limites incluam 95 % dos resultados das diferenças entre os dois métodos de medição, de forma a serem considerados concordantes.



**Figura 29** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular entre o *Coulter* e o *Aber* (a) e da viabilidade celular entre o *Aber* e o microscópio (b) para a levedura C em *stockagem*, e utilizando no *Aber* o parâmetro “Coulter4”.

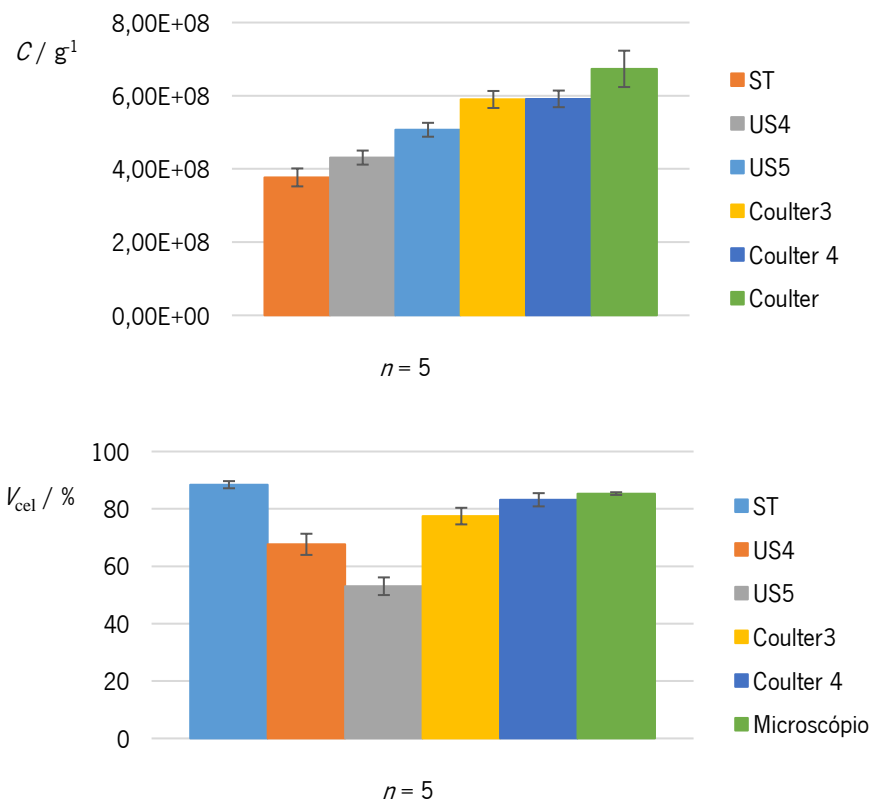
Concluiu-se a existência de uma boa concordância entre ambos os equipamentos quando utilizado o parâmetro “Coulter 4”, visto que a média das diferenças entre os dois equipamentos encontra-se próxima do valor zero, e todos os valores se encontram distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância. Em termos de viabilidade celular, foi apenas possível analisar para 3 amostras sugerindo-se no futuro aumentar o número de réplicas.

Assim, que para este tipo de amostras (*stockagem* C) o melhor parâmetro a ser utilizado no *Aber* para as suas análises, tanto em termos de concentração celular e de viabilidade celular, será o parâmetro “Coulter 4”, que possui as seguintes especificações: Min\_Size = 2,7  $\mu\text{m}$ ,

Max\_Size = 8  $\mu\text{m}$ , Alive\_Dead = 0,1, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

### 16.2. Amostras de levedura D em *stockagem*

Do mesmo modo que se analisaram as amostras de levedura C em *stockagem*, o mesmo se procedeu para as amostras de levedura D em *stockagem*. Assim, na Figura 30, estão apresentados os histogramas de comparação entre equipamentos utilizando parâmetros diferentes para medir a concentração celular e a viabilidade celular da levedura D.



**Figura 30** – Concentração celular ( $C$ ) e viabilidade celular ( $V_{\text{cel}}$ ) na *stockagem* D, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

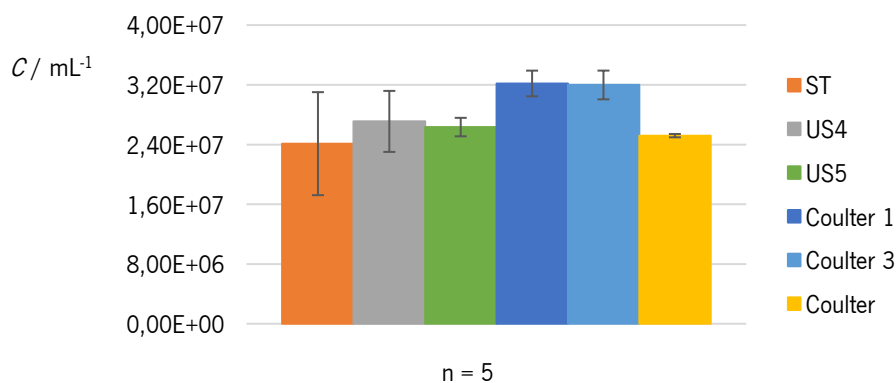
Na análise da Figura 30, onde se efetuou o estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular na *stockagem* D com diferentes parametrizações, concluiu-se o mesmo que no subcapítulo 16. Os parâmetros que se aproximaram do valor obtido pelo *Coulter* foram aqueles que continham uma especificação para o diâmetro igual à pré-definida no *Coulter* (2,7  $\mu\text{m}$  a 8  $\mu\text{m}$ ), isto é, os parâmetros "Coulter 3" e "Coulter 4". No caso do estudo da capacidade do *Aber* para medir a viabilidade celular com diferentes parametrizações, verificou-se que os parâmetros que se

aproximaram mais do valor obtido pelo microscópio foram “ST, Coulter 3 e Coulter 4”, tendo sido o “Coulter 4” o mais próximo.

Concluiu-se assim que, para este tipo de amostras (*stockagem* D), o melhor parâmetro a ser utilizado no *Aber* para as suas análises, tanto em termos de concentração celular como de viabilidade celular, é o “Coulter 4” que possui as seguintes especificações: Min\_Size = 2,7  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 8  $\mu\text{m}$ , Alive\_Death = 0,1, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não. No entanto, a suportar esta escolha, deveria ter-se analisado pelo menos mais duas amostras de *stockagem* D com o parâmetro “Coulter 4”, de forma comprovar se seria o melhor parâmetro e quantificar a concordância entre os equipamentos pelo método *Bland Altman*, tal como se efetuou para a *stockagem* C. Contudo, isto não foi possível efetuar, visto que a produção da cerveja D não é feita periodicamente, levando à falta de amostragens deste tipo de levedura em fase de *stockagem*. Como sugestão de melhoria, dever-se-á realizar este estudo mais aprofundadamente.

### 16.3. Cerveja com levedura C – Cerveja C

De forma a encontrar o melhor parâmetro, executaram-se testes de tentativa-erro com vários parâmetros selecionados, para após várias leituras escolher o valor que se aproximava mais do método atualmente utilizado pela empresa, o *Coulter*. Na Figura 31, é apresentado este mesmo ensaio para o tipo de cerveja C, onde é usado o tipo de levedura C na sua produção.



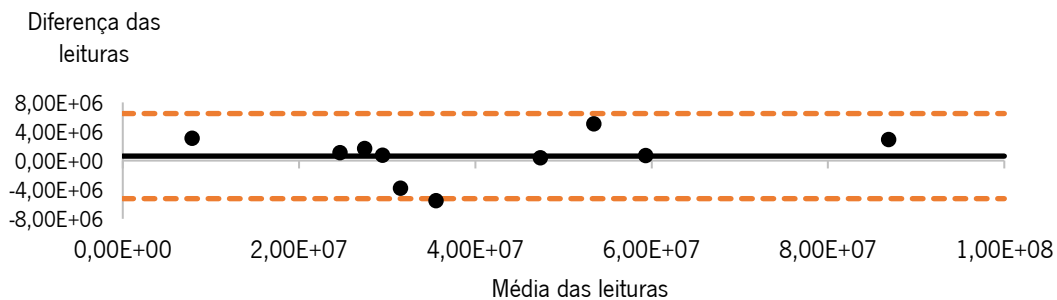
**Figura 31** – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja C, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Verificou-se que os valores que se aproximaram do valor da concentração celular obtido pelo *Coulter*, de uma amostra de cerveja C em fase de fermentação, foram os parâmetros “ST, US3 e

US5”. Efetuou-se, ainda, a análise ANOVA e verificou-se a existência de diferenças significativas de leitura ( $p_{\text{value}} < 0,05$ ). Posto isto, realizou-se o teste *Post-hoc*, e denotaram-se diferenças significativas entre os valores obtidos utilizando os parâmetros “US5 e Coulter” e os restantes valores.

Depreendeu-se assim, que para este tipo de amostras (cerveja C) o melhor parâmetro a ser utilizado no *Aber* para as suas análises, tanto em termos de concentração celular, é o parâmetro “Standard” que possui as seguintes especificações: Min\_Size = 5  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 15  $\mu\text{m}$ , Alive\_Dead = 0,5, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

De forma a verificar a existência de concordância entre o *Coulter* e o *Aber* utilizando apenas o parâmetro “Standard”, procedeu-se à análise do gráfico *Bland Altman*, o qual está apresentado na Figura 32. Neste gráfico foram incluídas análises da concentração celular de dez amostras de cerveja C em fermentação utilizando apenas o parâmetro “Standard” no *Aber*.



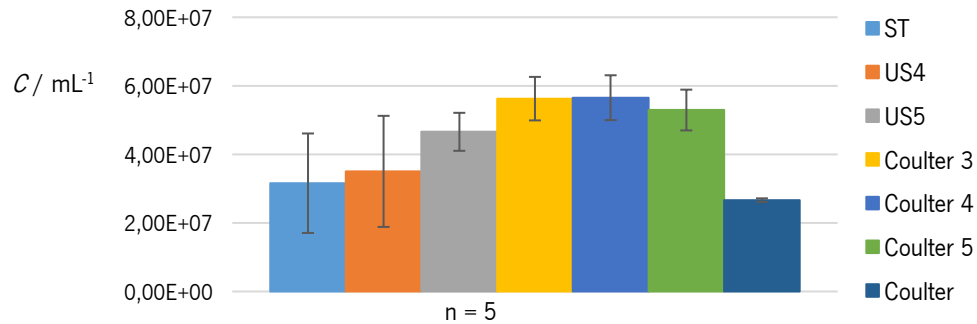
**Figura 32** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular (*C*) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja C em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Standard”.

Concluiu-se, que existe uma boa concordância entre ambos os equipamentos quando utilizado o parâmetro “Standard”, visto que a média das diferenças da concentração celular analisada entre os dois equipamentos encontrava-se próxima do valor zero no eixo dos *YY*, e todos os valores encontravam-se distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância.

#### 16.4. Cerveja com levedura C – Cerveja C sem álcool

O estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular na cerveja C sem álcool em fase de fermentação e com diferentes parametrizações, está apresentado na Figura 33.



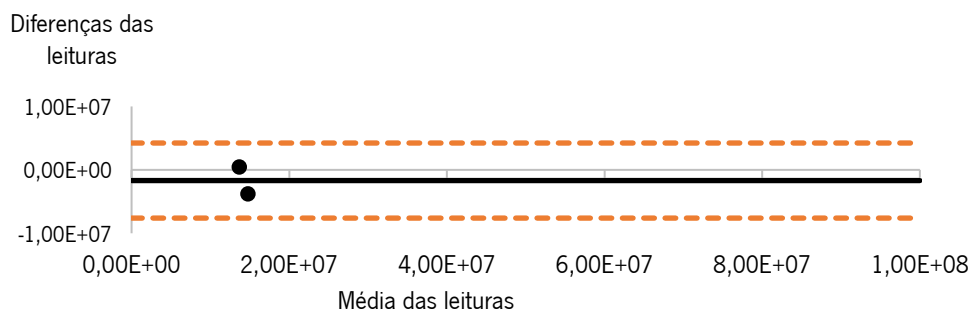


**Figura 33** –Concentração celular ( $C$ ) na cerveja C sem álcool, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Os parâmetros que se aproximaram do valor obtido pelo *Coulter* foram os parâmetros “ST e US4”, sendo o parâmetro “ST” o parâmetro que apresentou um valor mais próximo [Aber ST,  $(3,16 \times 10^7 \pm 1,45 \times 10^7)$  mL<sup>-1</sup>; Coulter,  $(2,67 \times 10^7 \pm 5,14 \times 10^5)$  mL<sup>-1</sup>], aproximadamente 30 milhões de células). Contudo, procedeu-se à análise ANOVA e ao teste *Post hoc* e concluiu-se o mesmo, que só não existiram diferenças significativas em relação ao *Coulter* quando comparado com os parâmetros ST e US4.

Assumiu-se assim que, para este tipo de amostras (Cerveja C sem álcool), “ST” é o melhor parâmetro a ser utilizado no *Aber* para as suas análises em termos de concentração celular, com as seguintes especificações: Min\_Size = 5  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 15  $\mu\text{m}$ , Alive\_Dead = 0,5, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

No entanto, de forma a ter certeza nesta escolha, quantificou-se a concordância entre os equipamentos pelo método *Bland Altman*, para duas amostras de cerveja C sem álcool em fase de fermentação, cujo gráfico é apresentado na Figura 34.

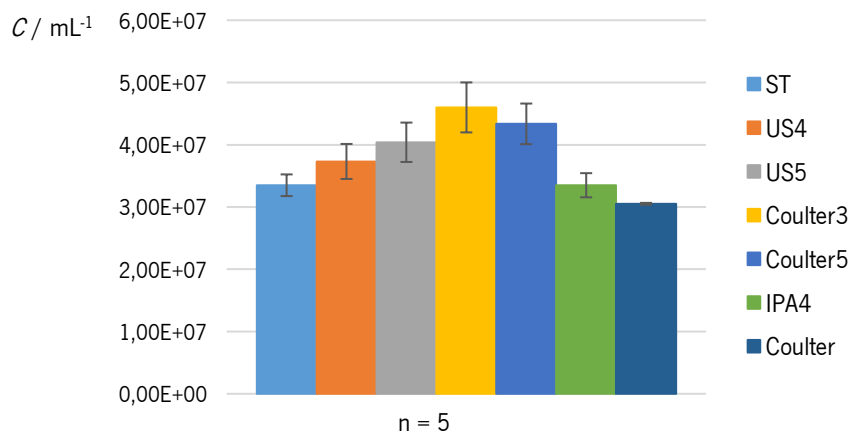


**Figura 34** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja C sem álcool em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Standard”.

Utilizando o parâmetro “Standard” no *Aber*, demonstrou-se uma boa concordância entre as leituras efetuadas neste equipamento e entre o *Coulter*, visto que a média das diferenças entre os dois equipamentos encontrava-se próxima do valor zero, e todos os valores encontravam-se distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância. Contudo, esta análise foi apenas possível efetuar para duas amostras, devido à falta de amostragens deste tipo de cerveja, sendo aconselhado futuramente realizar o mesmo para mais amostras.

### 16.5. Cerveja com levedura C – Cerveja G

Para o caso da cerveja G, procedeu-se ao mesmo estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular com diferentes parametrizações, sendo este apresentado na Figura 35.

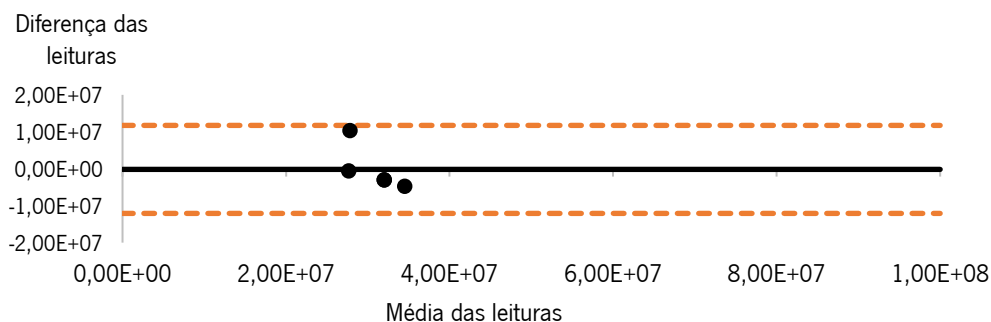


**Figura 35** – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja G, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Segundo a análise ANOVA, verificou-se a existência de diferenças significativas entre as diversas leituras, e através do teste *Post hoc* denotou-se que apenas existem diferenças significativas em relação ao *Coulter* para os parâmetros “US5”, “Coulter 3” e “Coulter 5”. No entanto, observando a Figura 35 o parâmetro que se aproximou mais do valor obtido pelo *Coulter* é o “Standard”.

Para este tipo de amostras (Cerveja G), o “ST” é o melhor parâmetro a ser utilizado no *Aber* para as suas análises em termos de concentração celular, com as seguintes especificações: Min\_Size = 5  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 15  $\mu\text{m}$ , Alive\_Death = 0,5, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

Para além disto, quantificou-se a concordância entre os equipamentos pelo método *Bland Altman*, para quatro amostras de cerveja G em fase de fermentação, de forma a decidir-se com firmeza que o melhor parâmetro é o “Standard”, sendo esta análise ilustrada na Figura 36.

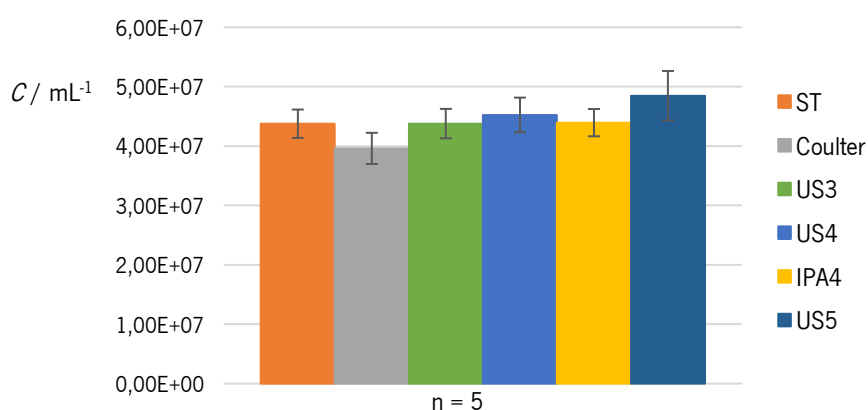


**Figura 36** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja G em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Standard”.

Observando a Figura 36, pode-se afirmar com certeza que o melhor parâmetro a utilizar nas leituras de amostras de cerveja G é o “Standard”, visto que existe uma boa concordância entre ambos os equipamentos pois a média das diferenças da concentração celular analisada entre os dois equipamentos, encontrava-se próxima do valor zero no eixo dos  $YY$ , e todos os valores encontravam-se distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância.

#### 16.6. Cerveja com levedura C – Cerveja F

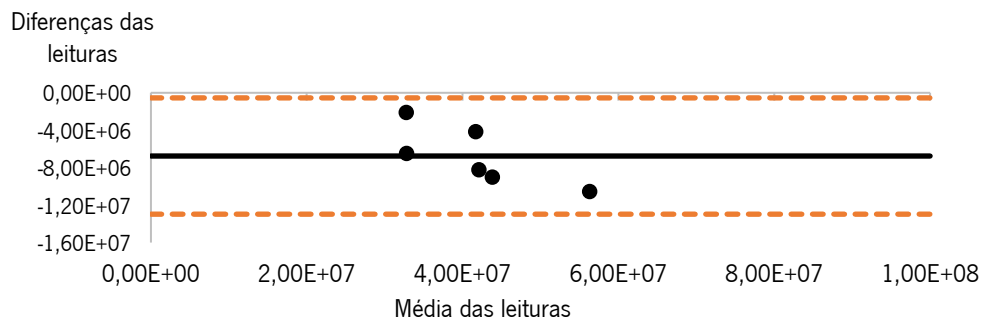
Do mesmo modo que se procedeu para as restantes cervejas, a cerveja F não foi exceção, e na Figura 37 está apresentado o estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular utilizando várias parametrizações.



**Figura 37** – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja F, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

No caso da cerveja F, em todas as amostras analisadas, o valor obtido no *Coulter* apresentou sempre um valor um pouco inferior aos restantes parâmetros testados. Na Figura 37, é apresentado apenas um exemplo da análise de uma amostra, mas o mesmo se verificou. Foi efetuada a análise ANOVA, e não se detetou a existência de diferenças significativas entre os vários parâmetros testados em relação ao valor do *Coulter*. Posto isto, assumiu-se como parâmetro ótimo, para analisar amostras de cerveja F, o “Standard”, visto que, por enquanto, para todas as cervejas onde a levedura utilizada era do tipo “C” foi escolhido este parâmetro.

Analisou-se a concordância entre o *Aber* e o *Coulter* através do gráfico *Bland Altman* apresentado na Figura 38, recorrendo para isso à leitura da concentração celular de seis amostras de cerveja F em fermentação, utilizando o parâmetro “Standard” no *Aber*.

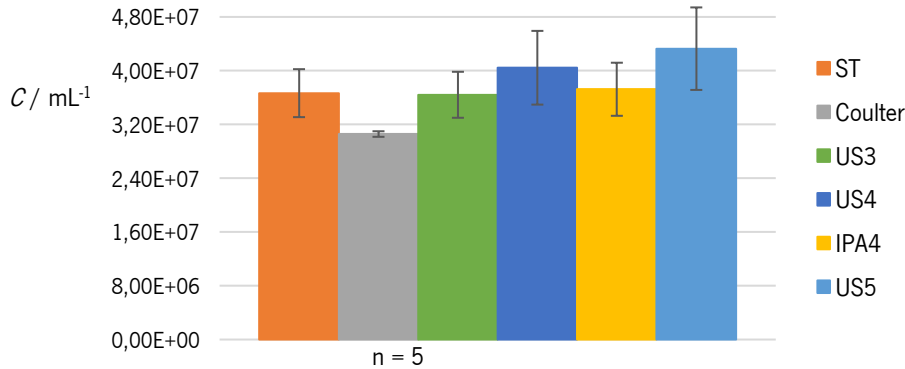


**Figura 38** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja F em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Standard”.

O método *Bland Altman* calcula a diferença média entre dois métodos de medição, e os intervalos de concordância com 95 % de confiança. No entanto, observando a Figura 38, todos os valores encontram-se dentro dos limites de concordância, mas não estão distribuídos aleatoriamente perto do valor zero do eixo dos  $YY$ , o que significa que existem diferenças de leitura entre os dois equipamentos. Contudo, o problema poderá estar associado à leitura no *Coulter*, visto que o valor da concentração celular obtido neste equipamento foi sempre inferior aos valores obtidos no *Aber* utilizando parametrizações diferentes. Apenas se variou a especificação do diâmetro e a especificação do contraste, pois eram os únicos fatores que poderiam ter interferência na análise das amostras. Sugere-se assim, como oportunidade de melhoria a realização deste estudo mais aprofundado.

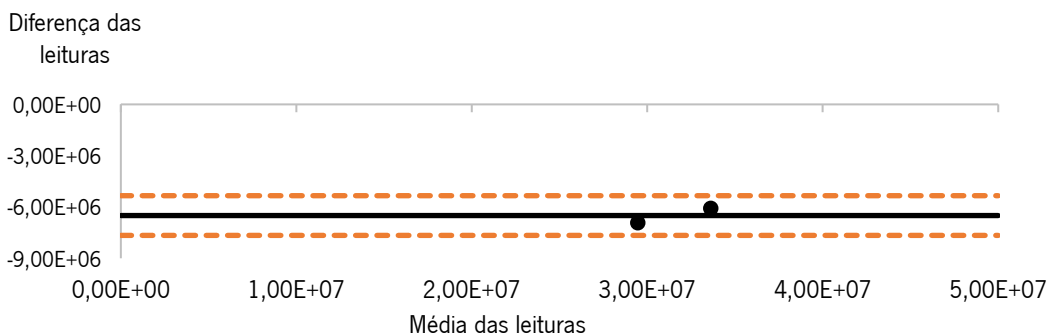
16.7. Cerveja com levedura C – Cerveja H

Na Figura 39, encontra-se o estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular com diferentes parametrizações para o tipo de cerveja H.



**Figura 39** – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja H, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Tal como aconteceu para a cerveja F, o mesmo se verificou para cerveja H, onde os valores obtidos no *Coulter* foram sempre inferiores aos valores obtidos pelas outras parametrizações no *Aber*. Na Figura 39 apresenta-se um exemplo de análise deste tipo de cerveja. Apenas os parâmetros "US4" e "US5" apresentam diferenças estatísticas ( $p_{\text{value}} < 0,05$ ) relativamente ao *Coulter*. Assumiu-se como parâmetro ótimo para as leituras da concentração celular deste tipo de cerveja o parâmetro "Standard", e fez-se *a posteriori* uma análise da concordância entre os valores obtidos no *Coulter* e no *Aber* (utilizando este parâmetro), como se pode observar na Figura 40.

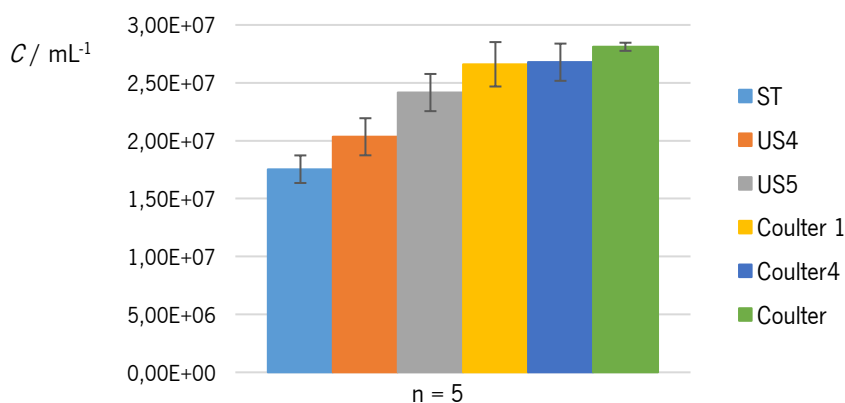


**Figura 40** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja H em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro "Standard".

Observando a Figura 40, todos os valores se encontram-se dentro dos limites de concordância, mas não estão distribuídos aleatoriamente perto do valor zero do eixo dos  $YY$ , o que significa que existem diferenças de leitura entre os dois equipamentos. Contudo, o problema poderá estar associado à leitura no *Coulter* pela mesma razão mencionada anteriormente para o tipo de cerveja F (Figura 38), sugerindo a realização de mais leituras para este tipo de cerveja.

### 16.8. Cerveja com levedura C – Cerveja I

Por fim, para o último tipo de cerveja, a cerveja I, que utiliza como base a levedura do tipo C, é apresentado na Figura 41, o estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular com diferentes parametrizações.

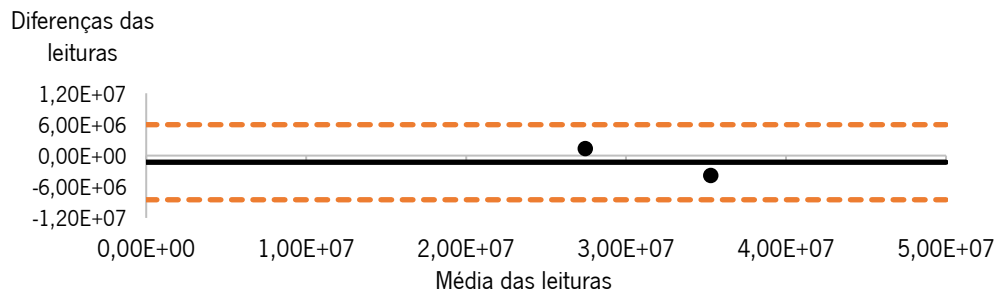


**Figura 41** – Concentração celular ( $C$ ) na cerveja I, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Por exceção, neste caso, observou-se que os parâmetros que se aproximaram do valor obtido pelo *Coulter* foram os parâmetros “Coulter 1” e “Coulter 4”, e segundo a análise ANOVA apenas os valores de concentração celular obtidos pelo *Aber* usando os parâmetros “ST e US4” apresentaram diferenças significativas em relação ao *Coulter* ( $p_{\text{value}} < 0,05$ ). Posto isto, considerou-se como melhor parâmetro para analisar este tipo de levedura, o “Coulter 4”. Da mesma forma que se procedeu para os diversos tipos de cervejas anteriormente mencionadas, na Figura 42 está representada a análise de concordância entre o *Aber* e o *Coulter*, usando o parâmetro “Coulter 4”.

Utilizando o parâmetro “Coulter 4” no *Aber* demonstrou-se uma boa concordância entre as leituras efetuadas neste equipamento e entre o *Coulter*, visto que a média das diferenças entre os dois equipamentos encontrava-se próxima do valor zero, e todos os valores encontravam-se distribuídos

aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância. Contudo, esta análise foi apenas possível efetuar para duas amostras devido à falta de amostragens deste tipo de cerveja, sendo aconselhado, futuramente, realizar a mesma análise para mais amostras.

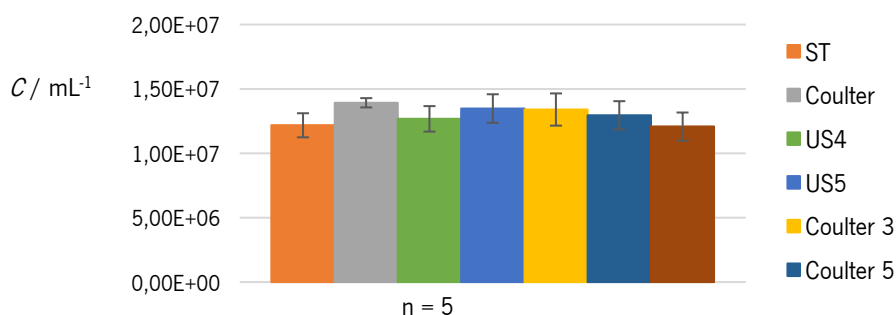


**Figura 42** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para o tipo de cerveja I em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Coulter 4”.

Resumidamente, para amostras em fermentação de vários tipos de cerveja que utilizam a levedura C foi encontrado o parâmetro “Standard” como ótimo para analisar este tipo de amostras, exceto para o tipo de cerveja I, onde “Coulter 4” se revelou mais apropriado. Todavia, em alguns tipos de amostras é aconselhável uma análise mais aprofundada com mais amostragens, de forma a assumir com certeza que estes são os parâmetros ótimos de leitura no *Aber*.

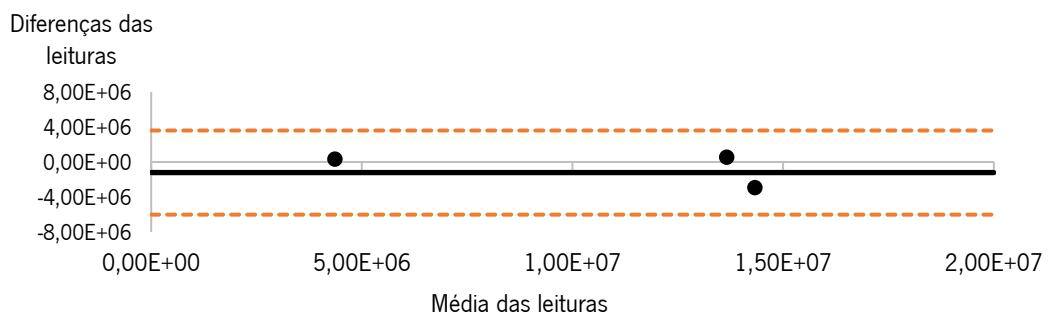
### 16.9. Cerveja com levedura A

A análise da concentração celular de amostras de levedura A foi feita através do *Coulter* e do *Aber* com diferentes parametrizações, estando estes valores apresentados na Figura 43.



**Figura 43** – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de levedura A, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Para este tipo de levedura (A) verificou-se a ausência de diferenças significativas. No entanto, verificou-se anteriormente, no ensaio da validação da resposta analítica do *Aber* para diferentes leveduras, que utilizando o parâmetro “Standard” não havia uma excelente concordância entre o *Aber* e o *Coulter*. Assim, optou-se por adotar outro parâmetro, de forma a que os valores da concentração celular fossem muito próximos. Com isto, escolheu-se o parâmetro “Coulter 3” e analisou-se a concordância entre os dois equipamentos através do gráfico *Bland Altman*, apresentado na Figura 44.



**Figura 44** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular (*C*) entre o *Aber* e o *Coulter* para amostras de levedura A em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Coulter 3”.

Observando a Figura 44, averiguou-se que existe uma boa concordância entre as leituras efetuadas no *Coulter* e no *Aber* utilizando o parâmetro “Coulter 3”, visto que a média das diferenças entre os dois equipamentos se encontra próxima do valor zero, e todos os valores se encontram distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância. Contudo, esta análise foi apenas possível efetuar para três amostras, sendo aconselhado futuramente realizar o mesmo para mais amostras.

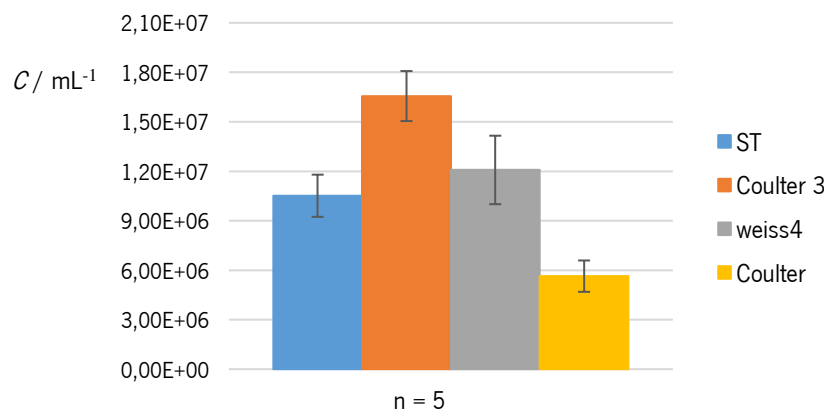
#### 16.10. Cerveja com levedura B

Neste caso, comparou-se a concentração celular para o tipo de levedura B, onde foram testados vários parâmetros, sendo apresentados na Figura 45 apenas 3 deles: “ST, Coulter 3 e Weiss 4”.

Para este caso da levedura do tipo B, verificou-se, através da Figura 45, que existe alguma discrepância entre os vários parâmetros utilizados no *Aber* e o valor obtido no *Coulter*, não tendo sido possível encontrar um parâmetro ótimo de análise deste tipo de amostras. Estas discrepâncias entre o *Aber* o *Coulter*, tal como já foi mencionado anteriormente, são normais acontecerem para uma levedura deste tipo, pois esta agrega-se muito facilmente provocando erros



de leitura no *Coulter*, no microscópio e no *Aber*. Para este tipo de levedura, foram testados vários parâmetros tendo-se variado, entre eles, a especificação de diâmetro, o “Alive\_Dead”, o “Grey\_contrast” e o “overlap”, e mesmo assim, o valor que se aproximou mais do valor do *Coulter* foi sempre o parâmetro “Standard”.



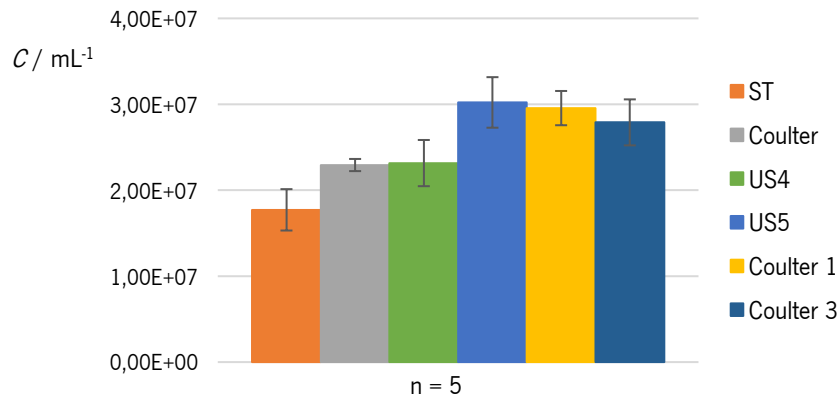
**Figura 45** – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de levedura B, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

No ensaio da validação da resposta analítica do *Aber* para diferentes leveduras, efetuado no capítulo 14, denotou-se que os valores analisados no *Aber* e no microscópio, utilizando o parâmetro “Standard”, foram concordantes, exceto um valor que se encontrava fora do intervalo de concordância, mas muito próximo do limite superior. Verificou-se ainda que, entre *Aber* e o *Coulter*, apesar de não se ter verificado uma tendência linear, uma concordância de leitura nos dois equipamentos. Contudo, o intervalo de concordância obtido entre o *Aber* e o *Coulter* foi superior em relação ao intervalo de concordância obtido entre o *Aber* e o microscópio, havendo com isto, uma maior igualdade de leituras entre o *Aber* e o microscópio, podendo para este tipo de levedura o *Coulter* não ser o melhor equipamento de análise.

Visto que, entre o *Aber* e o microscópio se obteve uma boa correlação apresentando um coeficiente de correlação de 0,971 e, uma boa concordância entre eles, pode-se considerar o parâmetro "ST" como o mais adequado para a análise de concentração celular neste tipo de amostras.

## 16.11. Cerveja com levedura D

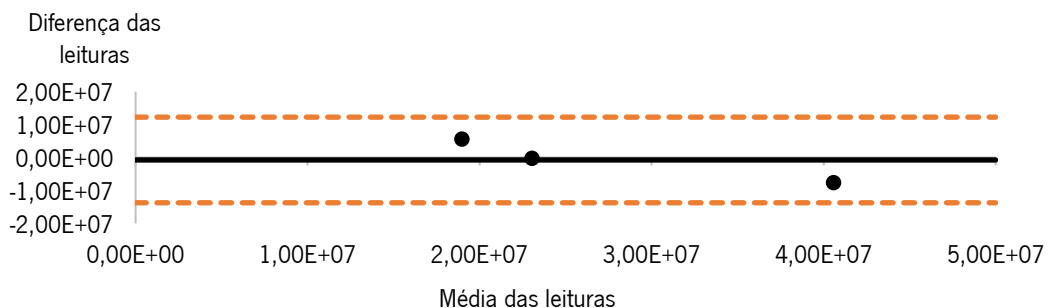
Na Figura 46, está apresentado o histograma de comparação entre equipamentos utilizando parâmetros diferentes para medir a concentração celular de amostras de cerveja com levedura D em fermentação.



**Figura 46** – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de cerveja com levedura D, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Segundo a análise ANOVA e recorrendo de seguida ao teste *Post-hoc*, verificou-se que existem diferenças significativas em relação ao *Coulter* para os parâmetros US5, Coulter 1 e Coulter 3. Contudo, observando a Figura 46 denotou-se que o parâmetro “US4” foi o que se apresentou mais próximo do valor obtido pelo *Coulter* para a concentração celular deste tipo de amostras.

De forma a ter firmeza na escolha do parâmetro US4 como ótimo, quantificou-se a concordância entre o *Coulter* e o *Aber* usando este parâmetro através do gráfico *Bland Altman* apresentado na Figura 47.



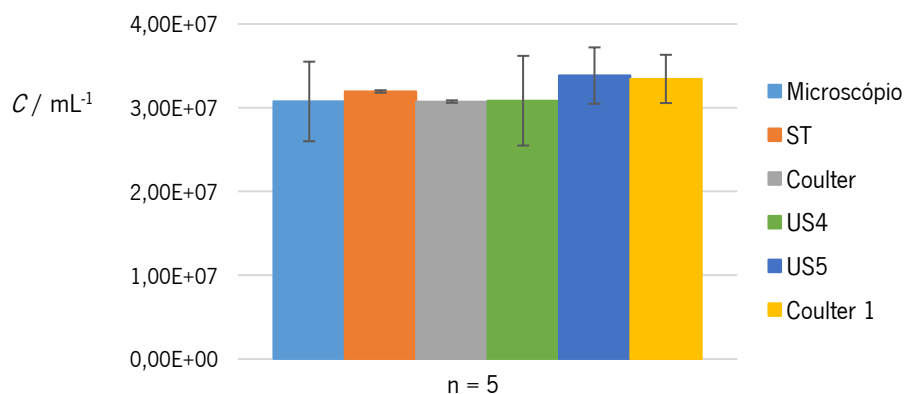
**Figura 47** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular ( $C$ ) entre o *Aber* e o *Coulter* para amostras de cerveja D em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “US4”.

Segundo o método *Bland Altman*, verificou-se que existe concordância entre os dois equipamentos quando utilizado o parâmetro US4 visto que todos os valores se encontravam dentro dos intervalos de concordância e perto do valor zero da média das diferenças. Apenas foi possível analisar para três amostras sugerindo como melhoria futura a análise de mais amostras.

Assumiui-se assim que, para este tipo de amostras (Cerveja D), o parâmetro “US4” do *Aber* é aquele que deve ser usado para a determinação da concentração celular, com as seguintes especificações: Min\_Size = 3  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 13  $\mu\text{m}$ , Alive\_Dead = 0,5, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

### 16.12. Sidra E

Por fim, para amostras de sidra E efetuou-se a mesma análise da concentração celular recorrendo ao *Coulter* e ao *Aber*, e com diferentes parametrizações, sendo apresentados os valores obtidos na Figura 48.

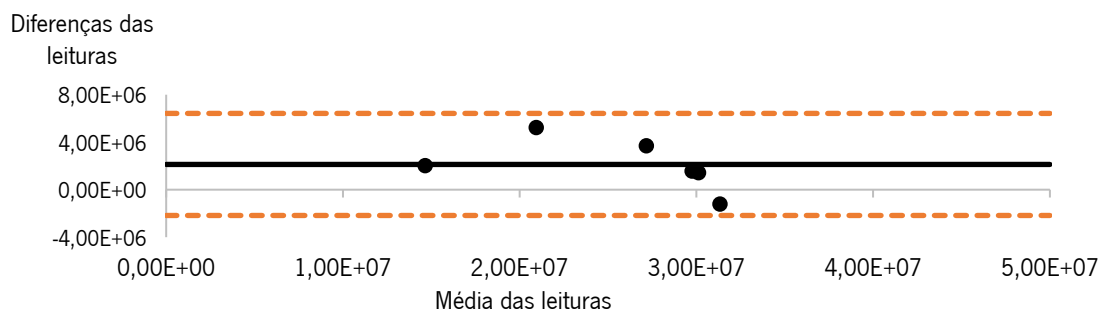


**Figura 48** – Concentração celular ( $C$ ) de amostras de sidra E, medida no *Aber* com diferentes parametrizações ( $n = 5$ ). As barras representam o erro associado à média ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ).

Através do estudo da capacidade do *Aber* de medir a concentração celular na Sidra E com diferentes parametrizações (Figura 48), concluiu-se que não existem diferenças significativas de leitura, pelo que qualquer parâmetro poderia ser usado na análise da concentração celular. No ensaio da validação da resposta analítica do *Aber* para diferentes leveduras efetuado no capítulo 14 denotou-se que os valores analisados no *Aber* e no microscópio, utilizando o parâmetro “Standard”, foram concordantes, e que entre o *Aber* e o *Coulter*, e entre o *Coulter* e o microscópio, apesar de não se ter verificado uma tendência linear, verificou-se que existe uma concordância de

leitura entre os equipamentos. Assumiu-se assim, para este tipo de amostras (Sidra E), o parâmetro “ST” no *Aber* é o melhor parâmetro a utilizar nas análises da concentração celular, com as seguintes especificações: Min\_Size = 5  $\mu\text{m}$ , Max\_Size = 15  $\mu\text{m}$ , Alive\_Dead = 0,5, Grey\_Contrast = 7, Overlap = Não.

No entanto, de forma a ter certeza nesta escolha, quantificou-se a concordância entre os equipamentos pelo método *Bland Altman*, para seis amostras de Sidra E em fase de fermentação, onde é apresentado na Figura 49 este mesmo gráfico.



**Figura 49** – Gráfico da concordância da leitura da concentração celular (*C*) entre o *Aber* e o *Coulter* para amostras de sidra E em fermentação e utilizando no *Aber* o parâmetro “Standard”.

Utilizando o parâmetro “ST” no *Aber*, demonstrou-se uma boa concordância entre as leituras efetuadas neste equipamento e entre o *Coulter*, visto que a média das diferenças entre os dois equipamentos encontra-se próxima do valor zero, e todos os valores se encontram distribuídos aleatoriamente perto do valor zero e dentro dos limites de concordância.

### 16.13. Considerações finais

Apresenta-se na Tabela 7 um resumo das diluições necessárias a efetuar e os melhores parâmetros a utilizar no *Aber*, variando estes, consoante o tipo de levedura a analisar e da fase do processo de fabrico em que se situa.

Sucintamente, observou-se que o parâmetro com melhores resultados foi o “Standard”, e que, amostras em fase de fermentação foi onde se detetou mais variabilidade, visto que nesta fase as leveduras não se encontram morfológicamente iguais. O fator de diluição também é um parâmetro a ter em consideração, já que a gama de concentrações é diferente para cada fase do processo fermentativo e diferente para cada tipo de levedura, pois estas não se multiplicam da mesma

maneira e com a mesma rapidez. *A posteriori*, caso a validação do equipamento seja aprovada pela empresa, isto será necessário para a execução dos POS e dos MCQ's, de forma a facilitar o seu uso por operários diferentes.

**Tabela 7** – Quadro resumo do melhor parâmetro a utilizar no *Aber* para cada amostra a ser analisada na empresa, bem como a respetiva diluição

Fase do processo	Tipo de amostra	Parâmetro	Fator de diluição
<i>stockagem</i>	Levedura C	Coulter 4	500*
	Levedura D	Coulter 4	100
Propagação	Levedura A	Standard	10
	Levedura B	Standard	2
	Levedura C	Standard	5 – (1. <sup>a</sup> propagação); 10 – (2. <sup>a</sup> propagação); 100 – (Antes TF)
	Levedura D	Standard	20
Fermentação	Cerveja C	Standard	50
	Cerveja C sem álcool	Standard	50
	Cerveja G	Standard	50
	Cerveja F	Standard	50
	Cerveja H	Standard	50
	Cerveja I	Coulter 4	20
	Cerveja A	Coulter 3	10
	Cerveja B	Standard	5
	Cerveja D	US4	10
	Sidra E	Standard	50

\*No *Aber* o fator de diluição de 500 aparece "1:500".

O *Coulter* é um equipamento presente na empresa há mais de 15 anos. No entanto, não permite distinguir entre células únicas e em *budding* (em gemulação), e entre agregados celulares ou outra sujidade presente. Portanto, as leveduras devem ser analisadas primeiro quanto à sua morfologia celular, por observação microscópica, sendo, no entanto, uma desvantagem em termos de tempo despendido para estas análises. Contudo, a substituição de um equipamento merece um cuidado especial, visto que pode provocar alterações na produção e na produtividade da cerveja, pois a análise da viabilidade celular e da contagem de células é essencial durante todo o processo de fermentação, de forma a garantir fermentações consistentes e cerveja de qualidade.

Para além da validação do equipamento, é necessário informar os operários dos cuidados a ter

com a recolha das amostras, pois podem ter influência nas análises. As amostras de propagação e de fermentação são colocadas em frascos com sulfato de cobre para proceder depois à análise da concentração celular. O sulfato de cobre funciona como inibidor do crescimento da levedura logo, uma quantidade incorreta de sulfato de cobre no frasco de recolha da amostra pode acarretar a que não ocorra inibição do crescimento da levedura, e provocar erros de leitura *a posteriori*. A incorreta higienização da torneira de recolha de amostras pode potenciar o desenvolvimento de leveduras selvagens ou outro tipo de microrganismos e, desta forma afetar a contagem de células de levedura. Neste trabalho, não houve crescimento de leveduras selvagens em nenhuma das amostras de *stockagem* analisadas. As análises microbiológicas efetuadas, não revelaram a presença de contaminantes. A fraca homogeneização da amostra pode implicar uma análise não representativa da população. As soluções preparadas para as análises não devem ser muito concentradas, pois pode ocorrer o erro de coincidência, ou seja, a contagem de duas ou mais células como apenas uma, nem devem ser muito diluídas pois podem fornecer contagens erradas.

## **IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO**

Este capítulo sintetiza, de forma breve, o trabalho laboratorial descrito no presente documento. O capítulo IV apresenta, portanto, as principais e mais relevantes conclusões e, ainda, incluídas por vontade própria, algumas ideias e sugestões que visam um estudo mais completo e aprofundado desta matéria, conduzindo a futuras melhorias e, até a obter respostas adicionais.

Para que a etapa de fermentação do processo de produção de cerveja ocorra sem problemas, de forma a não prejudicar economicamente a empresa, são necessários resultados exatos e expeditos de contagem celular e de viabilidade celular de suspensões de levedura. Assim, a implementação do autocontrolo surge para que as empresas consigam obter os resultados referentes a variáveis processuais importantes de forma rápida, quando não dispõem de tecnologias mais avançadas que permitam a sua determinação *online*.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi demonstrado que as medições no *Aber* foram comparáveis às contagens no microscópio ótico, mas também foram mais repetíveis e consistentes. Nos diversos ensaios comparativos entre os equipamentos, *Aber*, *Coulter* e microscópio ótico, apenas se verificaram diferenças significativas entre o *Aber* e o *Coulter*, quando utilizado o parâmetro “Standard” no *Aber*. Também se verificou que existem diferenças significativas de leitura, em termos de concentração celular, quando aplicados fatores de diluição diferentes. Em contrário, para a análise da viabilidade celular, quando aplicados fatores de diluição diferentes, não se verificaram diferenças significativas de leitura.

Denotou-se, que para amostras em propagação, as medições no *Aber* (usando o parâmetro “Standard”) foram comparáveis às contagens no *Coulter* e no microscópio ótico. Contudo, para amostras em fermentação, as medições no *Aber* (usando o parâmetro “Standard”) foram comparáveis às contagens no *Coulter* e no microscópio apenas no tipo de levedura B, D e E. No caso da levedura A e C, as medições no *Aber* foram apenas comparáveis às contagens no microscópio ótico, necessitando de otimizações no *Aber*, de forma a não apresentar discrepância em relação ao *Coulter*. Já no caso de amostras de *stockagem*, verificou-se que em termos de concentração celular, utilizando o parâmetro “Standard”, houve discrepâncias de leitura em comparação com o valor obtido no *Coulter*.

Os parâmetros a utilizar no *Aber* foram otimizados, a fim de não se verificarem diferenças significativas de leitura entre este e o *Coulter* para possível substituição do *Coulter* e do microscópio pelo *Aber*. Foi encontrado um parâmetro ótimo no *Aber* para cada tipo de amostra a analisar, bem como o respetivo fator de diluição a aplicar. Porém, para alguns tipos de amostras é aconselhável uma análise mais aprofundada com mais amostragens de forma a assumir com certeza quais são os parâmetros ótimos de leitura no *Aber*.

No âmbito do Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) recomenda-se que a empresa dê continuidade ao desenvolvimento do autocontrolo, criando assim instruções de trabalho de forma



#### IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE TRABALHO

a garantir que as contagens sejam efetuadas corretamente e de acordo com os procedimentos adequados, e à criação de condições necessárias à formação dos técnicos, que passam pela formação teórica e prática.

Por fim, é possível salientar o cumprimento dos objetivos em termos académicos e pessoais, uma vez que foi possível encontrar os melhores parâmetros a analisar no *Aber* para cada tipo de cerveja, e adquirir novos conhecimentos ao nível da qualidade e da segurança alimentar, salientando ainda uma ótima experiência em contexto industrial.

*“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”*

Albert Einstein

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aber, Aber countstar, Site oficial Aber Instruments Ltd, Aberystwyth, Reino Unido. Consultado a 8 de janeiro de 2020 em <https://aberinstruments.com/brewing/countstar/>
- Aber Trusted Technology (2015). *Countstar System User Manual*. Aber Instruments Ltd, Science Park, Aberystwyth, UK.
- Abramowitz, M. & Davidson, M. (2007). Encyclopedia of Imaging Science and Technology: *Introduction to Microscopy*. Molecular Expressions.
- ASBC Annual Meeting. Practical experiences with an automated yeast cell counter using methylene blue in breweries. *Journal Am. Soc. Brew. Chem.* (14 a 17 de junho de 2015). Obtido em <http://www.asbcnet.org/events/archives/2015Meeting/Pages/default.aspx>.
- Bamforth, C. (2003). *Beer: tap into the art and science of brewing*. Oxford University Press
- Bamforth, C. (2009). *Beer: A Quality Perspective*. Burlington: Academic Press.
- Bamforth, C. (2016). *Brewing materials and processes: A Practical Approach to Beer Excellence*. London: Academic Press.
- Bank, L. (1987). Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia*. 30, 812-816.
- Barber, R., Vojnovic, B., Kelly, J., Mayes, R., Boulton, P., Woodcock, M., & Joiner, C. (2001). Automated counting of mammalian cell colonies. *Physics. Med. Biol.* 46, 63–76.
- Beckman Coulter. (2011) Beckman Coulter Z Series: user manual 9914591-D. Florida: Beckman Coulter Incr Particle Characterization Group.
- Bond, C. (2007). Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols: Freeze-Drying of Yeast Cultures. (2nd ed.). J. G. Day and G. Stacey, Eds. Totowa: *Humana Press*. 368, 99-107.
- Bouix, M., & Leveau, Y. (2000). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* 107, 214-217.
- Boulton, C. & Quain, D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science Ltd Oxford.
- Boyd, R., Gunasekera, S., Atfield, V., Simic, K., Vincent, F., & Veal, A. (2002). A flow cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res.* 3, 11-16.
- Carr, K., Toner, P. & Saleh, K. (1982). Scanning Electron Microscopy. *Histopathology* 6, 3-24.

- Carvell, J., Turner, K. (2003) New Applications and Methods Utilizing Radio-Frequency Impedance Measurements for Improving Yeast Management. *MBAA Technical Quarterly* 40, 30-38.
- Chan, L., Wilkinson, R., Paradis, D., & Lai, N. (2012). Rapid image based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. *J. Fluores.* 22, 1301-1311.
- Chilver, J., Harrison, J., & Webb, B. (1978). Use of immunofluorescent and viability stains in quality control. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36, 13-18.
- Comas, J. & Rius, N. (2009) Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 999-1011.
- Davis, M., White, C., (1980). Fluorometric determination of adenosine nucleotide derivatives as measures of the microfouling, detrial, and sedimentary microbial biomass and physiological status. *Appl. Environ. Microb.* 40, 539-548.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L., Quirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 48, 385-407.
- Erten, H., Tanguler, H., & Cakiroz, H. (2007). The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *J. Inst. Brew.* 113, 75–79.
- Esslinger, M., & Narziss, L. (2012). Ullmann's encyclopedia of industrial Chemistry: *Beer*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Eblinger, M. (2009). *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Freiberg, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Garcia, A., Garcia, L. & Díaz, M. (1994). Modelling of diacetyl production during beer fermentation. *J. Inst. Brew.* 100, 179-183.
- Gershon, H. & Gershon, D. (2000). The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Elsevier Science.* 120, 1-22.
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica* 25(2), 141–51.
- Goodhew, P., Humphreys, F. & Beanland, R. (2001). Electron Microscopy and Analysis. *Ann. Phys.* 54, 258.

- Harris, M., Todd, W., Bungard, J., Lovitt, W., Morris, G., & Kell, B. (1987). Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimativos of microbial biomass. *Enz. Microbial Technol.* 9, 181–186.
- Hornsey, S. (1999). *Brewing*. The royal society of chemistry, Cambridge.
- Jespersen, L. & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 139–155.
- Kunze, W., & Weber, R. (2004). *Technology Brewing and Malting*. (3rd ed.) Berlím, Germany, VLB.
- Lea, A. & Piggott, J. (1995). *Fermented Beverage Production*. (2nd ed.), Boston, MA: Springer.
- Lewis, M. (2015). *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology: beer and brewing*. John Wiley & Sons.
- McLean, D., Holcomb, J., Maxwell, K., Somes, J. (2001). A novel method for quantitation of active yeast cells. *Tech. Rep.* 2, 1–5.
- Mernier, G., Piacentini, N., Tornay, R., Buffi, N., Renaud, P. (2009). Label-free sorting and counting of yeast cells for viability studies. *Procedia Chemistry* 1, 385–388.
- Microbehunter Microscopy (2020). The hemocytometer (counting chamber). Obtido a 5 de abril de 2020 em: <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber>.
- Miller, J. & Miller, J. (2010) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (6th ed.) Pearson, England.
- Moreira, M., Morais, S., Carvalho, D., Barros, A., Matos, C. & Guido, L. (2013). Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Res. Int.* 54, 382–388.
- OIV – Compendium of International Methods of Analysis, (2010), Microbiological analysis of wines and musts. Detection, Differentiation and Counting of Micro-organisms. 9, OIV-MA-AS4-01: R2010.
- Pires, E., & Brányik, T. (2015) *The Brewing Yeast*. Em: *Biochemistry of Beer Fermentation*. SpringerBriefs in biochemistry and molecular biology.
- Portaria n.º 1/96, de 3 de janeiro de 1996. Diário da República n.º 2/1996, I Série B. Ministérios da Economia e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

- Priest, F., & Campbell, I. (1999) *Brewing Microbiology* (2nd ed.) Edinburgh: International Centre for Brewing and Distilling.
- Priest, F. & Stewart, G. (2006). *Handbook of brewing*. (2nd ed.) Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. (2002). Glucose sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2, 183–201.
- Salinas, M., Rosas, J., Iborra, J., Manero, H., & Pascual, E. (1997). Comparison of manual and automated cell counts in EDTA preserved synovial fluids. Storage has little influence on the results. *Ann. Rheum. Dis.* 56, 622–626.
- Stewart, G., Hill, A., & Russell, I. (2013). 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *J. Inst. Brew.* 119, 202–220.
- Stralen, K., Jager, K., Zoccali, C. & Dekker, F. (2008). Agreement between methods. *Kidney Int.* 74, 1116–1120.
- Cruz, M., (2007). Produção de cerveja. Em *Reatores Biológicos – Fundamentos e aplicações*. J. A. Teixeira & M.M. Fonseca (Eds). Lisboa: Lidel.
- Thomson, K., Bhat, A., & Carvell, J. (2015). Comparison of a new digital imaging technique for yeast cell counting and viability assessments with traditional methods. *J. Inst. Brew.* 121, 231-237
- Tilly, R. (2010). Industrialization as an Historical Process. *European History Online* (EGO), I.d. Europeia, Ed.
- Vaughan, A., O’Sullivan, T. & Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A Review. *J. Inst. Brew.*, 111, 355-371.
- White, C. and Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Colorado: Brewers Publications.

## ANEXOS

Anexo A – Informações suplementares aos materiais e métodos	120
Anexo B – Informações suplementares aos resultados e discussão	122

## Anexo A - Informações suplementares aos materiais e métodos

### A.1. Protocolo padrão de contagem de células

A câmara de *Neubauer* possui duas áreas de contagem. É dividida em nove retículos, sendo oito laterais e um central interno. Os retículos laterais dos extremos são divididos em dezasseis quadrados pequenos tendo cada um 0,25 mm de lado. O retículo central interno está dividido em 25 quadrados mais pequenos de 0,2 mm de lado. Esses quadrados mais pequenos encontram-se ainda divididos em 16 quadradinhos de 0,05 mm de lado. Como a altura da câmara é 0,1 mm, então o volume de cada quadradinho é  $0,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ .

As células de levedura foram contadas em todos os 25 quadrados, isto é, em todo o retículo central interno (método de contagem longa, para células desigualmente distribuídas) (White and Zainasheff, 2010).

As células que tocam ou se sobrepõem nas linhas delimitantes do retículo de cima e do lado direito não são contadas, como exemplificado na Figura A.1 com uma cruz. Os pontos azuis representam células únicas.

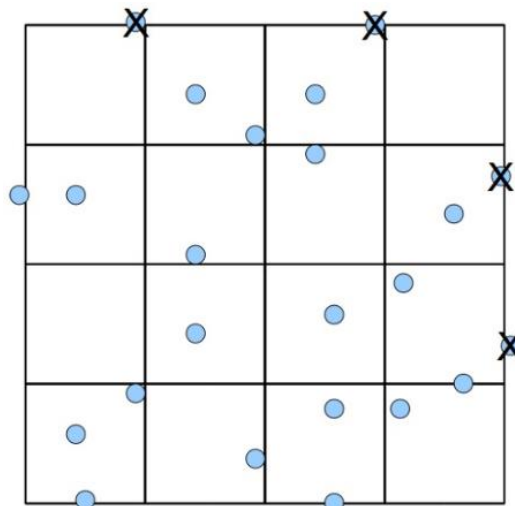


Figura A. 1. – Técnica padrão de contagem (Retirado de “Microbehunter Microscopy, 2020”).

As células que se dividem por *budding* são contadas como uma célula se o tamanho da célula filha for menor que a metade do tamanho da célula mãe. Se o tamanho da célula filha for mais da metade do tamanho da célula mãe, as duas células serão contadas.



## A.2. Preparação da solução de azul de metileno

A solução de azul metileno foi preparada a partir de uma solução de mãe. Esta solução mãe é reservada num frasco escuro, no qual 100 g de azul metileno em pó são diluídos com 10 mL de água destilada. Para a solução diluída de azul de metileno são pesados 1 g de citrato trissódico anidro ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) ou 1,14 g de citrato trissódico dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), adicionam-se 50 mL de água destilada e 0,5 mL de solução mãe previamente preparada. Estando a solução de azul metileno pronta a ser usada, guarda-se dentro de um frasco escuro, e protegido da luz e da humidade, tal como se observa na Figura A.2.

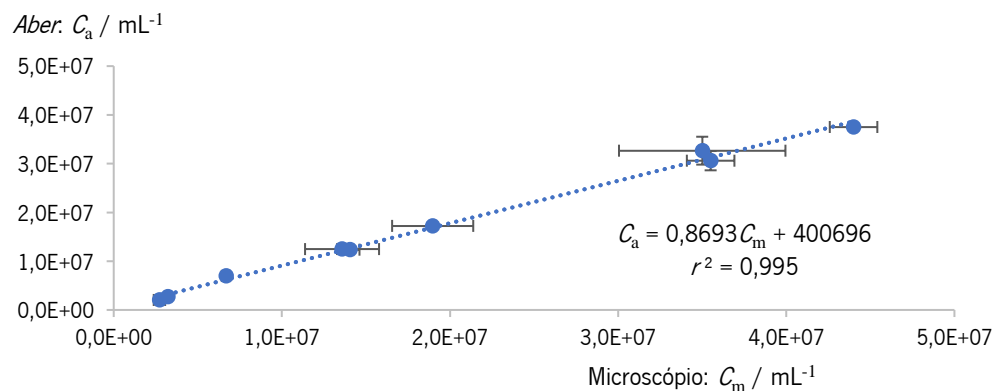


**Figura A. 2.** – Solução de azul metileno armazenada num frasco escuro.

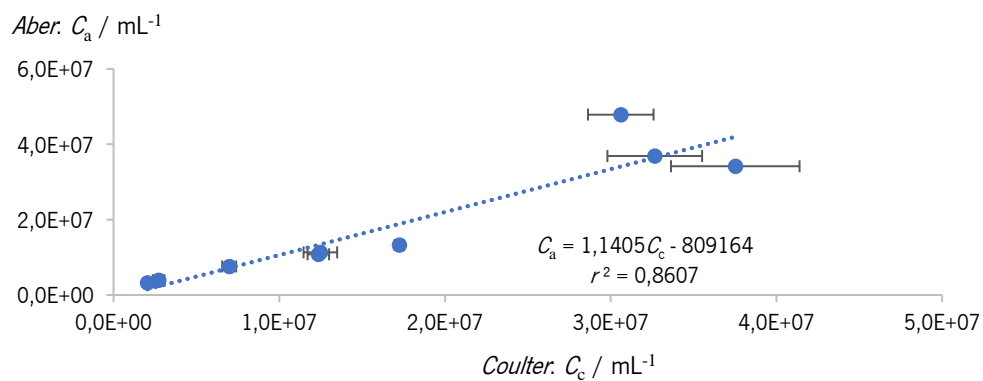
## Anexo B - Informações suplementares aos resultados e discussão

No ensaio da capacidade do *Aber* foram analisadas várias leveduras (A, B, C, D e E), desde a propagação até à fase final da fermentação, no microscópio, no *Aber*, e no *Coulter*, para fins de comparação. Foi efetuada uma análise de regressão, apresentada nas Figuras abaixo, bem como uma análise de concordância através do método *Bland Altman*.

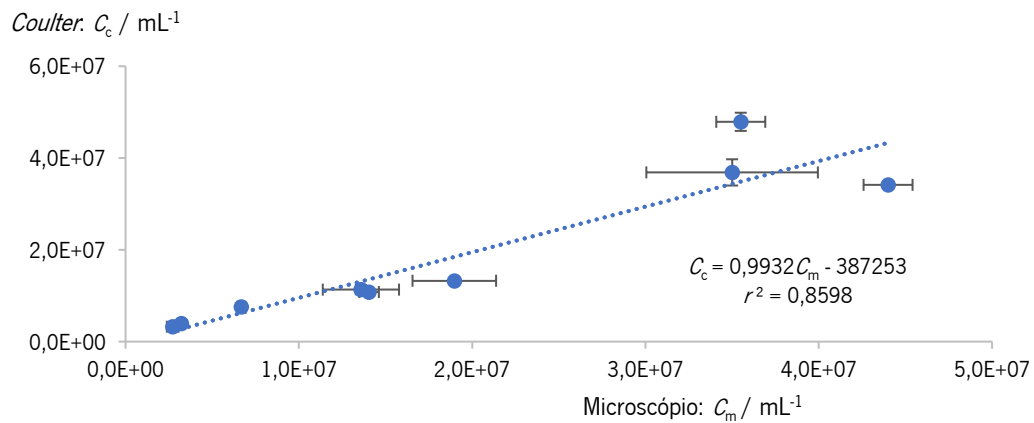
### B.1. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura A



**Figura B.1.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o *Aber* ( $C_a$ ) e o microscópio ( $C_m$ ), com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

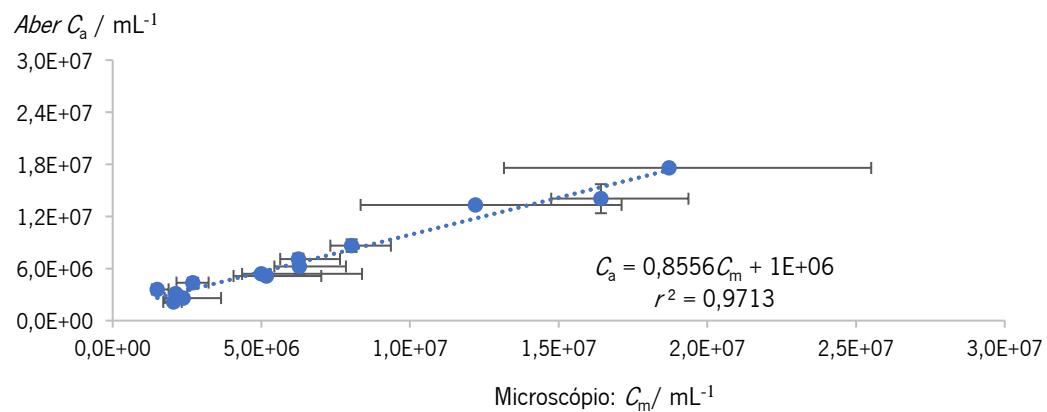


**Figura B.2** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o *Aber* ( $C_a$ ) e o *Coulter* ( $C_c$ ), com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

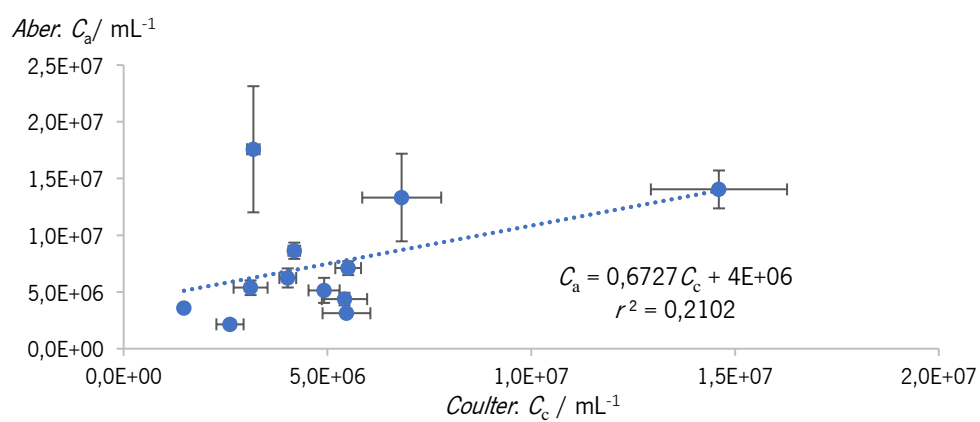


**Figura B.3** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo A entre o *Coulter* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

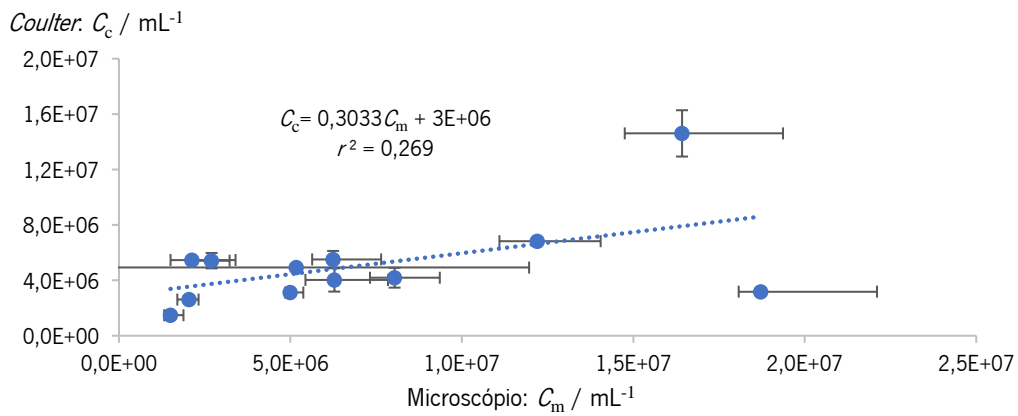
## B.2. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura B



**Figura B.4.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o *Aber* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

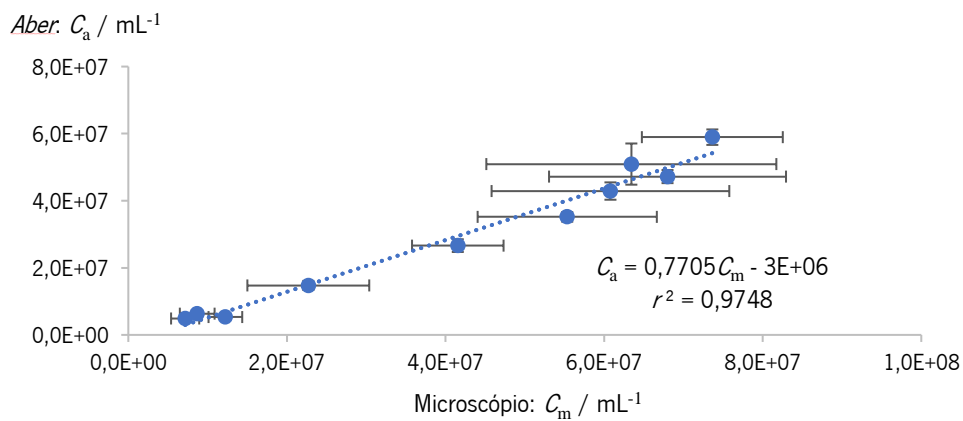


**Figura B.5.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o *Aber* e o *Coulter*, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

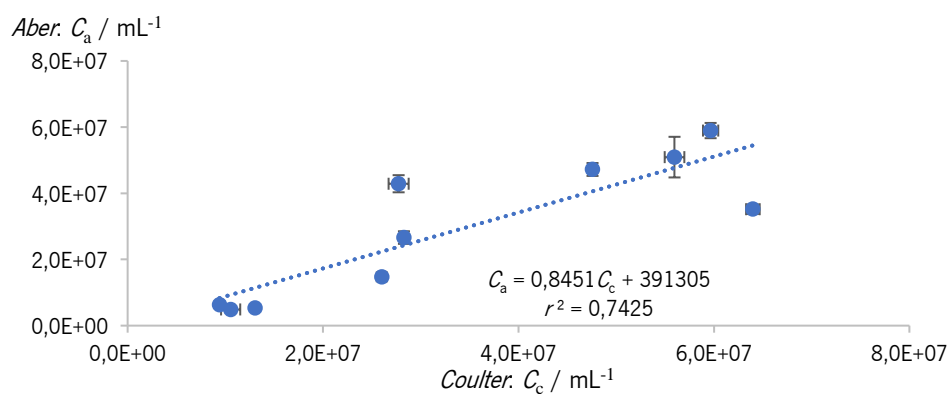


**Figura B.6.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo B entre o *Coulter* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

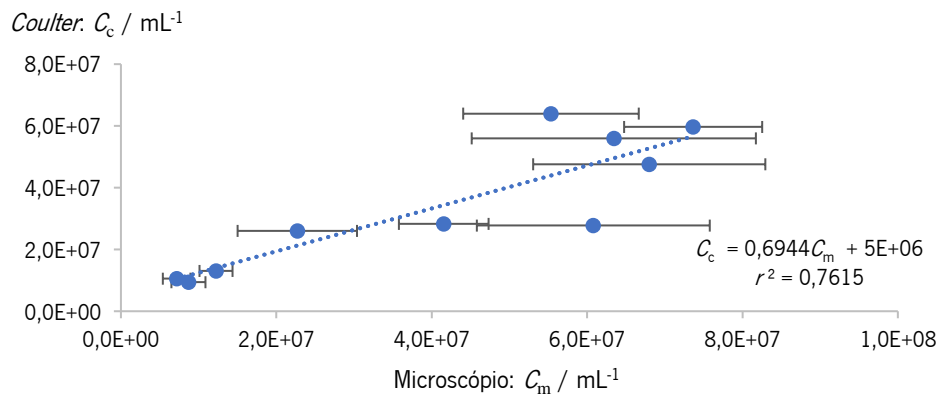
### B.3. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura C



**Figura B.7.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o *Aber* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

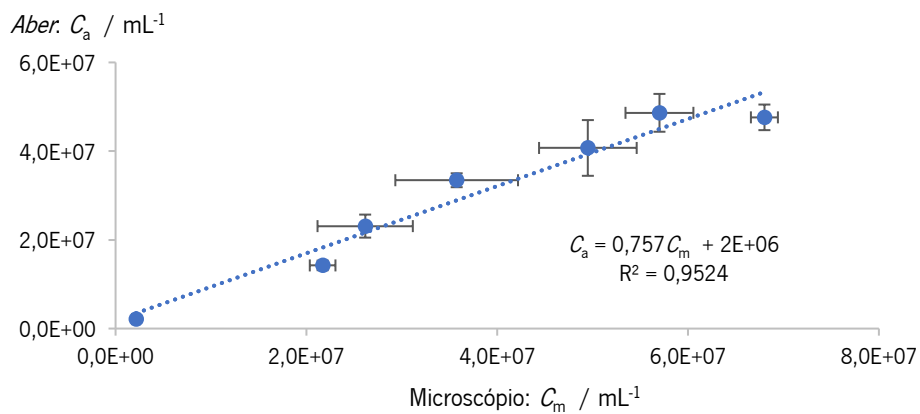


**Figura B.8.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o *Aber* e o *Coulter*, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

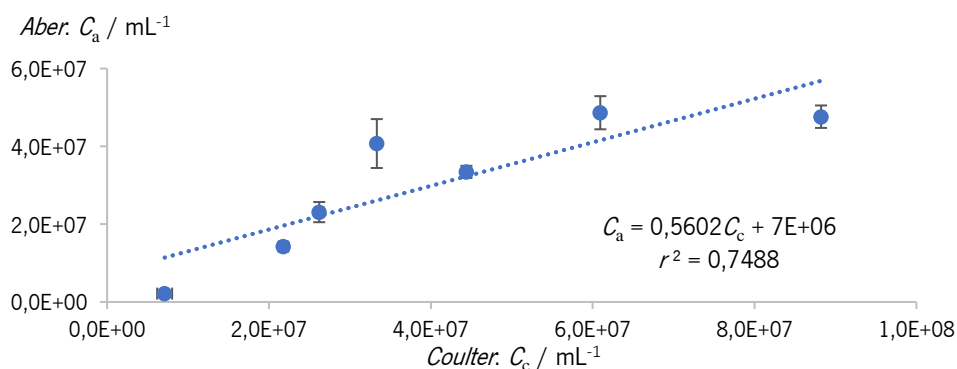


**Figura B.9.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo C entre o *Coulter* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

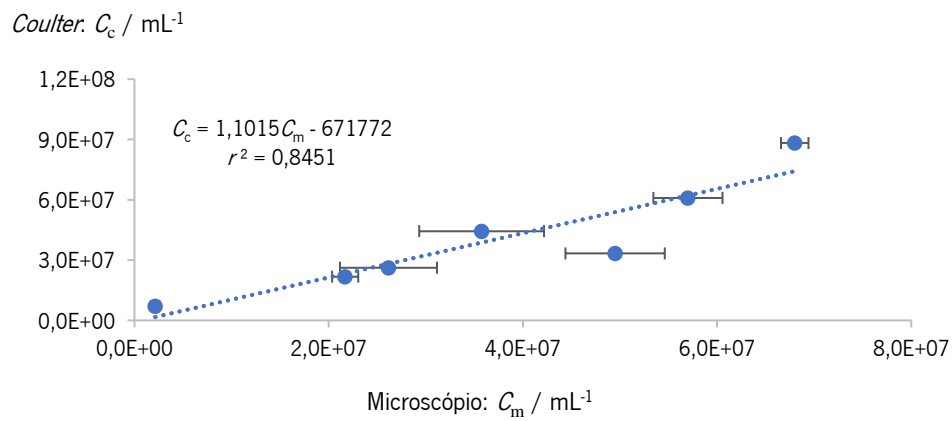
#### B.4. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura D



**Figura B.10.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o *Aber* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.

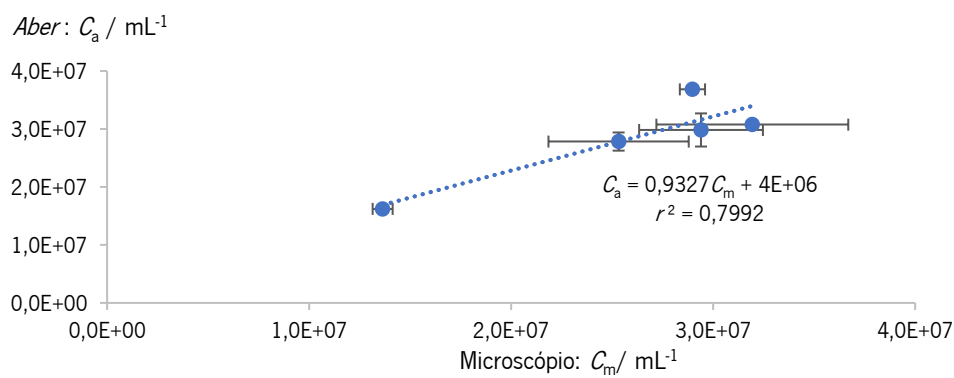


**Figura B.11.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o *Aber* e o *Coulter*, com 10 repetições para cada amostra, representando cada um dos pontos azuis uma amostra diferente.

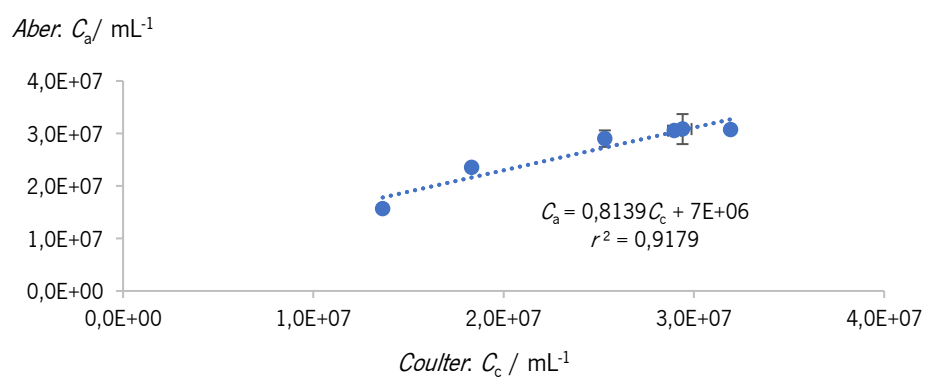


**Figura B.12.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo D entre o *Coulter* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.

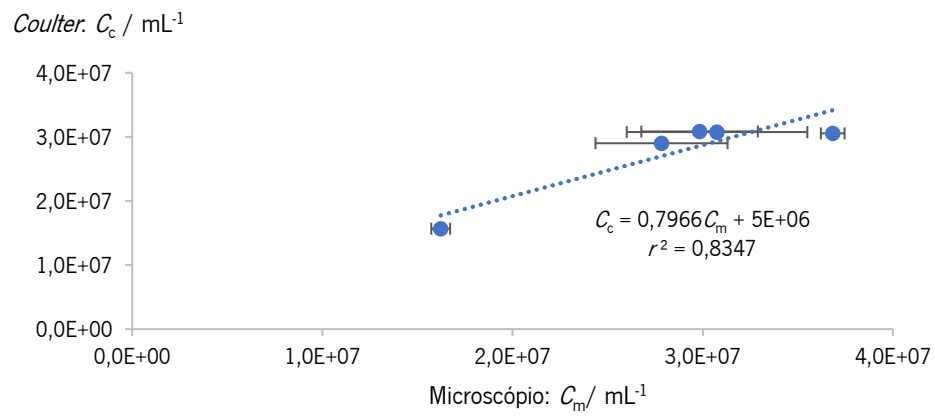
### B.5. Análise de regressão efetuada para o tipo de levedura E



**Figura B.13.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o *Aber* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.



**Figura B.14.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o *Aber* e o *Coulter*, com 10 repetições para cada amostra.



**Figura B.15.** – Correlação da concentração celular ( $C$ ) para a levedura do tipo E entre o *Coulter* e o microscópio, com 10 repetições para cada amostra.