UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA VITÓRIA CAVALHEIRO BERLOFA

DETECÇÃO DA BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO, *LEVILACTOBACILLUS BREVIS*, CONTAMINANTE DE CERVEJA, POR MEIO DE REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA VITÓRIA CAVALHEIRO BERLOFA

DETECÇÃO DA BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO, *LEVILACTOBACILLUS BREVIS*, CONTAMINANTE DE CERVEJA, POR MEIO DE REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.ª Drª Daniela Leite

Co-orientador: Prof.º Drº Luiz R. Nunes

MOGI DAS CRUZES, SP

2025

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Berlofa, Maria Vitória Cavalheiro
B515d Detecção da bactéria produtora de ácido lático, levilactobacillus brevis, contaminante de cerveja, por meio de reações de amplificação de DNA / Maria Vitória Cavalheiro Berlofa. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
90 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Daniela Leite Jabes.
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes.

1. Microrganismos deteriorantes de cerveja 2. Detecção de BSMs 3. Qualidade de cerveja 4. Diagnóstico Molecular 5. Indústria cervejeira I. Jabes, Daniela Leite, II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 663.42

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "DETECÇÃO DA BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁCIDO LÁTICO, LEVILACTOBACILLUS BREVIS, CONTAMINANTE DE CERVEJA, POR MEIO DE REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Maria Vitória Cavalheiro Berlofa**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Daniela Leite Jabes e Bruno Cavalheiro Araújo, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Rubens Pasa, da Universidade Federal de Viçosa. Sob a presidência da primeira, como orientadora da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pela senhora presidenta da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada por unanimidade

(aprovado(a) /reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 25 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof	Aprovada aprovado(a) / reprovado(a)
Prof Dr. Bruno Cavalheiro Araújo	Aprovado aprovado(a) / reprovado(a)
Prof. Dr. Daniela Leite Jabes	Aprovada aprovado(a) / reprovado(a)

ICP Brasil
Documento assinado digitalmente
RUBENS PASA
Data: 25/02/2025 17:13:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Leila e Humberto, pelo amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditarem em mim em todas as etapas da minha vida. À minha namorada, Aliana, minha gratidão pelo apoio, paciência e compreensão que foram fundamentais ao longo desses dois anos, muito obrigada!

Aos meus orientadores, Daniela e Luiz, sou grata pelos ensinamentos, pela orientação e pela dedicação no meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Agradeço também as amigas de laboratório Yara, Milena, Rúbia, Caroline e todos que estiveram presentes e tornaram as rotinas de trabalho mais leves e contribuíram de forma significativa para a realização deste projeto, seja com apoio técnico, ideias compartilhadas ou simples momentos de descontração com nossas conversas e almoços pela universidade.

A todos, meu muito obrigada!

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), por meio da concessão de bolsa-taxa do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP/CAPES) – Código de Financiamento 001.

O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio do processo nº 2023/06731-9 – PIPE – Fase 2 Indireta.

“O período de maior ganho em conhecimento
e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”
- Dalai Lama

RESUMO

O setor cervejeiro brasileiro destaca-se como um dos maiores empregadores do país e um segmento econômico de grande relevância, sendo responsável pela produção de bilhões de litros de cerveja anualmente. Entretanto, enfrenta desafios significativos relacionados à contaminação por microrganismos deteriorantes de cerveja (*Beer Spoilage Microorganisms* - *BSMs*), como *Levilactobacillus brevis*, *Pectinatus spp.*, *Megasphaera spp.* e *Zymomonas mobilis*. Esses microrganismos apresentam resistência a condições adversas e podem comprometer a qualidade sensorial da cerveja, resultando em prejuízos econômicos e desperdícios. Por meio de uma revisão narrativa, o estudo abordou os principais gêneros de *BSMs* e as metodologias atualmente utilizadas para sua detecção, destacando técnicas moleculares como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que, embora eficaz, apresenta desafios como custos elevados e necessidade de equipamentos especializados. Assim, torna-se evidente a necessidade de métodos rápidos, sensíveis e específicos para atender às demandas da indústria cervejeira. Nesse contexto, este trabalho avaliou a eficiência de primers específicos para a detecção de *L. brevis*, aplicando as técnicas de PCR e *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) por meio de testes de sensibilidade e especificidade. Os resultados demonstraram que os *primers* desenvolvidos apresentaram eficiência, porém razoável especificidade na detecção de *L. brevis*. O LAMP destacou-se como uma alternativa promissora à PCR, devido à sua alta sensibilidade, amplificando até 100 fg/µL de DNA genômico. No entanto, desafios como a inespecificidade da PCR para espécies semelhantes foi identificado. Dessa forma, este estudo reforça o potencial das técnicas moleculares na detecção de *BSMs*, especialmente do LAMP, que se mostra uma ferramenta viável para o controle de qualidade na indústria cervejeira. A contínua evolução dessas metodologias pode proporcionar soluções mais ágeis e eficazes para a detecção e controle de microrganismos contaminantes, garantindo a qualidade do produto final e maior eficiência operacional nas cervejarias.

Palavras-chave: microrganismos deteriorantes de cerveja; detecção de *bsms*; qualidade da cerveja; diagnóstico molecular; indústria cervejeira; *levilactobacillus brevis*; pcr; lamp.

ABSTRACT

The Brazilian brewing sector stands out as one of the country's largest employers and a highly significant economic segment, being responsible for producing billions of liters of beer annually. However, it faces major challenges related to contamination by beer spoilage microorganisms (BSMs), such as *Levilactobacillus brevis*, *Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp., and *Zymomonas mobilis*. These microorganisms exhibit resistance to adverse conditions and can compromise the sensory quality of beer, leading to economic losses and waste. Through a narrative review, this study addressed the main genera of BSMs and the current methodologies used for their detection, highlighting molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), which, although effective, presents challenges including high costs and the need for specialized equipment. Thus, the need for rapid, sensitive, and specific methods to meet the brewing industry's demands becomes evident. In this context, the present work evaluated the efficiency of specific primers for the detection of *L. brevis*, applying PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) techniques through sensitivity and specificity tests. The results demonstrated that the developed primers showed efficiency, although with moderate specificity for detecting *L. brevis*. LAMP stood out as a promising alternative to PCR due to its high sensitivity, amplifying as little as 100 fg/µL of genomic DNA. However, challenges such as the lack of specificity of PCR for similar species were identified. Therefore, this study reinforces the potential of molecular techniques for detecting BSMs, especially LAMP, which proves to be a viable tool for quality control in the brewing industry. The continuous evolution of these methodologies may offer faster and more effective solutions for the detection and control of contaminating microorganisms, ensuring the final product's quality and greater operational efficiency in breweries.

Palavras-chave: beer spoilage microorganisms; bsm detection; beer quality; molecular diagnosis; brewing industry; *levilactobacillus brevis*; pcr; lamp; quality control.

SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rRNA - Sequência do RNA ribossômico 16S

ASSURED - *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Deliverable to end-users*

BSMs – *Beer Spoilage Microorganisms*

CBMAI - Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria

CFU - *Colony Forming Unit*

DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

DNAg - DNA genômico

dNTP - Nucleotídeos trifosfatados desoxirribonucleicos

FAT – Fundação André Tosello

hitA - Gene relacionado a resistência do lúpulo

horA - Gene relacionado a resistência do lúpulo

horC - Gene relacionado a resistência do lúpulo

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

LAMP - *Loop-Mediated Isothermal Amplification*

$MgCl^2$ - Cloreto de magnésio

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*

MRS - Meio de Cultura Man, Rogosa e Sharpe

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PIB - Produto Interno Bruto

pb - Pares de base

R^2 - Coeficiente de determinação

R$ - Real, moeda brasileira

RNA - *Ribonucleic Acid*

RT-LAMP – *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 10

REFERÊNCIAS 12

CAPÍTULO I – REVISÃO NARRATIVA 14

CAPÍTULO II – ESTUDO EXPERIMENTAL 11

ARTIGO SUBMETIDO 34

ANEXO I – NORMAS DO PERIÓDICO SUBMETIDO 60

ANEXO II – CAPÍTULO DE LIVRO 65

1 INTRODUÇÃO GERAL

A indústria cervejeira brasileira ocupa uma posição de destaque no cenário nacional e internacional, sendo responsável por 2,5% do PIB brasileiro e empregando mais de 2,7 milhões de pessoas. Com uma produção anual de 15,6 bilhões de litros de cerveja em 2023, o Brasil se consolidou como o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas da China e dos Estados Unidos. Este setor envolve uma cadeia produtiva diversificada, que abrange o agronegócio, mercados de embalagens, logística, maquinário e varejo, desempenhando um papel central no desenvolvimento econômico do país (Anuário da Cerveja de 2024 - MAPA, 2024; CervBrasil, 2024).

O processo de produção da cerveja segue etapas tecnológicas bem definidas, desde o preparo do mosto até a fermentação com leveduras específicas, como *Saccharomyces cerevisiae* para cervejas do tipo *ale* e *S. pastorianus* para cervejas *lagers*. Essas etapas determinam características essenciais da bebida, como aroma, sabor e teor alcoólico (Rodhouse; Carbonero, 2017). Contudo, o setor enfrenta desafios constantes relacionados à contaminação microbiológica por microrganismos deteriorantes de cerveja (*Beer Spoilage Microorganisms - BSMs*), que podem comprometer a qualidade sensorial, a estabilidade e a segurança do produto. Microrganismos como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Brettanomyces* e *Saccharomyces diastaticus* estão entre os principais responsáveis por contaminações, causando *off-flavors*, turbidez e alterações no teor alcoólico, que impactam negativamente a experiência do consumidor e a reputação das marcas (Dragone *et al*., 2007; Rodhouse; Carbonero, 2017).

Entre os microrganismos deteriorantes de cerveja, o gênero *Lactobacillus* se destaca, com ênfase na espécie *Levilactobacillus brevis*, reconhecido como um dos contaminantes mais importantes na indústria cervejeira. Essa bactéria é frequentemente associada a defeitos sensoriais, como acidez excessiva e *off-flavors*, além de prejudicar a estabilidade do produto (Hayashi *et al*., 2001; Sakamoto *et al*., 2001; Ma *et al*., 2017).

A detecção de *BSMs* ainda é desafiadora para a indústria cervejeira. Métodos tradicionais baseados em cultivo microbiológico, amplamente utilizados, apresentam a desvantagem de serem demorados, levando até sete dias para fornecer resultados. Durante esse intervalo, produtos contaminados podem ser distribuídos, o que pode levar a perdas financeiras e danos à imagem das empresas (Sakamoto; Konings, 2003). Em contrapartida, métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), despontam como alternativas rápidas e eficazes quando comparadas aos métodos tradicionais de cultivo e permitem a identificação precisa de microrganismos em poucas horas. Estudos recentes demonstraram a

aplicabilidade da PCR, e outras técnicas alternativas como *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight* (MALDI-TOF), que classifica os microrganismos com base na espectrometria de massas, para detectar espécies de bactérias e leveduras, contribuindo para um controle microbiológico de cerveja mais eficiente (Garofalo *et al*., 2015; Turvey *et al*., 2016; Asano *et al*., 2019).

Além da PCR, a Técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (*Loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) tem ganhado destaque por sua simplicidade e custo reduzido. O LAMP apresenta alta sensibilidade e especificidade, oferecendo uma alternativa promissora para a detecção de *BSMs*, especialmente em ambientes de produção que demandam agilidade e eficiência. Com resultados rápidos e requisitos mínimos de infraestrutura, essa metodologia se posiciona como uma solução inovadora para o controle microbiológico no setor cervejeiro (Notomi *et al*., 2000; Soroka *et al*., 2021).

Diante desse contexto, esta dissertação aborda os desafios microbiológicos enfrentados pela indústria cervejeira, bem como as ferramentas moleculares inovadoras voltadas para aprimorar a segurança e a qualidade do produto. O primeiro capítulo apresenta uma revisão narrativa sobre o tema, enquanto o segundo detalha os experimentos realizados, com ênfase na aplicação de técnicas moleculares para a detecção de *Levilactobacillus brevis*. O objetivo é otimizar processos de identificação rápida e precisa, além de contribuir para o controle microbiológico e a garantia da qualidade na indústria cervejeira.

REFERÊNCIAS

ANUÁRIO DA CERVEJA DE 2024 - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Disponível em: https://sindicerv.com.br/anuario-da-cerveja-2024/. Acesso em: 15 de nov. 2024.

ASANO, S.; SHIMOKAWA, M.; SUZUKI, K. PCR analysis methods for detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria. **Methods In Molecular Biology**, v. 1887, p. 95-107, 2019. DOI: 10.1007/978-1-4939-8907-2_9. DOI: 10.1007/978-1-4939-8907-2_9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30506252/. Acesso em: 20 nov. 2024.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA (CERVBRASIL). São Paulo, 2018. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/. Acesso em: 15 de nov. 2024.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Revisão: Produção De Cerveja: Microrganismos Deteriorantes E Métodos De Detecção. **Braz. J. Food Technol**., v. 10, n. 4, p. 240-251, out./dez 2007. Disponível em: https://hdl.handle.net/1822/16769. Acesso em: 21 de nov. 2024.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIC, V.; TACCARI, M.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. Chicago. **Journal of Food Science**. Food Microbiology & Safety. 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.13112. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26489032/. Acesso em: 10 de nov. 2024.

HAYASHI, N.; ITO, M.; HORIIKE, S.; TAGUCHI, H. et al. Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus* brevis strains capable of growing in beer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 596–603, 2001. DOI: 10.1007/s002530100600. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s002530100600. Acesso em: 16 de nov. 2024.

MA, Y.; DENG, Y.; XU, Z.; LIU, J.; DONG, J.; YIN, H.; YU, J.; CHANG, Z.; WANG, D. Development of a propidium monoazide-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Lactobacillus brevis* in beer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, 2017, p. 740–746. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28633981/. Acesso em: 14 de nov. 2024.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, E63, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/28/12/e63/2359194. Acesso em: 11 de nov. 2024.

RODHOUSE, L.; CARBONERO F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. Arkansas, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 59:3, 462-473. 2017. DOI: 10.1080/10408398.2017.1378616. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910550/. Acesso em: 15 de nov. 2024.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 105–124, 2003. DOI:

10.1016/s0168-1605(03)00153-3. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14623377/. Acesso em: 17 de nov. 2024.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. [S.l]. **Journal of Bacteriology**. 2001. DOI: 10.1128/JB.183.18.5371-5375.2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11514522/. Acesso em: 21 de nov. 2024.

SOROKA, M.; WASOWICZ, B.; RYMASZEWSKA, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1931, 2021. DOI: 10.3390/cells10081931. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4409/10/8/1931. Acesso em: 18 de nov. 2024.

TURVEY, M. E.; WEILAND, F.; MENESES, J.; STERENBERG, N.; HOFFMANN, P. Identification of beer spoilage microorganisms using the MALDI Biotyper platform. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2761–2773, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7344-8. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7344-8. Acesso em: 15 de nov. 2024.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA VITÓRIA CAVALHEIRO BERLOFA

CAPÍTULO I – REVISÃO NARRATIVA

MICRORGANISMOS DETERIORANTES DE CERVEJA: TÉCNICAS DE DETECÇÃO E SOLUÇÕES DE QUALIDADE

Mogi das Cruzes, SP
2025

CAPÍTULO A SER SUBMETIDO

O Capítulo I, intitulado " Microrganismos Deteriorantes De Cerveja: Técnicas De Detecção E Soluções De Qualidade", será submetido para publicação no Livro de Biotecnologia da Pós-Graduação *stricto sensu*, da Universidade de Mogi das Cruzes.

MICRORGANISMOS DETERIORANTES DE CERVEJA: TÉCNICAS DE DETECÇÃO E SOLUÇÕES DE QUALIDADE

Maria Vitória Cavalheiro Berlofa
Universidade de Mogi das Cruzes
Yara Natércia Lima Faustino de Maria
Universidade de Mogi das Cruzes
René Aduan Júnior
Universidade de Mogi das Cruzes
Fabiano Bezerra Menegidio
Universidade de Mogi das Cruzes
Luiz Roberto Nunes
Universidade Federal do ABC
Daniela Leite Jabes
Universidade de Mogi das Cruzes

RESUMO

O setor cervejeiro brasileiro é um dos maiores empregadores do país e representa um segmento econômico de grande relevância, com a produção anual de bilhões de litros de cerveja, ocupando a terceira posição mundial em volume de produção. Contudo, enfrenta o desafio contínuo de controlar microrganismos deteriorantes de cerveja (*Beer Spoilage Microrganisms - BSMs*), como bactérias e leveduras, que comprometem a qualidade do produto e geram prejuízos econômicos e desperdício. Por meio de uma revisão narrativa, este estudo examinou os principais gêneros de *BSMs* e as técnicas de detecção utilizadas. Dentre os *BSMs* mais relevantes, destacam-se *Levilactobacillus brevis*, *Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp. e *Zymomonas mobilis*, microrganismos que apresentam resistência a condições adversas e causam alterações sensoriais indesejáveis na cerveja. Algumas das técnicas atualmente empregadas, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), apresentam tanto vantagens quanto limitações. Embora essas metodologias contribuam para um controle mais eficaz, elas enfrentam desafios, como altos custos, risco de falsos positivos e a necessidade de equipamentos especializados. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos, que possam atender de maneira

mais eficiente às demandas da indústria cervejeira. Esta revisão fornece uma base teórica essencial para futuros avanços nas técnicas de detecção e controle de *BSMs*, com o objetivo de assegurar a qualidade do produto final e aprimorar a eficiência operacional das cervejarias.

Palavras-chave: Detecção de *BSMs*, Microrganismos deteriorantes de cerveja, Qualidade da cerveja, Técnicas de detecção.

ABSTRACT

The Brazilian brewing sector is one of the largest employers in the country and represents a significant economic segment, producing billions of liters of beer annually and ranking third worldwide in production volume. However, it faces the ongoing challenge of controlling Beer Spoilage Microorganisms (BSMs), such as bacteria and yeasts, which compromise product quality, leading to economic losses and waste. Through a narrative review, this study analyzed the main BSM genera and detection techniques employed. Among the primary BSMs are *Levilactobacillus brevis*, *Pectinatus* spp., *Megasphaera* spp., and *Zymomonas mobilis*, which exhibit resistance to adverse conditions resulting in undesirable sensory changes in beer. Current techniques, such as PCR and commercial kits, have their advantages and limitations. Although these methodologies contribute to more effective control, they face challenges such as high costs, false positives results, and the need for specialized equipment. This highlights the necessity for the development of rapid, sensitive, and specific methods that can more efficiently meet the demands of the brewing industry. This review provides a theoretical foundation for future advancements in BSM detection and control techniques, aiming to ensure product quality and greater operational efficiency for breweries.

Keywords: Beer quality; Beer spoilage microorganisms; BSM detection; Brewing industry; Detection techniques; Molecular diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

O setor cervejeiro brasileiro é um dos mais tradicionais da economia e abrange toda a cadeia produtiva, desde o agronegócio até o pequeno varejo, passando por mercados de embalagens, logística, maquinário e construção civil. É responsável por empregar mais de 2,7 milhões de pessoas, figurando entre os maiores empregadores do país e sendo um dos principais impulsionadores da economia nacional. O mercado cervejeiro brasileiro produz anualmente 15,6 bilhões de litros de cerveja e, em 2023, foi responsável por 2,5% do PIB do país, além de faturar cerca de R$100 bilhões. Dessa forma, a produção brasileira ocupa a terceira posição

mundial, atrás apenas da China e dos Estados Unidos, que seguem como líderes da produção de cerveja atualmente (Anuário da Cerveja de 2024 - MAPA, 2024; CervBrasil, 2024).

Nesse contexto, o número de cervejarias no Brasil tem apresentado um crescimento significativo, especialmente a partir de 2016, com uma aceleração expressiva em comparação aos anos anteriores. Esse aumento reflete a expansão contínua do mercado cervejeiro no país (Gráfico 1) (Anuário da Cerveja de 2024 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2024).

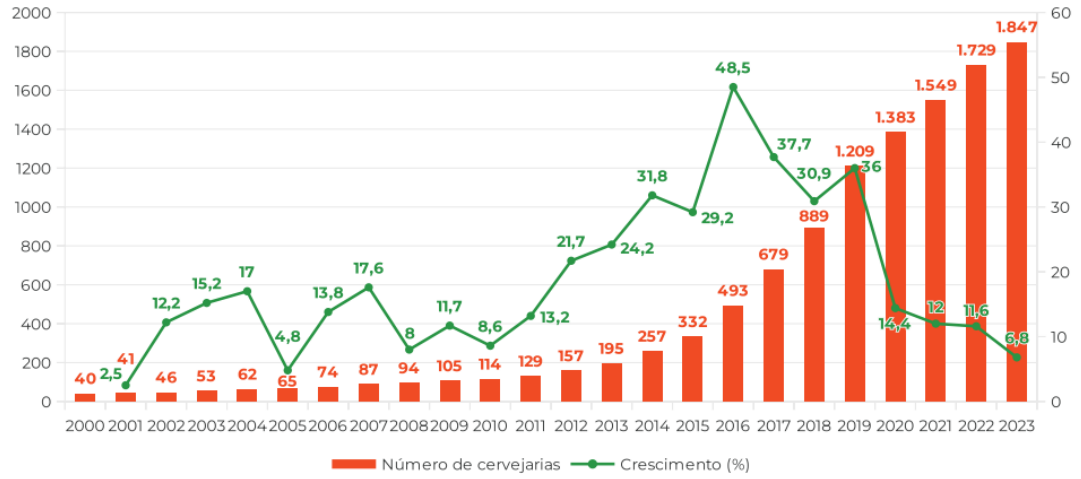


Gráfico 1 - Número total de cervejarias no Brasil de 2000 até 2023, segundo Anuário da Cerveja de 2024, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2024).

A produção de cerveja (Figura 1) segue etapas fundamentais: os grãos de cevada maltados são moídos e hidratados, formando um mosto primário que é fervido por 60 minutos junto ao lúpulo, agregando sabor, aroma e amargor característicos. Em seguida, ocorre o resfriamento e o mosto é transferido para tanques de fermentação, onde é inoculado com leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* para cervejas do tipo *ale*, fermentadas entre 15 e 25°C, ou *S. pastorianus* para cervejas do tipo *lagers*, fermentadas entre 5 e 13°C. Durante uma semana, as leveduras convertem carboidratos do mosto em álcool e compostos aromáticos que definem o perfil sensorial da cerveja. Após, as leveduras são removidas, e a bebida é maturada de 15 a 30 dias para aprimoramento do sabor, antes da pasteurização e envase, exceto no caso do chope que, ao contrário da cerveja, não passa por pasteurização nem recebe conservantes (Stewart; Priest, 2006; Rodhouse; Carbonero, 2017).

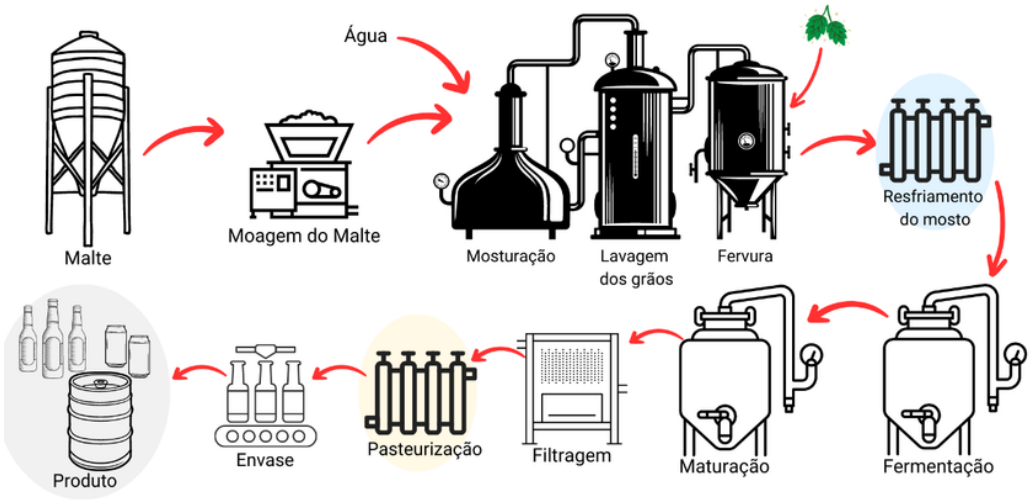


Figura 1: Esquema do processo de fabricação da cerveja ilustrando: malteação, mosturação, fervura, resfriamento, fermentação, maturação, filtração, pasteurização e envase. (Obtido de *Contribuciones a las Ciencias Sociales*).

A contaminação por *Beer Spoilage Microorganisms* (*BSMs*), ou microrganismos deteriorantes de cerveja, pode ocorrer desde as matérias-primas até etapas posteriores do processo produtivo, como a adição de ingredientes aromatizantes. A presença desses microrganismos representa um problema significativo na fabricação de cerveja, já que podem comprometer a qualidade do produto e levar à rejeição pelo consumidor. Além disso, a contaminação frequentemente resulta no descarte de lotes inteiros, gerando desperdício e prejuízos econômicos para as cervejarias (Sakamoto; Konings, 2003; Garofalo *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017).

Diferentes etapas do processo de produção são vulneráveis à contaminação e os efeitos dos *BSM*s podem incluir aumento da turbidez, acidez fora do padrão, mudanças no teor alcoólico, acúmulo de metabólitos tóxicos e introdução de sabores e aromas indesejados, conhecidos como *off-flavors*. Entre os principais *BSMs* detectados em cervejarias, destacam-se diversos tipos de bactérias, fungos miceliais e leveduras selvagens (que não foram adicionadas de forma controlada). As etapas mais suscetíveis a contaminação por esses microrganismos, incluem o momento de moagem dos grãos, resfriamento do mosto, fermentação, filtração e envase (Dragone *et al*., 2007; Esmaeili *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017; Xu *et al*., 2020).

Importante destacar que o surgimento desses microrganismos acontece independente das sanitizações periodicamente realizadas nas indústrias, chamadas de CIP (*Clean in Place*), em que ocorre a limpeza controlada, sem desmontar equipamentos, para sanitizar o sistema de produção (WT Distribuidora, 2021; Biosan, 2022). A origem dessas contaminações é diversificada, originando-se de matérias-primas contaminadas, como malte, água, lúpulo e

leveduras fermentadoras, ou do contato com superfícies inadequadamente sanitizadas, como os equipamentos de manuseio e linhas de transferência nas cervejarias (Dragone *et al*., 2007; Esmaeili *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017; Xu *et al.*, 2020).

A contaminação microbiológica representa um dos principais desafios para a indústria cervejeira, pois microrganismos indesejados podem causar defeitos sensoriais, comprometer a estabilidade do produto e, em casos mais graves, torná-lo impróprio para consumo (Rodríguez-Saavedra *et al*., 2020). As técnicas de detecção de microrganismos deteriorantes de cerveja, como os métodos tradicionais de cultura, ainda são amplamente utilizadas na indústria cervejeira, mas apresentam limitações quanto à sensibilidade e tempo de resposta. Por outro lado, abordagens mais rápidas, como a PCR, oferecem vantagens em termos de agilidade, mas enfrentam desafios relacionados, principalmente, aos custos de equipamentos. A Figura 2 demonstra como ocorre a técnica de cultivo em meios de cultura (Rodhouse; Carbonero, 2017; Xu *et al.*, 2020).



Figura 2: Cultivo de microrganismos em meios de cultura. (Obtido de Freepik).

Diante desse cenário, este capítulo tem como propósito oferecer uma visão abrangente sobre os principais gêneros e espécies de microrganismos que causam deterioração na cerveja, explorando de forma acessível e detalhada as metodologias mais utilizadas para sua detecção no ambiente industrial. A proposta é apresentar ao leitor, especialmente àqueles que atuam ou têm interesse na área de microbiologia e produção cervejeira, um panorama das ferramentas atualmente disponíveis, com destaque para as técnicas moleculares, como a PCR. Ainda que estas metodologias tenham demonstrado eficiência em muitos casos, discutiremos a necessidade de avanços que integrem rapidez, precisão e acessibilidade, visando tornar o controle de qualidade na produção cervejeira cada vez mais eficaz e confiável.

1.1. INCIDÊNCIA DE *BSMS*

A contaminação por *BSMs* na cerveja é dominada por bactérias ácido-láticas (LAB), especialmente espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, ambos pertencentes ao grupo de bactérias gram-positivas. É importante destacar que, em 2020, o gênero *Lactobacillus* passou por uma ampla reorganização taxonômica, sendo redistribuído em 25 novos gêneros com base em análises genômicas, proporcionando uma classificação mais precisa das diferenças filogenéticas. Como resultado, algumas espécies foram realocadas para novos gêneros (Zheng et al., 2020; ANVISA, 2021).

As bactérias ácido-láticas (*lactic acid bacteria* ou *LABs*), Figura 3, são responsáveis por aproximadamente 70% das contaminações em cervejas (Suzuki *et al.*, 2005; Esmaeili *et al*., 2015; Xu *et al.*, 2020). Embora o lúpulo iniba bactérias Gram-positivas, algumas *LABs*, como *Levilactobacillus brevis*, apresentam genes *hor*, que conferem resistência a esse efeito antimicrobiano, permitindo sua sobrevivência e proliferação no ambiente cervejeiro (Suzuki *et al*., 2006; Bergsveinson *et al.*, 2015; Feyereisen *et al*., 2020; Siebert *et al*., 2021; Menz *et al.*, 2022).

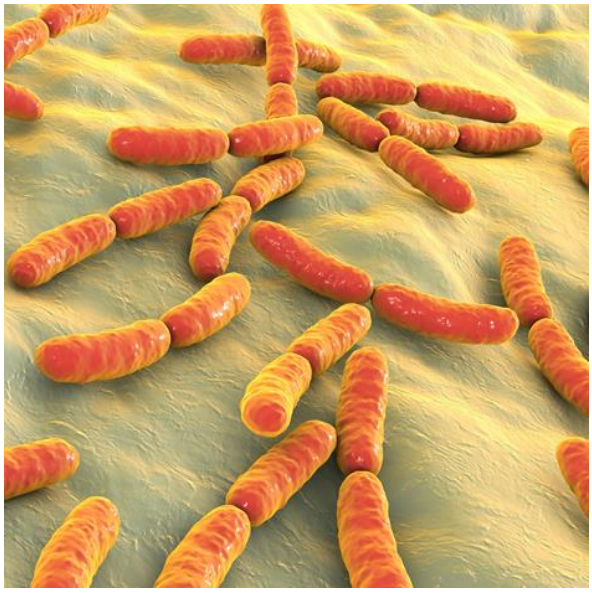


Figura 3: Ilustração digital 3D de *Levilactobacillus brevis.* (Obtido de VITAL.LY).

Bactérias gram-negativas como *Megasphaera, Pectinatus* e *Zymomonas* deterioram cervejas. *Megasphaera* cresce anaerobicamente e resiste a pH ácido e compostos do lúpulo, enquanto *Pectinatus* causa turbidez e odores desagradáveis (Suzuki, 2011; Vaughan *et al*., 2020). *Zymomonas mobilis*, resistente ao lúpulo, altera o aroma por gerar acetaldeído e sulfeto de hidrogênio (Dragone *et al*., 2007; Rodríguez-Saavedra *et al*., 2021; Arnold *et al.*, 2024). As Bactérias do Ácido Acético (BAA), como *Acetobacter* e *Gluconobacter*, oxidam etanol, tornando a cerveja ácida e turva. Embora menos frequentes hoje, ainda causam perdas na

produção (Sakamoto; Konings, 2003; Bokulich; Bamforth, 2013; Kubizniaková *et al*., 2021; Bouchez; De Vuyst, 2022).

Além disso, fungos miceliais (Figura 4) como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Fusarium* podem contaminar a cevada e produzir micotoxinas, sendo classificados como *BSMs* (Pitt; Hocking, 2009; Barbosa *et al*., 2016). Entre as leveduras contaminantes, destacam-se espécies do gênero *Saccharomyces*, como *S. diastaticus*, e leveduras não-*Saccharomyces*, como *Brettanomyces* e *Candida*, que comprometem a qualidade da cerveja ao causar turbidez e *off-flavors* indesejáveis (Stewart; Priest, 2006; Dragone *et al*., 2007; Rodhouse; Carbonero, 2017). Os métodos microbiológicos tradicionais para detecção desses contaminantes são lentos, o que tem incentivado a adoção de técnicas moleculares, como a PCR, por sua maior rapidez e precisão (Storgårds *et al.*, 2006; Rodhouse; Carbonero, 2017; Oldham; Held, 2023).



Figura 4: Placa de cultura de *Aspergillus niger* (Obtido de Shutterstock).

1.2. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *BSMs*

1.2.1. TÉCNICAS TRADICIONAIS DE DETECÇÃO

A detecção precoce de *BSMs* é essencial para evitar a proliferação desses microrganismos durante o processo de fabricação da cerveja e evitar prejuízos irreversíveis, como descarte da bebida. No ambiente industrial, os métodos clássicos de detecção, como o cultivo microbiológico em meios seletivos, continuam a ser amplamente utilizados devido à sua eficácia e acessibilidade. Esses métodos envolvem a análise do crescimento de *BSMs* em meios seletivos, sendo a abordagem de controle de qualidade microbiológica predominante nas

cervejarias até os dias de hoje (Storgårds *et al*., 2006; Dragone *et al*., 2007; Esmaeili *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017; Xu *et al*., 2020).

No entanto, essa técnica apresenta limitações significativas. O tempo necessário para obtenção de resultados podem variar de sete dias a algumas semanas, o que representa um risco considerável para a indústria. Durante esse intervalo, lotes inteiros de cerveja podem ser distribuídos e consumidos antes que os resultados estejam disponíveis, aumentando a possibilidade de *recalls* dispendiosos e danos à reputação da marca (Sakamoto; Konings, 2003; Condina *et al*., 2019).

Além disso, o cultivo microbiológico nem sempre oferece a especificidade e sensibilidade adequadas ao monitoramento de microrganismos deteriorantes, o que compromete a detecção eficiente de *BSMs*. Por isso, apesar de sua tradição e acessibilidade, a cultura em placa está gradualmente cedendo espaço para métodos mais rápidos e precisos, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Juvonen; Haikara, 2009; Rodhouse; Carbonero, 2017; Oldham; Held, 2023).

1.2.2. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECÇÃO DE *BSMS*

A técnica de PCR tem se destacado como uma ferramenta molecular eficiente e precisa para a detecção de microrganismos deteriorantes de cerveja, sendo uma alternativa mais eficaz em relação aos métodos tradicionais de cultivo. Ao permitir a amplificação de fragmentos de DNA específicos dos contaminantes, a PCR identifica com alta precisão a presença desses microrganismos em poucas horas, possibilitando respostas rápidas e prevenindo a disseminação da contaminação para outros lotes (Juvonen; Haikara, 2009; Oldham; Held, 2023).

Além de reduzir significativamente o tempo de obtenção de resultados, a técnica contribui para melhorar a qualidade e a segurança das cervejas produzidas ao minimizar perdas e otimizar os processos produtivos. Assim, apesar dos desafios que ainda persistem na detecção de *BSMs*, a utilização da PCR representa um avanço notável, já que oferece equilíbrio entre eficácia operacional e sustentabilidade econômica para a indústria cervejeira, quando comparada ao cultivo (Sakamoto; Konings, 2003; Condina *et al*., 2019).

Por outro lado, diversos protocolos foram desenvolvidos com o uso de diferentes tecnologias para a identificação ágil, sensível e precisa dos *BSMs*. Entre essas, destaca-se a citometria de fluxo, uma técnica baseada na análise individual de células por meio de laser, permitindo a mensuração de parâmetros como tamanho, viabilidade e características internas. Embora seja uma ferramenta valiosa para a caracterização de comunidades microbianas na cerveja, incluindo os *BSMs*, seu elevado custo e a necessidade de operadores especializados

restringem sua aplicação na maioria das cervejarias, tornando-a viável somente em ambientes de pesquisa (Oldham; Held, 2023).

Além disso, existe também a técnica de PCR com Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) que separa fragmentos de DNA com base na sua estrutura, o que permite distinguir entre espécies. Contudo, embora o método seja eficaz, e existam estudos com *L. brevis*, é um processo demorado, uma vez que, após a amplificação por PCR, ainda é necessário realizar a etapa de DGGE para a separação e análise dos fragmentos, o que pode aumentar significativamente o tempo total de análise, o que também torna a aplicação inviável nas cervejarias e mais voltada para pesquisas em laboratório (Manzano *et al.,* 2011; Garofalo *et al*., 2015; Nesterova *et al*., 2024).

Uma abordagem alternativa para a detecção de leveduras contaminantes, como o gênero *Brettanomyces* e *Saccharomyces diastaticus*, foi proposta por Shinohata *et al*., em 2021, com o uso do sequenciador de DNA *MinION* da *Oxford Nanopore Technologies*, Figura 5. Embora essa técnica ofereça uma resolução taxonômica precisa, ela apresenta limitações significativas. Inicialmente, é necessário realizar uma PCR para amplificar a região-alvo do DNA, seguido do sequenciamento, o que aumenta o tempo e a complexidade do processo. Além disso, são utilizados dois *kits* diferentes para a preparação das bibliotecas de DNA, o *Ligation Sequencing Kit* e o *Rapid Barcoding Kit*. Essas etapas extras tornam o método mais demorado e dispendioso, especialmente quando se considera o alto custo do PCR, dos *kits* e do sequenciador *MinION*. Essa combinação de custos elevados e a necessidade de habilidades de manuseio tornam a técnica menos acessível e mais trabalhosa para as cervejarias (Shinohara *et al*., 2021; Nanopore Technologies, 2024).



Figura 5: Aparelho sequenciador *MinION, Oxford Nanopore Technologies.* (Obtido de Loja Interprise).

Outra técnica bastante citada é o MALDI-TOF (Figura 6), capaz de identificar microrganismos por meio da análise de proteínas ribossomais específicas de cada um deles. Na

preparação da amostra, uma matriz química é utilizada para extrair proteínas, que são ionizadas por um laser. Os íons gerados são acelerados e o Tempo de Voo (TOF) é medido para criar um espectro de massa único, comparado a uma base de dados para identificação do microrganismo. A técnica é rápida e precisa, mas depende da qualidade da base de dados e pode ter dificuldades para distinguir espécies filogeneticamente semelhantes, o que pode ser desvantajoso, além do custo do aparelho para espectrometria em massa, que se aproxima a 1 milhão de reais, e profissional qualificado para o procedimento (Wieme *et al.*, 2014; Schurr *et al*., 2015; Turvey *et al*., 2016; Condina *et al*., 2019; Akimowicz; Bucka-Kolendo, 2020; Plataforma Nacional De Infraestrutura de Pesquisa, 2024).



Figura 6: Sistema automatizado de MALDI-TOF. (Obtido de Charles River Laboratories).

Embora essas abordagens ofereçam sensibilidade e precisão, o custo elevado, a complexidade dos protocolos e a necessidade de equipamentos especializados as tornam menos viáveis para uso contínuo em ambientes industriais, especialmente para cervejarias de menor porte. Portanto, a busca por soluções que equilibrem eficácia e custo-benefício continua sendo um desafio importante para a indústria cervejeira.

1.2.3. *KITS* DE DETECÇÃO DE *BSMS* DISPONÍVEIS NO MERCADO

Diversos *kits* de detecção de *BSMs* disponíveis no mercado utilizam a tecnologia de PCR, qualitativamente e quantitativamente e, embora ofereçam resultados significativamente mais rápidos em comparação aos métodos tradicionais de cultura, com tempos de resposta que variam de 2 a 3 horas, é necessário considerar as limitações e a aplicabilidade de cada abordagem no ambiente cervejeiro.

Exemplo disso é o *Invisible Sentinel Veriflow® BrewPAL* (Figura 7a), que emprega a tecnologia *Veriflow®* para a detecção qualitativa de *Lactobacillus* e *Pediococcus* até 10 células/mL (Biomérieux, 2024). Outro exemplo é o *foodproof® Beer Screening Kit* e seus *LyoKits*, (Figura 7b), que detectam diversas bactérias deteriorantes, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Megasphaera* e *Pectinatus*, através de PCR em tempo real com sensibilidade de até 10^3 células/mL (Hygiena, 2024). Embora a tecnologia PCR em tempo real aumente a confiabilidade, a sensibilidade do *kit* pode ser insuficiente em situações de contaminação muito baixa, exigindo a combinação com métodos adicionais para garantir a sensibilidade.

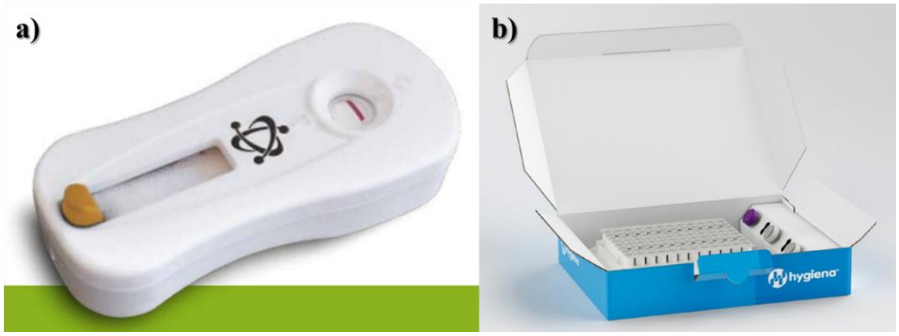


Figura 7: a) Dispositivo de teste do Kit *Invisible Sentinel Veriflow® BrewPAL*. (Obtido de bioMérieux); *b)* Kit *foodproof® Beer Screening Kit* (Obtido de Hygiena).

O *Beer Spoilage Detection Kit* da *Microbiologique* (Figura 8), que também utiliza PCR em tempo real, detecta leveduras selvagens e bactérias deteriorantes, como *Saccharomyces diastaticus*, *Brettanomyces*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. A detecção direta ocorre em 3 horas, enquanto a adição da etapa de enriquecimento (meio que favorece o crescimento de *BSMs* facilitando sua detecção por PCR) pode levar de 24 a 48 horas para detectar até 1 CFU por amostra (Janagama *et al*., 2018; Microbiologique, 2024).

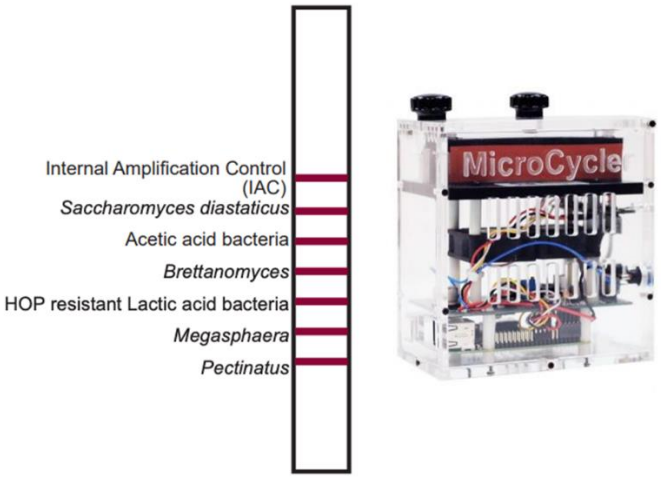


Figura 8: Fita reagente e PCR portátil do kit *Beer Spoilage Detection Kit.* (Obtido de *Microbiologique*).

Embora a detecção direta seja vantajosa em cenários emergentes, o tempo de enriquecimento, para aumentar a sensibilidade, pode limitar a aplicabilidade para situações que exigem resultados rápidos.

Da mesma forma, o *Chai + PIKA Beer Spoilage Detection Kit* da *Chai Bio* realiza a detecção direta com PCR em tempo real, identificando contaminantes como bactérias do ácido lático e leveduras selvagens com sensibilidade de até 10 CFU/mL em 2 horas, ou 1 célula por amostra com enriquecimento de 48 horas (Chai Bio, 2024). Novamente, embora eficaz, os tempos de enriquecimento necessários podem ser um obstáculo para processos que exigem agilidade.

Portanto, embora os kits de detecção de *BSMs* baseados em PCR representem um avanço significativo em relação aos métodos microbiológicos tradicionais, eles ainda apresentam limitações que precisam ser consideradas. Fatores como a necessidade de equipamentos especializados, custo elevado e a exigência de profissionais treinados podem restringir sua aplicabilidade em determinados contextos industriais. Assim, apesar de serem ferramentas valiosas para o controle microbiológico, há necessidade de aprimoramentos que ampliem sua sensibilidade, especificidade e acessibilidade.

Além disso, a maioria dos kits disponíveis no mercado depende de importação, uma vez que não há fornecedores diretos no Brasil, com exceção da marca *Hygiena*, distribuída no país pela *DiagLabor* (DiagLabor, 2024). Essa dependência reforça a necessidade do desenvolvimento de soluções que reduzam essas limitações, oferecendo maior precisão, sensibilidade e rapidez na detecção dos *BSMs*, tornando o processo mais eficiente para a indústria cervejeira no Brasil.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Técnicas como PCR tem se tornando uma ferramenta essencial para detectar *BSMs* de forma rápida, precisa e sensível, permitindo uma intervenção mais eficaz no controle da qualidade da cerveja quando comparado ao cultivo tradicional. No entanto, a PCR enfrenta desafios como a necessidade de equipamentos especializados, alto custo e a exigência de pessoal treinado para realizar as análises, o que torna a PCR menos acessível e prático, especialmente em situações em que o controle de qualidade é frequente.

A contaminação por *BSMs*, especialmente bactérias produtoras de ácido lático, também representa um desafio contínuo para a indústria cervejeira. A resistência que algumas espécies possuem aos compostos antimicrobianos do lúpulo pode ser agravada pela transferência de

genes de resistência, o que resulta na proliferação exacerbada e de difícil controle, podendo levar ao comprometimento da qualidade do produto.

Além das bactérias lácticas (*LABs*), as bactérias gram-negativas produtoras de ácido acético, embora menos prevalentes, também têm o potencial de prejudicar a cerveja, resultando em *off-flavors*, turbidez e outras alterações indesejáveis. Da mesma forma, os mofos e leveduras, apesar de não serem predominantes na deterioração da cerveja, podem comprometer de forma significativa a qualidade do produto final. Adicionalmente, as leveduras contaminantes, tanto do gênero *Saccharomyces* quanto as não-*Saccharomyces*, que são mais frequentes, podem provocar alterações sensoriais e instabilidades, como superatenuação e a formação de *off-flavors*.

Embora os métodos tradicionais, como o cultivo microbiológico, ainda sejam amplamente utilizados, eles apresentam limitações significativas, como o longo tempo de resposta e resultados imprecisos, o que pode acarretar riscos consideráveis, incluindo a distribuição de lotes contaminados e danos à reputação da marca. Como resposta a esses desafios, métodos mais rápidos e precisos, como a PCR, surgem como uma alternativa.

E, mesmo que esses *kits* de detecção baseados em PCR ofereçam vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultivo, como maior rapidez e especificidade, eles ainda enfrentam desafios como a necessidade de equipamentos e tempo de resposta. Além disso, a aquisição desses *kits* pode ser dificultada por questões logísticas e de custo, uma vez que sua importação nem sempre é simples ou acessível, limitando sua implementação.

Portanto, fica evidente que o desenvolvimento de um método de detecção de *BSMs* que permita detecção rápida, específica e sensível é essencial para garantir maior eficiência na prevenção da contaminação e na manutenção da qualidade da cerveja.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Perguntas e Respostas: Alteração Taxonômica de Espécies do Gênero *Lactobacillus***. Brasília. Gerência-Geral de Alimentos (GGALI), edição 1, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/perguntas-e-respostas-arquivos/Alteracao-taxonomica-de-linhagens-lactobacillus_1a-versao.pdf.

ANUÁRIO DA CERVEJA DE 2024 - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/anuario-da-cerveja.

AKIMOWICZ, M.; BUCKA-KOLENDO, J. MALDI-TOF MS - application in food microbiology. **Acta Biochimica Polonica**, v. 67, n. 3, p. 327-332, 14 set. 2020. DOI: 10.18388/abp.2020_5380.

ARNOLD, M. J.; RITTER, S. W.; EHRMANN, M. A.; KURNIAWAN, Y. N.; SUZUKI, K.; BECKER, T. M.; LIEBL, W. Carbohydrate metabolism differentiates *Pectinatus* and *Megasphaera* species growing in beer. **Microorganisms**, v. 12, n. 10, p. 2045, 10 out. 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12102045.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA (CERVBRASIL). 2018. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/.

BENACCHIO, A.; PADILHA, J. C.; ARRIECHE, L. S. Protótipo de bancada automatizado para produção de cerveja: sistema preciso, estável e sustentável. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, São José dos Pinhais, v. 16, n. 9, p. 15440-15459, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.55905/revconv.16n.9-099.

BERGSVEINSON, J.; BAECKER, N.; PITTET, V.; ZIOLA, B. Role of Plasmids in *Lactobacillus* brevis BSO 464 Hop Tolerance and Beer Spoilage. Saskatoon. **Journals ASM**. 2015. DOI: 10.1128/AEM.02870-14.

BIOMÉRIEUX. Beer Quality Testing Assay White Paper. Disponível em: https://www.biomerieux.com/us/en/education/resource-hub/white-papers/food-safety-white-papers/beer-quality-testing-assay-white-paper.html.

BIOSAN. O que é *Clean-In-Place* (CIP) e como funciona. 2022. Disponível em: https://biosan.net.br/o-que-e-clean-in-place-cip-e-como-funciona/.

BOUCHEZ, A.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in sour beer production: friend or foe? **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 957167, 4 ago. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.957167.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast & fermentation**. London: Blackwell Publishing, 2006. p. 510-585.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing: science and practice**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 606-649. DOI: 10.1201/9780203024195.

CAVALCANTE, L. T. C.; OLIVEIRA, A. A. S. Métodos de revisão bibliográfica nos estudos científicos. **Psicologia em Revista,** Belo Horizonte, v. 26, n. 1, p. 82-100, jan./abr. 2020. DOI: 10.5752/P.1678-9563.2020v26n1p82-100.

CHAI BIO. Beer Spoilage Organism PCR Test for Brewery Micro QC. Disponível em: https://www.chaibio.com/beer-spoilage.

CHARLES RIVER LABORATORIES. Sistema automatizado para identificação de bactérias MALDI-TOF Axcess®. Disponível em: https://www.medicalexpo.com/pt/prod/charles-river-laboratories/product-128356-945231.html.

CONDINA, M. R.; DILMETZ, B. A.; BAZAZ, S. R.; MENESES, J.; EBRAHIMI WARKIANI, M.; HOFFMANN, P. Rapid separation and identification of beer spoilage bacteria by inertial microfluidics and MALDI-TOF mass spectrometry. ***Lab on a Chip***, [s.l.], v. 19, n. 11, p. 1961-1970, 2019. DOI: 10.1039/c9lc00152b.

DIAG-LABOR. Kit detecção Lactobacillus. Disponível em: https://diag-labor.com.br/produto/kit-deteccao-lactobacillus.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Revisão: Produção De Cerveja: Microrganismos Deteriorantes e Métodos De Detecção. **Braz. J. Food Technol**., v. 10, n. 4, p. 240-251, 2007. Disponível em: https://hdl.handle.net/1822/16769.

ESMAEILI, S.; MOGHARRABI, M.; SAFI, F.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; BAGHERIPOOR-FALLAH, N. The Common Spoilage Microorganisms Of Beer: Occurrence, Defects And Determination: A Review. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 68-73, 2015.

FEYEREISEN, M.; MAHONY, J.; O'SULLIVAN, T.; BOER, V.; VAN SINDEREN, D. A plasmid-encoded putative glycosyltransferase is involved in hop tolerance and beer spoilage in *Lactobacillus brevis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 3, p. e02268-19, 2020. DOI: 10.1128/AEM.02268-19.

FREEPIK. Natureza morta: arranjo de química do Dia da Ciência Mundial. 2021. Fotografia. Disponível em: https://br.freepik.com/fotos-gratis/natureza-morta-arranjo-de-quimica-do-dia-da-ciencia-mundial_19334020.htm.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIC, V.; TACCARI, M.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. Chicago. **Journal of Food Science**. Food Microbiology & Safety. 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.13112.

HAYASHI, N.; ARAI, R.; TADA, S.; TAGUCHI, H.; OGAWA, Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. **Food Microbiology**, v. 24, n. 7-8, p. 778-785, out./dez. 2007. DOI: 10.1016/j.fm.2007.01.007.

HAYASHI, N.; ITO, M.; HORIIKE, S.; TAGUCHI, H. et al. Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus*

brevis strains capable of growing in beer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 596–603, 2001. DOI: 10.1007/s002530100600.

HILL, A.E. Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. **Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition**, 2015. p. 271-286. DOI: 10.1016/B978-1-78242-331-7.00013-7.

HYGIENA. foodproof® Beer Screening Kit. Bactérias de deterioração da cerveja. Disponível em: https://www.hygiena.com/pt-br/seguranca-alimentar/deteccao-de-organismos-de-deterioracao/bacterias-de-deterioracao-da-cerveja-0.

INTERPRISE BRASIL. MinION – Sequenciador de DNA/RNA. Disponível em: https://lojainterprise.com.br/produtos/equipamentos/sequenciadores-dna-rna/minion/.

JANAGAMA, H. K.; MAI, T.; HAN, S.; NADALA, L. M.; NADALA, C.; SAMADPOUR, M. Dipstick assay for rapid detection of beer spoilage organisms. **Journal of AOAC International**, 2018, v. 101, n. 6, p. 1913-1919. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0479.

JUVONEN, R.; HAIKARA, A. Amplification facilitators and pre-processing methods for PCR detection of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia in brewery samples. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 167-176, 2009. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2009.tb00365.x.

KUBIZNIAKOVÁ, P., KYSELOVÁ, L., BROŽOVÁ, M., HANZALÍKOVÁ, K. & MATOULKOVÁ, D. The role of acetic acid bacteria in brewing and their detection in operation. **Kvasny prumysl**, 67, 511–522, 2021. DOI: 10.18832/kp2021.67.511.

LI, T.; CHEN, X.-B.; CHEN, J.-C.; WU, Q.; CHEN, G.-Q**.** Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy. **Biotechnology Journal**, v. 9, n. 12, p. 1503-1511, dez. 2014. DOI: 10.1002/biot.201400084.

MA, Y.; DENG, Y.; XU, Z.; LIU, J.; DONG, J.; YIN, H.; YU, J.; CHANG, Z.; WANG, D. Development of a propidium monoazide-polymerase chain reaction assay for detection of

viable *Lactobacillus brevis* in beer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, 2017, p. 740–746. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.012.

MANZANO, M.; IACUMIN, L.; VENDRAMES, M.; CECCHINI, F.; COMI, G.; BUIATTI, S. Craft beer microflora identification before and after a cleaning process. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 2011, n. 3, p. 343-351, 2011. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00478.x.

MICROBIOLOGIQUE. Beer Spoilage Detection Kit. Disponível em: https://microbiologique.com/beer-spoilage/.

MOLINA-VERA, C.; MORALES-TLALPAN, V.; CHAVEZ-VEGA, A.; URIBE-LÓPEZ, J.; TRUJILLO-BARRIENTOS, J.; CAMPOS-GUILLÉN, J.; CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; GARCÍA-GASCA, T.; SALDAÑA, **C.** The killer *Saccharomyces cerevisiae* toxin: from origin to biomedical research. **Microorganisms**, v. 12, n. 12, p. 2481, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12122481.

NESTEROVA, E.; MOROZOVA, P.; GLADKIKH, M.; KAZEMZADEH, S.; SYROMYATNIKOV, M. Molecular methods for detecting microorganisms in beverages. **Beverages**, v. 10, n. 2, p. 46, jun. 2024. DOI: 10.3390/beverages10020046.

OLDHAM, R. C.; HELD, M. A. Methods for detection and identification of beer-spoilage microbes. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1217704.

PLATAFORMA NACIONAL DE INFRAESTRUTURA DE PESQUISA. Informações sobre equipamentos - Espectrômetro de massas Autoflex II (MALDI -TOF/TOF). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Disponível em: https://pnipe.mcti.gov.br/equipment/5683.

RODHOUSE, L.; CARBONERO F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. Arkansas, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 59:3, 462-473. 2017. DOI: 10.1080/10408398.2017.1378616.

RODRÍGUEZ-SAAVEDRA, M.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria From Craft Brewery Microbiota: Microbiological Quality

And Food Safety. **Food Research International**, v. 109, p. 109762, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109762.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology,** v. 89, n. 2–3, p. 105–124, 2003. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00153-3.

SAKAMOTO, K.; MARGOLLES, A.; VAN VEEN, H.W.; KONINGS, W.N. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. [S.l]. **Journal of Bacteriology**. 2001. DOI: 10.1128/JB.183.18.5371-5375.2001.

SCHURR, B. C.; BEHR, J.; VOGEL, R. F. Detection of acid and hop shock induced responses in beer spoiling *Lactobacillus brevis* by MALDI-TOF MS. **Food Microbiology**, v. 46, p. 501-506, abr. 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.09.018.

SHINOHARA, Y.; KURNIAWAN, Y. N.; SAKAI, H.; MAGARIFUCHI, T.; SUZUKI, K. Nanopore based sequencing enables easy and accurate identification of yeasts in breweries. **Journal of the Institute of Brewing**, 20 jan. 2021. DOI: 10.1002/jib.639.

SHUTTERSTOCK. *Aspergillus niger on Sabouraud Dextrose Agar, 3D illustration*. Disponível em: https://www.shutterstock.com/pt/image-photo/aspergillus-niger-on-sabouraud-dextrose-agar-1507561370.

STEWART, G.G.; PRIEST, F.G. Handbook of Brewing (2nd ed.). Boca Raton, **CRC Press**. 2006. DOI: 10.1201/9781420015171.

STORGÅRDS, E.; TAPANI, K.; HARTWALL, P.; SALEVA, R.; SUIHKO, M.-L. Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 64, n. 1, p. 8-15, jan. 2006. DOI: 10.1094/ASBCJ-64-0008.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; OZAKI, K.; YAMASHITA, H. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic

acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5089–5097, set. 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5089-5097.2005.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 2, p. 137-144, 2006. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x.

SUZUKI, K.; KOYANAGI, M.; YAMASHITA, H. Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 946–953, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02244.x.

TURVEY, M. E.; WEILAND, F.; MENESES, J.; STERENBERG, N.; HOFFMANN, P. Identification of beer spoilage microorganisms using the MALDI Biotyper platform. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2761–2773, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7344-8.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer — A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 4, p. 338-350, 2005. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x.

VITAL.LY. *Levilactobacillus brevis:* Monograph 1556. [S.d.]. Disponível em: https://www.vital.ly/trc/Levilactobacillus-brevis/monograph=1556/.

WIEME, A. D.; SPITAELS, F.; AERTS, M.; DE BRUYNE, K.; VAN LANDSHOOT, A.; VANDAMME, P. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 41-50, ago. 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.003.

XU, Z., LUO, Y., MAO, Y., PENG, R., CHEN, J., SOTEYOME, T., BAI, C., CHEN, L., LIANG, Y., SU, J., WANG, K., LIU, J., & KJELLERUP, B. V. Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. [S.l]. **Journal of microbiology and biotechnology**, 30(7), 955–961, 2020. DOI: 10.4014/jmb.1908.08069.

WT DISTRIBUIDORA. Saiba o que é e como funciona a limpeza CIP. 2021. Disponível em: https://wtdistribuidora.com.br/blog/saiba-o-que-e-e-como-funciona-a-limpeza-cip.

ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C. M. A. P., HARRIS, H. M. B., MATTARELLI, P., O'TOOLE, P. W., POT, B., VANDAMME, P., WALTER, J., WATANABE, K., WUYTS, S., FELIS, G. E., GANZLE, M. G., LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
MARIA VITÓRIA CAVALHEIRO BERLOFA

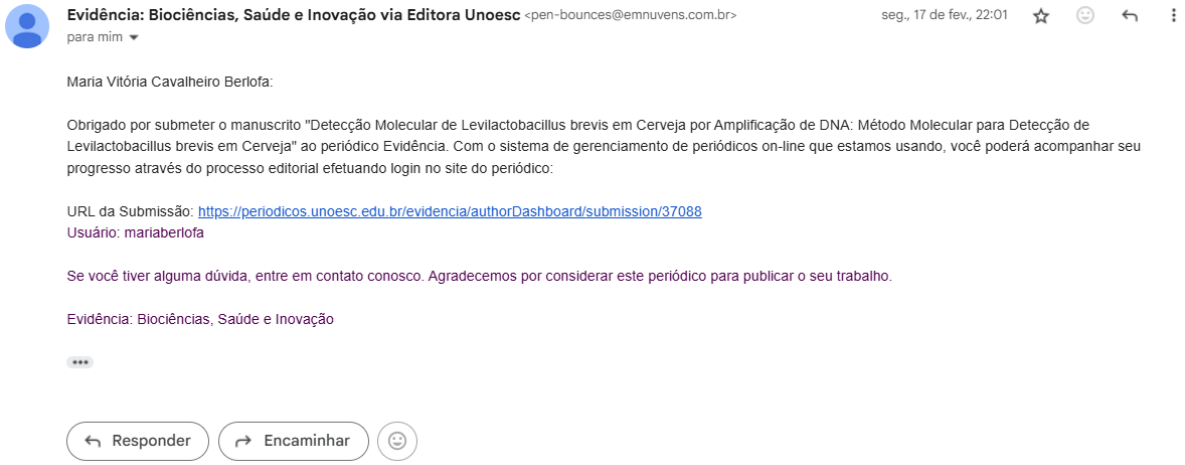
CAPÍTULO II – ESTUDO EXPERIMENTAL

DETECÇÃO MOLECULAR DO CONTAMINANTE DE CERVEJA, *LEVILACTOBACILLUS BREVIS*, POR MEIO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA

Mogi das Cruzes, SP
2025

ARTIGO SUBMETIDO

O Capítulo II, intitulado "Detecção Molecular do Contaminante de Cerveja, *Levilactobacillus brevis*, por Meio de Amplificação de DNA", foi submetido para publicação na Revista Científica Evidência: Biociências, Saúde e Inovação, ISSN: 1519-5287, e-ISSN: 2236-6059 (Qualis CAPES B1 – Biotecnologia). As normas do periódico estão disponíveis em Anexo I.



Evidência: Biociências, Saúde e Inovação via Editora Unoesc <pen-bounces@emnuvens.com.br> seg., 17 de fev., 22:01

para mim

Maria Vitória Cavalheiro Berlofa:

Obrigado por submeter o manuscrito "Detecção Molecular de Levilactobacillus brevis em Cerveja por Amplificação de DNA: Método Molecular para Detecção de Levilactobacillus brevis em Cerveja" ao periódico Evidência. Com o sistema de gerenciamento de periódicos on-line que estamos usando, você poderá acompanhar seu progresso através do processo editorial efetuando login no site do periódico:

URL da Submissão: https://periodicos.unoesc.edu.br/evidencia/authorDashboard/submission/37088
Usuário: mariaberlofa

Se você tiver alguma dúvida, entre em contato conosco. Agradecemos por considerar este periódico para publicar o seu trabalho.

Evidência: Biociências, Saúde e Inovação

Responder Encaminhar

UNOESC
Fazendo parte da sua vida

evidência
BIOCIÊNCIAS, SAÚDE E INOVAÇÃO
evidence: bioscience, health and innovation
e-issn 2236-6059

Artigo original

Detecção Molecular de *Levilactobacillus brevis* em Cerveja por Amplificação de DNA

Método Molecular para Detecção de *Levilactobacillus brevis* em Cerveja

Maria Vitória Cavalheiro Berlofa*, Yara Natércia Lima Faustino de Maria, Milena Coutinho Natucci, David Aciole Barbosa, René Aduan Júnior, Fabiano Bezerra Menegidio, Luiz Roberto Nunes, Daniela Leite Jabes.

*autor correspondente: mariavitoriacavalheiro@gmail.com

Seção: Inovação

Resumo: O setor cervejeiro brasileiro é um dos maiores empregadores do país e um pilar econômico significativo, responsável pela produção de bilhões de litros de cerveja anualmente. No entanto, enfrenta desafios relacionados à contaminação por microrganismos deteriorantes de cerveja, como *Levilactobacillus brevis*, que comprometem a qualidade do produto e geram prejuízos econômicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de *primers* para a detecção específica de *L. brevis* a partir da aplicação das técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), a partir de testes de sensibilidade e especificidade. Os resultados demonstraram que os *primers* desenvolvidos apresentaram eficiência, porém razoável especificidade para a detecção de *L. brevis*. O LAMP se revelou uma alternativa promissora à PCR, com alta sensibilidade, amplificando até 100 fg/µL de DNA genômico. Contudo, desafios como a inespecificidade do LAMP em relação a espécies semelhantes e a necessidade de aprimorar a sensibilidade para amostras com baixa concentração de células foram identificados. Este estudo confirma o potencial de métodos moleculares como PCR e, especialmente, o LAMP, ressaltando a importância de aprimorar continuamente as técnicas para garantir soluções rápidas e eficazes para o controle de qualidade na indústria cervejeira.

Palavras-chave: Cerveja, Diagnóstico, DNA, Indústria Cervejeira, *Levilactobacillus brevis.*

Molecular Detection of the Beer Contaminant *Levilactobacillus brevis* Through DNA Amplification

Molecular Detection of *Levilactobacillus brevis* in Beer by DNA Amplification

Abstract: The Brazilian brewing sector is one of the largest employers in the country and a significant economic pillar, responsible for the production of billions of liters of beer annually. However, it faces challenges related to contamination by Beer Spoilage Microorganisms (BSMs), such as *Levilactobacillus brevis*, which compromise product quality and cause economic losses. This study aimed to evaluate the efficiency of specific primers for the detection of *L. brevis* using PCR and LAMP techniques, addressing issues of sensitivity and specificity. The results demonstrated that the developed primers showed good efficiency and specificity for the detection of *L. brevis*. LAMP proved to be a promising alternative to PCR, with high sensitivity, amplifying up to 100 fg/µL of genomic DNA. However, challenges such as PCR's lack of specificity towards similar species and the need to improve sensitivity for samples with low cell concentrations were observed. This study confirms the potential of molecular methods such as PCR and, particularly, LAMP, highlighting the importance of continuously improving these techniques to ensure fast and effective solutions for quality control in the brewing industry.

Keywords: Beer, Diagnosis, DNA, Brewing Industry, *Levilactobacillus brevis*.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Indústria Cervejeira do Brasil e a Contaminação Microrganismos Contaminantes de Cerveja (*Beer Spoilage Microorganisms - BSMs*)

O setor cervejeiro brasileiro é um dos mais tradicionais do país e abrange uma cadeia produtiva que se estende desde o agronegócio até pequenos varejos. Destaca-se como um dos pilares da economia nacional, emprega mais de 2,7 milhões de pessoas e se posiciona entre os maiores empregadores do Brasil, sendo um significativo impulsionador do desenvolvimento econômico (Bressan *et al.*, 2020; Anuário da Cerveja de 2024 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2024; CervBrasil, 2024).

A produção de cerveja envolve a maltagem dos grãos para converter amidos em açúcares fermentáveis, seguida pela moagem e mistura com água para formar o mosto, que é

fervido com lúpulo para conferir aroma, amargor e efeito antibacteriano. Após o resfriamento, o mosto é fermentado por leveduras *Saccharomyces*, convertendo carboidratos em álcool. O processo final inclui floculação, centrifugação, filtração e maturação (15 a 30 dias). Antes do envase, a cerveja é pasteurizada para eliminar microrganismos e estabilizar o produto, diferindo do chope, que não passa por essa etapa (Stewart; Priest, 2006; Rodhouse; Carbonero, 2017; Thongon *et al*., 2023).

A fabricação de cerveja enfrenta desafios relacionados à qualidade e segurança do produto final, especialmente devido à contaminação por *Beer Spoilage Microorganisms* (*BSMs*). Embora a cerveja possua propriedades microbicidas, como baixo pH, baixa concentração de oxigênio, alta concentração de dióxido de carbono e adição de lúpulo, algumas bactérias e leveduras conseguem crescer e comprometer sua qualidade (Sakamoto; Konings, 2003; Garofalo *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017).

A contaminação pode ocorrer a partir das matérias-primas, do ambiente de produção ou pela adição de ingredientes aromatizantes, representando um problema crítico que pode afetar a aceitação do produto pelos consumidores e gerar desperdícios significativos (Sakamoto; Konings, 2003; Garofalo *et al*., 2015; Rodhouse; Carbonero, 2017).

Os *BSMs* incluem bactérias produtoras de ácido lático dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Jevons; Quain, 2022), bactérias Gram-negativas aeróbicas como *Acetobacter* (Kubizniaková *et al*., 2021) e anaeróbicas como *Zymomonas* e *Megasphaer* (Dragone *et al*., 2007). Também estão presentes leveduras aeróbicas, como as dos gêneros *Brettanomyces* (Powell; Kerruish, 2017) e *Saccharomyces diastaticus* (Briggs *et al*., 2004), além de fungos miceliais como os gêneros *Alternaria*, *Fusarium* (Esmaieli *et al*., 2015) e *Aspergillus* (Vaughan *et al*., 2005). Esses microrganismos deteriorantes podem comprometer a bebida, causando turbidez, acidez e/ou cheiro desagradável devido à presença de compostos gerados pelo metabolismo dos próprios *BSMs* (Xu *et al*., 2020).

O lúpulo na cerveja possui efeito antibacteriano devido aos ionóforos de prótons e iso-α-ácidos, que inibem bactérias gram-positivas, incluindo as ácido-lácticas (Suzuki et al., 2005). No entanto, algumas espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam resistência a esses compostos e são responsáveis por cerca de 70% dos casos de deterioração da cerveja (Hayashi *et al*., 2001; Suzuki *et al*., 2005; Bergsveinson *et al*., 2015).

Levilactobacillus brevis é o principal contaminante da indústria cervejeira, sendo sua resistência associada ao gene *horA*, que atua como bomba de efluxo, removendo compostos antibacterianos do lúpulo. Outros genes, como *horC* e *hitA*, também auxiliam na resistência, promovendo a expulsão de iso-α-ácidos e o equilíbrio iônico celular. A disseminação desses

genes por plasmídeos dificulta o controle microbiológico, exigindo estratégias eficazes para prevenir a contaminação por *L. brevis* (Suzuki *et al*., 2004; Asano *et al*., 2019; Feyereisen *et al*., 2020).

2.2. Técnicas de detecção

Atualmente, a detecção de *BSMs* na indústria é feita principalmente por análises de crescimento em cultivo com meios seletivos, um processo que leva cerca de sete dias para fornecer resultados. Esse tempo pode permitir que a cerveja deteriorada seja distribuída antes das análises, gerando custos financeiros com recolhimento dos produtos e risco de danos à credibilidade da marca (Sakamoto; Konings, 2003; Condina *et al*., 2019).

A PCR é uma técnica molecular eficaz para detectar BSMs, oferecendo resultados rápidos e precisos em comparação com métodos de cultivo. Estudos indicam que pode identificar *Lactobacillus brevis* e até 12 espécies por PCR multiplex, incluindo genes de resistência como *horA* e *horC* (Garofalo et al., 2015; Asano et al., 2019; Sakamoto; Konings, 2003; Condina et al., 2019).

Como alternativa, a técnica *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) se destaca por sua sensibilidade e rapidez, operando em temperatura constante e dispensando o uso de termocicladores, ao contrário da PCR. Sua alta especificidade e facilidade de aplicação tornam o LAMP uma opção promissora para o controle microbiológico na indústria cervejeira, oferecendo uma abordagem mais acessível e eficiente para a detecção de contaminantes (Augustine *et al*., 2020; Soroka *et al*., 2021).

2.3. *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

Desenvolvida em 1998, a técnica LAMP é rápida e sensível para a detecção de microrganismos, operando em temperatura constante sem necessidade de equipamentos sofisticados. Utiliza múltiplos *primers* para amplificar até oito regiões (Figura 1) do DNA-alvo, garantindo alta especificidade e eficiência superior à PCR (Notomi et al., 2000; Srividya et al., 2019; Chaouch, 2020; Augustine et al., 2020; Soroka et al., 2021). O design dos *primers* inclui pares internos, externos e de *loop*, formando uma estrutura semelhante a um "haltere", que

melhora a amplificação e reduz o tempo da reação em 50% (Augustine et al., 2020; Chaouch, 2020; Soroka et al., 2021).

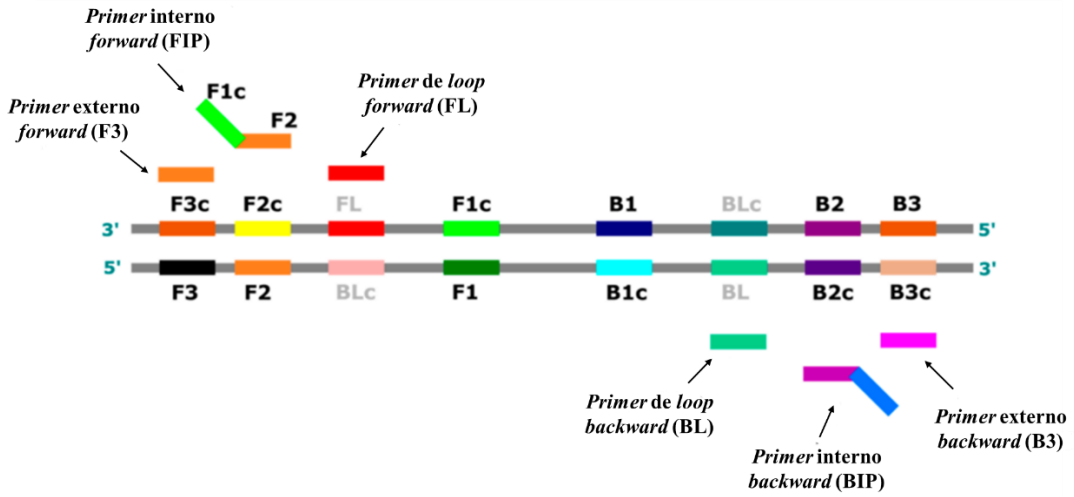


Figura 1 - *Primers* utilizados na reação de LAMP. O *primer* interno *forward* (FIP) possui uma região F2, que é complementar à sequência F2c do molde, e uma região livre F1c, complementar à F1 da nova fita formada. O *primer* interno *backward* (BIP) contém a região B2, complementar à B2c do molde, e a região livre B1c, complementar à B1 da nova fita formada. O *primer* externo *forward* (F3) possui uma região F3, complementar à F3c do molde, enquanto o *primer* externo *backward* (B3) apresenta uma região B3, complementar à B3c do molde. O *primer* de *loop forward* (FL) é complementar à alça de fita simples formada entre as regiões F2 e F1, e o *primer* de *loop backward* (BL) é complementar à alça de fita simples formada entre as regiões B2 e B1 (adaptado de Soroka *et al.*, 2021).

A técnica LAMP dispensa a desnaturação do DNA, pois a polimerase Bst, derivada de *Bacillus stearothermophilus*, permite a amplificação em temperatura constante (60-65°C), eliminando a necessidade de termociclador. O processo envolve produção do material inicial, amplificação cíclica e elongação com reciclagem, gerando DNA de fita dupla (Notomi et al., 2000; Srividya et al., 2019; Augustine et al., 2020; Soroka et al., 2021). A detecção pode ser feita por colorimetria, fluorescência, turbidimetria ou eletroforese, com destaque para o vermelho fenol (*phenol red*), que muda de rosa para amarelo em reações positivas, facilitando a interpretação dos resultados (Srividya et al., 2019; Augustine et al., 2020; Chaouch, 2020; Soroka et al., 2021).

O LAMP e o qPCR são técnicas comparáveis em sensibilidade e especificidade, mas o LAMP se destaca por ser mais rápido, simples e acessível, dispensando termocicladores sofisticados (Hanifehpour et al., 2024). O RT-LAMP (sigla em inglês para transcrição reversa seguida por amplificação isotérmica mediada por *loop*) demonstrou 93-94% de precisão na detecção do SARS-CoV-2, com menor necessidade de infraestrutura (Pourakbari et al., 2023),

e em alguns casos, como na identificação de *Aeromonas hydrophila*, superou o qPCR em sensibilidade (Gao et al., 2023).

Além disso, é uma alternativa viável para fitopatologia e diagnóstico de COVID-19, especialmente em locais com infraestrutura limitada (Ikeda et al., 2023; Dahmani et al., 2023). A escolha entre LAMP e qPCR depende da aplicação e dos recursos disponíveis, a Tabela 1 compara os custos e tempos de execução das técnicas.

Preço por reação		
Reagentes	**LAMP**	**qPCR**
Primers	R$ 1,07	R$ 0,03
Mix de amplificação	R$ 18,89	R$ 20,14
Placa ou tubo	R$ 0,69	R$ 0,76
Custo total da reação	**R$ 20,65**	**R$ 20,93**
Equipamentos e tempo de reação		
Aparelho de qPCR ou bloco térmico	R$3.055,61	R$ 250.969,26
Insumos	-	R$ 6.144,00
Tempo de reação	**30 min – 1h**	**2h – 3h**

Tabela 1: Comparação dos preços e tempo das reações de LAMP e qPCR. Os valores foram obtidos por meio de cotações realizadas junto às empresas *New England Biolabs*, *Sigma-Aldrich*, Loja Netlab e *Thermo Fisher Scientific*. Foram considerados os seguintes materiais e reagentes: LAMP *Master Mix* (*New England Biolabs*), tubos de 0,2 mL (*Sigma-Aldrich*), banho seco digital e bloco para banho seco (Loja *Netlab*), além de *SYBR Green*, placa para qPCR, serviço de calibração, *primers* e *QuantStudio 5* com *laptop* e *software* (*Thermo Fisher Scientific*). As cotações foram realizadas em janeiro de 2025.

O LAMP tem custo por reação semelhante ao qPCR (R$ 20,65 *vs*. R$ 20,93), mas é mais econômico devido ao menor tempo de resposta (30-60 min *vs*. 2-3 h) e à dispensa de termociclador. Embora os *primers* do LAMP sejam mais caros, o investimento em equipamentos é significativamente menor, tornando-o uma opção acessível (Dahmani et al., 2023). Assim, o LAMP se destaca pela rapidez e acessibilidade, sendo viável para laboratórios com recursos limitados e setores que demandam diagnósticos ágeis, como a indústria cervejeira (Hanifehpour et al., 2024; Pourakbari et al., 2023; Gao et al., 2023; Ikeda et al., 2023).

2.4. Aplicações recentes do LAMP

O LAMP é amplamente utilizado na detecção de microrganismos, atendendo aos critérios ASSURED da OMS pela sua sensibilidade, especificidade e acessibilidade (Kosack et al., 2017). Durante a pandemia, o RT-LAMP mostrou alta eficácia na detecção do SARS-CoV-2, especialmente nas fases iniciais da infecção (Huang et al., 2020; Dong et al., 2021) sendo

útil em locais com infraestrutura limitada (Pu et al., 2022; Mannier; Yoon, 2022; Choi et al., 2023).

Além disso, foi adaptado para detectar vírus como Ebola, Zika, dengue (Oloniniyi et al., 2017; Estrela et al., 2019), adenovírus (Yuan et al., 2019), influenza A (Poon et al., 2005) e herpesvírus (Wang et al., 2015). O TB-LAMP, recomendado pela OMS, mostrou eficácia no diagnóstico rápido da tuberculose (Dayal et al., 2021; Fan et al., 2022), enquanto o mLAMP permite diferenciar *M. tuberculosis* de *Mycobacterium* não tuberculoso (Kim et al., 2021).

O LAMP também tem sido testado no diagnóstico de doenças respiratórias, como pneumonia causada por diversos patógenos (Vergara *et al*., 2020), e em patógenos alimentares, como *E. coli* e *Salmonella* (Zhuang *et al*., 2014; Priya *et al*., 2018). Sua eficácia também é demonstrada no diagnóstico de parasitas, como *Plasmodium* (Selvarajah *et al.*, 2020), e infecções fúngicas, como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (Nakayama *et al*., 2017; Li *et al*., 2023).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a especificidade e sensibilidade de um conjunto de *primers* desenvolvido *in silico* para a detecção de *Levilactobacillus brevis* por meio das técnicas de PCR e LAMP. Para isso, serão cultivados *L. brevis* e microrganismos heterólogos, a fim de testar a especificidade dos *primers*. O DNA genômico extraído será extraído e utilizado em PCR e LAMP para avaliar a sensibilidade e detectar possíveis amplificações cruzadas, assegurando a precisão do método em aplicações industriais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo dos microrganismos

O *Levilactobacillus brevis* e outras bactérias ácido-lácticas foram cultivadas em meio MRS com pH 6,5 ± 0,2. Para meio sólido, foi adicionado 1,5% de ágar. Após o preparo, os microrganismos foram inoculados com alça de platina e incubados a 35°C por até 72 horas.

Na tabela 2, estão os meios de cultivo utilizados para cada um dos microrganismos heterólogos utilizados para o teste de especificidade.

	Microrganismo Heterólogo	Meio de Cultivo	Parâmetros de Crescimento
Bactérias	*Bacillus thuringiensis*	Nutriente Ágar	30°C – 24 h
	Klebsiella aerogenes		28°C – 48 h
	Kocuria kristinae		28°C – 48 h
	Pseudomonas sp.		28°C – 48 h
	Staphylococcus aureus		28°C – 48 h

	Escherichia coli	*Super Optimal*	37°C – 24 h
	Lactococcus lactis	*Broth*	35°C – 72 h
	Zymomonas mobilis	RM	30°C – 48 h
	Lentilactobacillus buchneri	De Man, Rogosa e *Sharpe*	35°C – 48 h
	Lactobacillus buchneri		35°C – 48 h
	Lactiplantibacillus plantarum		35°C – 48 h
	Lactobacillus plantarum		35°C – 48 h
	Pediococcus sp.		35°C – 48 h
	Pediococcus pentosaceus		35°C – 48 h
	Leuconostoc mesenteroides		30°C – 48 h
Fungos	*Alternaria sp.*	*Mannitol Agar*	28°C - 7 dias
	Aspergillus sp.		28°C - 7 dias
	Fusarium verticillioides		28°C - 7 dias
	Trichoderma sp.		28°C - 7 dias
	Candida albicans	*Yeast Peptone Dextrose*	35°C – 24 h
	Paracoccidioides brasiliensis		37°C - 7 dias
	Saccharomyces cerevisiae		30°C – 24 h
	Zygosaccharomyces rouxii		30°C – 24 h
	Brettanomyces bruxellensis		30°C – 48 h
	Wickerhamomyces anomalus		30°C – 24 h
	EC1118 (*S. cerevisae*)		30°C – 24 h
	S288 (*S. cerevisae*)		30°C – 24 h
	Wild Catarina (*S. cerevisae*)		30°C – 24 h
	SA (*S. cerevisae*)		30°C – 24 h
	Sali Fermentada (*S. cerevisae*)		30°C – 24 h
	W303(*S. cerevisae*)		30°C – 24 h

Tabela 2 - Condições de cultivo dos microrganismos heterólogos.

3.2. Extração de DNA genômico

A extração de DNAg foi realizada a partir de 3 mL de cultura crescida *overnight*, seguindo protocolos específicos da *QIAGEN* para bactérias e leveduras, com o kit *DNeasy Blood & Tissue*. A quantificação foi feita por fluorescência no *Quantus* (*Promega*), e a integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3. Reações de PCR

A PCR foi realizada em 25 µL, contendo tampão, dNTPs, $MgCl_2$, primers específicos, *Taq* DNA polimerase e DNA genômico de *L. brevis*. A amplificação seguiu 30 ciclos de

desnaturação (95°C), anelamento (58°C) e extensão (72°C), com validação por eletroforese em gel de agarose 2%.

Os primers, desenhados por bioinformática, garantiram especificidade, evitando amplificações cruzadas. Controles positivos utilizaram primers para 16S rRNA (bactérias) e ITS (fungos), enquanto os negativos substituíram o DNA por água Milli-Q.

3.4. Testes de especificidade e sensibilidade

A especificidade dos *primers* foi avaliada utilizando dois *pools* de DNA genômico (DNAg), um contendo bactérias e outro leveduras, ambos preparados com microrganismos heterólogos a *L. brevis*.

Para os testes de sensibilidade, o DNAg de *L. brevis* foi diluído em série (1:10) para obter concentrações de 10 ng a 1 fg, e PCR convencional e em tempo real foram realizados para determinar o limite de detecção. A amplificação da qPCR foi monitorada por fluorescência com *SYBRGreen*.

3.5. Reações de LAMP

A sensibilidade do LAMP foi avaliada com diluições seriadas do DNAg de *Levilactobacillus brevis* (10 ng a 10 fg), utilizando 1 µL por reação. A amplificação ocorreu com *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix* e *primers* específicos, incubados a 65°C por 1 hora, com detecção pela mudança de cor do *phenol red*. Controles negativos utilizaram água Milli-Q. A especificidade foi testada com *pools* de DNAg ajustados para 10 ng/µL, aplicando 7 µL de cada *pool*, equivalente a 4,375 ng por microrganismo, permitindo avaliar a seletividade dos *primers* para *L. brevis*.

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo e extração de DNAg

Os microrganismos deste estudo foram obtidos da Fundação André Tosello (FAT) e da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI). O *Levilactobacillus brevis* apresentou crescimento em 48 horas, antecipando a extração de DNAg, enquanto os demais microrganismos seguiram os tempos descritos pelos fornecedores.

A extração de DNAg foi realizada com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (*QIAGEN*), seguindo protocolos específicos para bactérias e fungos. A quantificação por fluorescência no sistema *Quantus* (*Promega*) revelou um rendimento de 2,4 µg para *L. brevis*, com bandas íntegras e sem *smear* (Figura 2), indicando alta qualidade do DNA para PCR e LAMP.

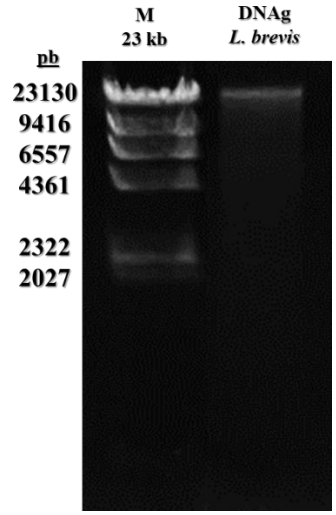


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose da extração de DNAg de *L. brevis*. O perfil da amostra de *Levilactobacillus brevis* mostra uma banda íntegra e sem *smear*, indicando uma extração eficiente e adequada para amplificação. (M) Marcador 23.000 pb (Promega); DNAg de *L. brevis.*

Os DNAg extraídos dos demais microrganismos apresentaram concentrações adequadas para amplificação, conforme detalhado na Tabela 3. Valores acima de 1 µg foram considerados satisfatórios, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade das análises.

	Microrganismo Heterólogo	Rendimento
Bactérias	*Bacillus thuringiensis*	2,2 µg
	Citrobacter freundii	12,7 µg
	Klebsiella aerogenes	18 µg
	Kocuria kristinae	1,9 µg
	Pseudomonas sp.	1,5 µg
	Staphylococcus aureus	3 µg
	Escherichia coli	5,8 µg
	Lactococcus lactis	16,3 µg
	Zymomonas mobilis	4,9 µg
	Lentilactobacillus buchneri	2, 1 µg
	Lactobacillus buchneri	2,8 µg
	Lactiplantibacillus plantarum	3,6 µg
	Lactobacillus plantarum	4,2 µg
	Pediococcus sp.	1,8 µg
	Pediococcus pentosaceus	3,3 µg
	Leuconostoc mesenteroides	4,9 µg
Fungos	*Alternaria sp.*	7,8 µg
	Aspergillus sp.	6,3 µg
	Fusarium verticillioides	3,7 µg

Trichoderma sp.	3 µg
Candida albicans	2,2 µg
Paracoccidioides brasiliensis	1,9 µg
Saccharomyces cerevisiae	1,9 µg
Zygosaccharomyces rouxii	5,1 µg
Brettanomyces bruxellensis	4,5 µg
Wickerhamomyces anomalus	8,1 µg
EC1118 (*S. cerevisae*)	4,5 µg
S288 (*S. cerevisae*)	3 µg
Wild Catarina (*S. cerevisae*)	1,9 µg
SA (*S. cerevisae*)	2,2 µg
Sali Fermentada (*S. cerevisae*)	3,6 µg
W303(*S. cerevisae*)	2,4 µg

Tabela 3 - Rendimento das extrações de DNAg dos microrganismos heterólogos utilizadas no estudo. Todas as extrações apresentaram rendimentos satisfatórios, com quantidades adequadas de DNAg para a realização dos experimentos subsequentes, garantindo a confiabilidade e a precisão das análises realizadas.

4.2. Reações de PCR

O *set* H, desenvolvido para LAMP, foi sintetizado pela Thermo Fisher Scientific e inclui seis *primers*: internos (FIP, BIP), externos (F3, B3) e de *loop* (LF, LB). Para PCR convencional, foram utilizados apenas os *primers* externos F3 e B3, designados como *forward* e *reverse*. A eficiência do *set* H para *L. brevis* foi avaliada por PCR, com controles positivo e negativo. O controle positivo (16S rRNA) confirmou a integridade do DNAg, enquanto o *set* H gerou amplificação bem-sucedida, resultando em uma banda de aproximadamente 250 pb (Figura 3).

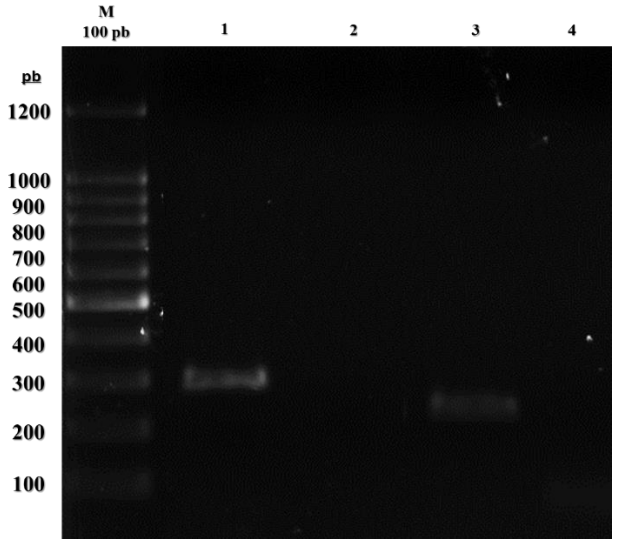


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose para avaliação da amplificação com o set H em *L. brevis***.** O controle positivo amplificou, bem como o *set* H com uma banda visível de aproximadamente 250 pares de bases (pb). (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo *L. brevis*; (2) Controle negativo 16S; (3) Teste *primer* gerado com *L. brevis*; (4) Controle negativo *set* H.

A especificidade do *set* H foi avaliada por PCR utilizando *pools* de DNA de bactérias e fungos, com controles positivos e negativos. Cada reação continha 100 ng de DNA, sendo 6,25 ng por espécie. O controle positivo com *L. brevis* foi incluído para simular as mesmas condições dos *pools*. Os controles positivos amplificaram corretamente, e o *set* H não amplificou o *pool* de fungos, confirmando sua especificidade para bactérias. No entanto, gerou uma banda fraca no pool bacteriano, sugerindo possível amplificação inespecífica.

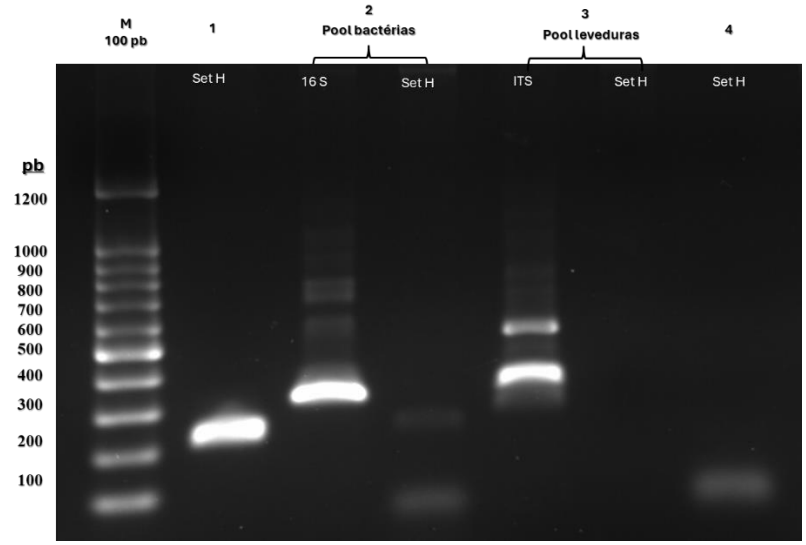


Figura 4 - Avaliação de especificidade do *set* H em PCR. O *pool* de fungos não apresentou amplificação, no entanto, o *pool* bacteriano gerou uma banda fraca, sugerindo possível amplificação inespecífica. (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo *set* H; (2) Controle positivo pool de bactérias 16S e teste *set* H; (3) Controle positivo pool de leveduras ITS e teste *set* H; (4) controle negativo *set* H.

Um teste com *Lactobacillus buchneri* e *Lactiplantibacillus plantarum* mostrou amplificação fraca apenas para *L. buchneri*, sugerindo detecção inespecífica. Isso indica que o *set* H pode identificar tanto *L. brevis* quanto *L. buchneri*, ambos contaminantes cervejeiros.

Para maior especificidade, recomenda-se otimizar a PCR, combinar o *set* H com *primers* adicionais ou usá-lo para triagem inicial seguida de PCR específica.

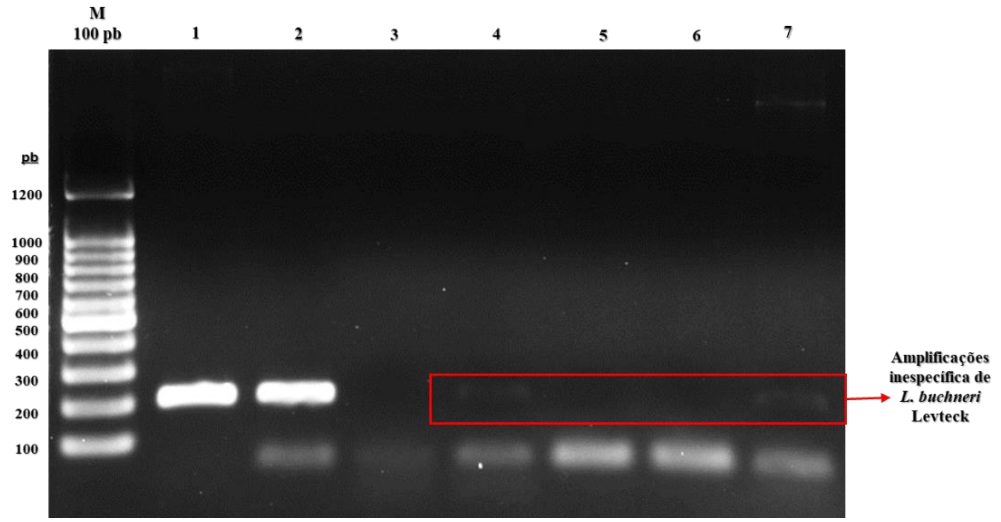


Figura 5 - Teste de especificidade do *set* H para *Lactobacillus*. Apenas *L. buchneri*, isolado da empresa *Levteck*, apresentou uma banda fraca, semelhante ao resultado observado no *pool* de bactérias. (M 100 bp) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) Controle positivo *set* H 10 ng; (2) Controle positivo *set* H 6,25 ng; (3) *L. buchneri* CCT teste *set* H; (4) *L. buchneri* Levteck teste *set* H; (5) *L. plantarum* CCT teste *set* H; (6) *L. plantarum* teste *set* H Levteck; (7) *pool* de bactérias com *set* H.

A sensibilidade do *set H* foi avaliada por PCR com diluições de DNAg de *L. brevis* (10 ng/µL a 1 fg/µL). Conforme ilustrado na Figura 6, os controles negativos não amplificaram, e a menor concentração detectável foi 10 pg/µL. As bandas no gel ficaram menos nítidas em concentrações mais baixas, indicando a redução da sensibilidade dos *primers*.

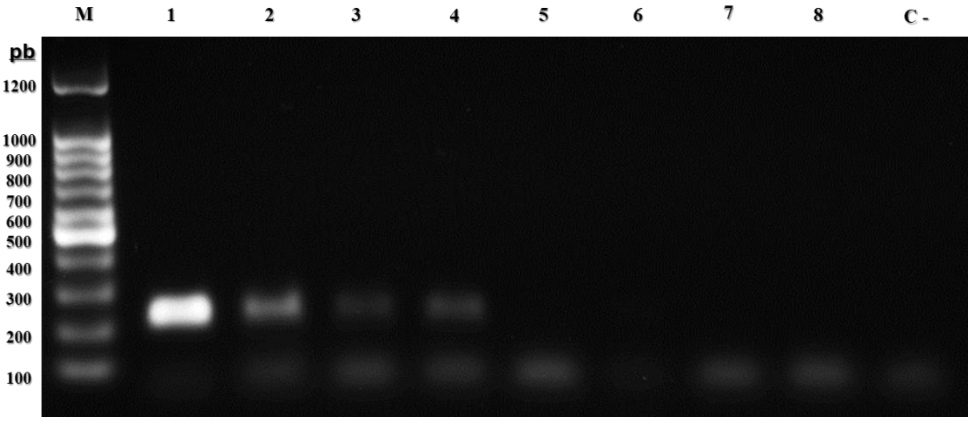


Figura 6 - Teste de sensibilidade do set H para amplificação de *L. brevis*. A concentração mínima detectável foi de 10 pg/µL, e as bandas tornaram-se progressivamente menos nítidas à medida que a concentração de DNAg diminuía. (M) Marcador 100 pb (Sinapse); (1) 10 ng/µL; (2) 1 ng/µL; (3) 100 pg/µL; (4) 10 pg/µL; (5) 1 pg/µL; (6) 100 fg/µL; (7) 10 fg/µL; (8) 1 fg/µL; (C-) Controle negativo.

O PCR quantitativo foi realizado com diluições de *L. brevis* (10 ng/µL a 100 atg/µL). A amplificação ocorreu de 10 ng/µL a 10 fg/µL, sem detecção em concentrações menores, demonstrando maior sensibilidade que o PCR convencional, pois a fluorescência em tempo real permitiu identificar a amplificação nas fases iniciais. O $R^2 = 0,99$ confirmou a alta precisão do experimento (Gráfico 1).

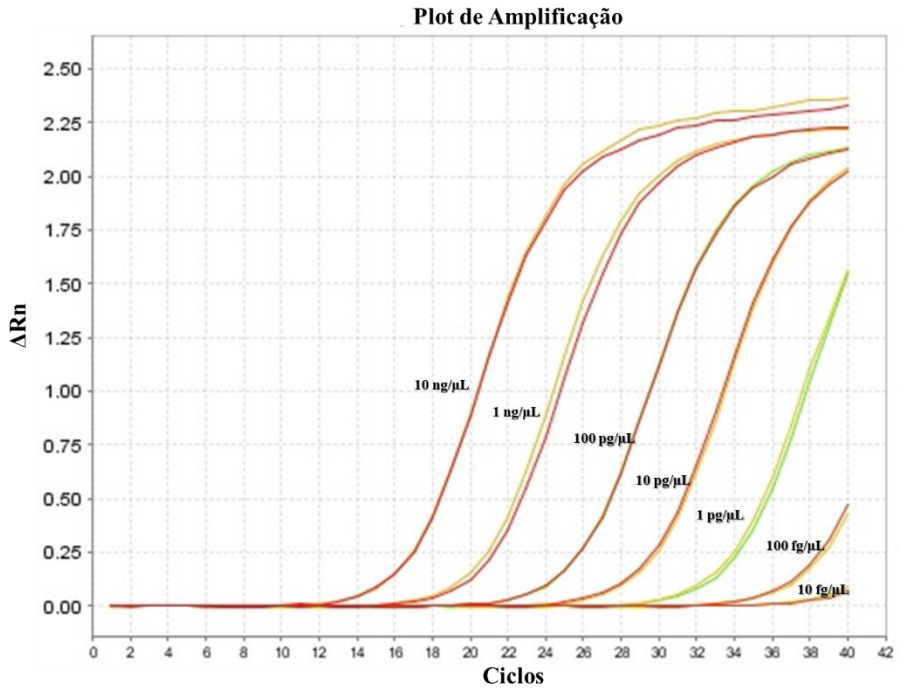


Gráfico 1 - Teste de PCR quantitativo de *L. brevis* com diferentes concentrações de DNAg. O gráfico mostra que a amplificação foi detectada nas concentrações de 10 ng/µL a 10 fg/µL, evidenciando maior sensibilidade do PCR quantitativo em comparação ao PCR convencional.

4.3. Reações de LAMP

A reação de LAMP com DNAg foi realizada usando o *WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix*, que utiliza o corante *phenol red*. Foram testadas concentrações de 10 ng/µL, 100 pg/µL, 100 fg/µL e 10 fg/µL, além de controle negativo. O teste de sensibilidade, mostrado na Figura 8, demonstrou amplificação eficaz nas concentrações de 10 ng/µL, 100 pg/µL e 100 fg/µL, mas não detectou amplificação em 10 fg/µL, indicando que o limite de sensibilidade é em torno de 100 fg/µL, destacando a eficácia do LAMP na detecção de baixas concentrações de DNA de *L. brevis*.

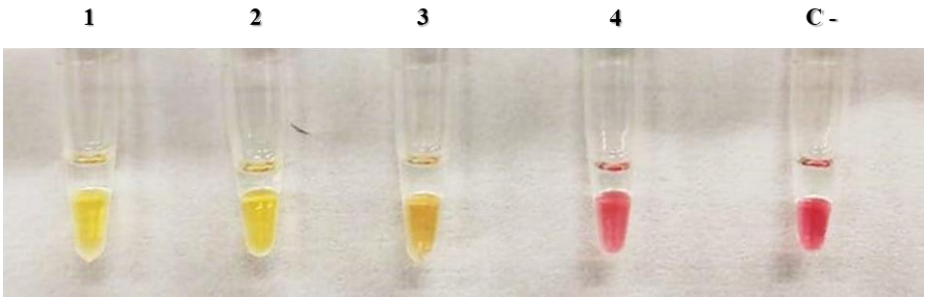


Figura 8 - Análise do teste de LAMP com DNAg de *L. brevis***.** A amplificação bem-sucedida até nas amostras de 10 ng/µL, 100 pg/µL e 100 fg/µL, com exceção da concentração de 10 fg/µL. (1) 10 ng/µL; (2) 100 pg/µL; (3) 100 fg/µL; (4) 10 fg/µL; (C-) Controle negativo.

A especificidade da reação de LAMP foi avaliada utilizando *pools* de DNA de leveduras e bactérias heterólogas a 10 ng/µL, além de um controle positivo com DNA de *Levilactobacillus brevis*. Apenas o controle positivo apresentou amplificação, enquanto os outros *pools* não geraram sinais. O volume da reação foi de 25 µL, com até 7 µL de amostra, totalizando aproximadamente 4,375 ng de DNA por microrganismo.

O teste de sensibilidade (Figura 9) indicou que a detecção é possível até 100 fg/µL, sendo a quantidade de DNA suficiente para o ensaio. A reação foi monitorada em intervalos de 10 minutos, com amplificação observada no controle positivo em 20 minutos, confirmando a eficácia e a especificidade do método para a detecção rápida.

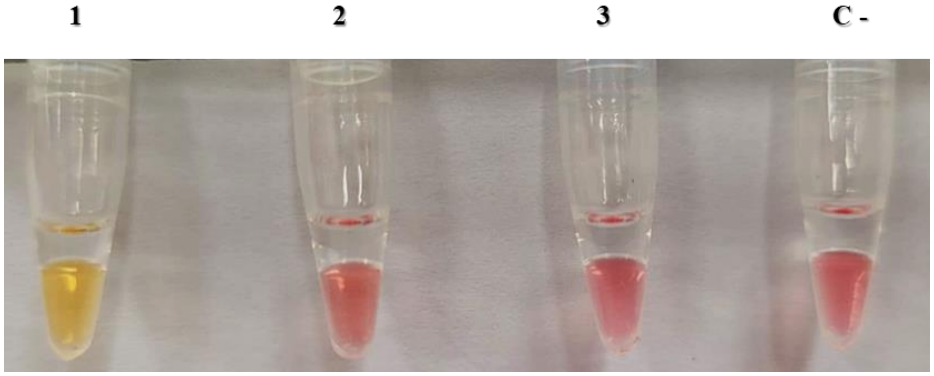


Figura 9 - Análise do teste de especificidade da reação de LAMP para *L. brevis*. Os *pools* de bactérias e fungos não apresentaram amplificação, assim como o controle negativo. (1) Controle positivo *set* H 10 ng; (2) Teste *pool* de bactérias; (3) Teste *pool* de leveduras; (4) controle negativo *set* H.

5. DISCUSSÃO

A busca por técnicas alternativas para detectar *BSMs*, como *Levilactobacillus brevis*, atende à demanda do setor cervejeiro por soluções rápidas e precisas, já que a contaminação afeta a qualidade e aumenta os custos. Métodos tradicionais, como a microbiologia de cultivo, têm limitações quanto ao tempo de resposta, enquanto técnicas moleculares, como PCR e LAMP, são mais rápidas e sensíveis.

Neste estudo, os *primers* específicos para *L. brevis* amplificaram de forma eficiente em ambas as técnicas, mas a PCR teve uma amplificação mínima para *Lactobacillus buchneri*, um contaminante geneticamente próximo (Zheng et al., 2020), sugerindo que ajustes nos *primers* seriam necessários para melhorar a especificidade da detecção exclusiva de *L. brevis*.

Os testes mostraram que a PCR qualitativa detecta até 10 pg/µL de DNA, enquanto a PCR quantitativa (em tempo real) alcança maior sensibilidade, detectando até 10 fg/µL. No entanto, seu alto custo e a necessidade de equipamentos especializados limitam seu uso em cervejarias menores. Já o LAMP, que não requer termociclador e fornece resultados em até uma hora, apresentou alta sensibilidade para *L. brevis* (100 fg/µL), destacando-se como uma alternativa eficiente e acessível para a detecção rápida de contaminantes.

Comparações com outros estudos reforçam a eficácia do LAMP na detecção de *Lactobacillus*. A técnica demonstrou alta sensibilidade, alcançando até 0,1 cópias/µL, embora nesse caso tenha sido utilizado SYBR Green em vez da abordagem colorimétrica empregada no presente estudo. Apesar dessa diferença, o desempenho do LAMP foi igualmente eficaz, permitindo amplificação em concentrações muito baixas (Anyaduba *et al*., 2022; Kim *et al*., 2024).

Outros trabalhos destacam a eficiência do mix de LAMP utilizado, com 100% de sensibilidade e especificidade entre 98,2% e 99,7%, além da detecção de *L. crispatus* em até 10 fg de DNA, um valor ligeiramente mais sensível do que o obtido no presente estudo, mas ainda dentro da mesma faixa. Esses resultados também confirmam a aplicabilidade do LAMP, tornando-o uma ferramenta promissora para diferentes setores, incluindo a indústria cervejeira (Jomoui *et al*., 2022; Illidge *et al*., 2024).

Além disso, a versatilidade do LAMP foi evidenciada na detecção do SARS-CoV-2 utilizando *WarmStart® Colorimetric Master Mix* com SYTO-9® em um termociclador de qPCR. Embora esse protocolo difira do presente estudo, que utilizou apenas detecção visual direta, ambos aplicaram a mesma temperatura de 65°C por 20 minutos, demonstrando a estabilidade da metodologia aplicada no teste de especificidade (Zhang *et al*., 2020).

A técnica colorimétrica também tem sido empregada com sucesso na detecção de *Bovine alphaherpesvirus 1* e *Mycobacterium bovis* em saúde animal (Peltzer *et al*., 2021; Sierra *et al*., 2023). Além disso, foi aplicada para identificar *Fusobacterium nucleatum* com o uso do corante *phenol red*, destacando sua eficiência, sem necessidade de equipamentos sofisticados (Zuraik *et al*., 2024). Esse fator é especialmente relevante para ambientes com recursos limitados, como cervejarias.

Em resumo, a literatura confirma a eficácia do *WarmStart® Colorimetric Master Mix* com *phenol red* na amplificação e detecção de ácidos nucleico e evidencia sua versatilidade no diagnóstico de doenças infecciosas, saúde animal e microbiologia. A combinação de alta sensibilidade, especificidade e simplicidade operacional reforça a relevância dessa técnica para detecções rápidas e acessíveis, especialmente em setores como a indústria cervejeira.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os métodos PCR e LAMP são eficazes para a detecção sensível e específica de *Levilactobacillus brevis*, com boa rapidez e eficiência. Os *primers set* H apresentaram boa sensibilidade e eficiência, sendo uma alternativa viável para detecções rápidas. No entanto, a PCR mostrou inespecificidade para espécies próximas, como *Lactobacillus buchneri*, e a sensibilidade precisa ser aprimorada para amostras não purificadas. Os testes de LAMP confirmaram sua viabilidade, detectando até 100 fg/µL de DNA, porém mais experimentos, como com células lisadas, são necessários para validar o método em amostras de cerveja.

A aplicação do LAMP na indústria cervejeira oferece um potencial inovador para o controle de qualidade, permitindo a detecção rápida de contaminantes, ademais, seu uso em cervejarias ainda é pouco explorado, podendo otimizar processos e reduzir perdas. A integração dessa tecnologia ao setor abre novas oportunidades em biotecnologia industrial. Os resultados deste estudo reforçam a eficácia do LAMP e da PCR na detecção de *Levilactobacillus brevis*, destacando a necessidade de aprimorar a técnica para garantir praticidade, rapidez e acessibilidade no controle de qualidade cervejeiro.

REFERÊNCIAS

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2024). Anuário da cerveja de 2024. Recuperado de https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/anuario-da-cerveja.

Anyaduba, T. D., Otoo, J. A., & Schlappi, T. S. (2022). Picoliter droplet generation and dense bead-in-droplet encapsulation via microfluidic devices fabricated via 3D printed molds. Micromachines, 13(11), 1946. https://doi.org/10.3390/mi13111946.

Asano, S., Shimokawa, M., & Suzuki, K. (2019). PCR analysis methods for detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria. In Methods in Molecular Biology (Vol. 1887, pp. 95-107). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_9.

Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL). (2018). Recuperado de http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/.

Augustine, R., Hasan, A., Das, S., Ahmed, R., Mori, Y., Notomi, T., Kevadiya, B. D., & Thakor, A. S. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. Biology, 9, 182. https://doi.org/10.3390/biology9080182.

Bergsveinson, J., Baecker, N., Pittet, V., & Ziola, B. (2015). Role of plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 hop tolerance and beer spoilage. Journals ASM. https://doi.org/10.1128/AEM.02870-14.

Bressan, P., Geremias, R., & Souza, E. L. (2020). Resíduo da indústria cervejeira como precursor de carvão ativado comparado a outros resíduos agroindustriais: uma revisão. Evidência/Inovação, 20(2). https://doi.org/10.18593/eba.25575.

Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., & Stevens, R. (2004). Brewing: Science and practice (pp. 606-649). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780203024195.

Chaouch, M. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. Reviews in Medical Virology, 31(6), e2215. https://doi.org/10.1002/rmv.2215.

Choi, G., Moehling, T. J., & Meagher, R. J. (2023). Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. Expert Review of Molecular Diagnostics, 23, 9-28. https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2169071.

Condina, M. R., Dilmetz, B. A., Bazaz, S. R., Meneses, J., Ebrahimi Warkiani, M., & Hoffmann, P. (2019). Rapid separation and identification of beer spoilage bacteria by inertial microfluidics and MALDI-TOF mass spectrometry. Lab on a Chip, 19(11), 1961-1970. https://doi.org/10.1039/c9lc00152b.

Dahmani, C. A., Khaldi, F., Derouiche, W., Benyagoub, N., Zenati, L. G. A., Hamidi, W., & Bencheikh, N. (2023). Comparison between RT-qPCR and LAMP methods for a rapid COVID-19 diagnosis in an Algerian sample. In L. Anfossi (Ed.), Rapid Antigen Testing. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.1001116.

Dayal, R., Yadav, A., Agarwal, D., Kumar, M., Kamal, R., Singh, D., Bhatnagar, S. (2021). Comparison of the diagnostic yield of tuberculosis loop-mediated isothermal amplification assay with cartridge-based nucleic acid amplification test, acid-fast bacilli smear microscopy, and mycobacterial growth

indicator tube culture in children with pulmonary tuberculosis. J. Pediatric Infect. Dis. Soc., 10(2), 83-87. https://doi.org/10.1093/jpids/piaa019.

Dong, Y., Wu, X., Li, S., Lu, R., Li, Y., Wan, Z., Qin, J., Yu, G., Jin, X., & Zhang, C. (2021). Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2. Scientific Reports, 11, 2936. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80352-8.

Dragone, G., Mussatto, S. I., Nogueira, A. D., & Almeida e Silva, J. B. (2007). Revisão: Produção de cerveja: Microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. Braz. J. Food Technol., 10(4), 240-251. https://hdl.handle.net/1822/16769.

Esmaeili, S., Mogharrabi, M., Safi, F., Sohravandi, S., Mortazavian, A. M., & Bagheripoor-Fallah, N. (2015). The common spoilage microorganisms of beer: Occurrence, defects, and determination: A review. Carpathian Journal of Food Science and Technology, 7(4), 68-73.

Estrela, P. F. N., Mendes, G. de M., Oliveira, K. G., Bailão, A. M., Soares, C. M. de A., Assunção, N. A., Duarte, G. R. M. (2019). Ten-minute direct detection of Zika virus in serum samples by RT-LAMP. Journal of Virological Methods, 271, 113675. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113675

Fan, L., Guan, B., Cheng, M., Liu, C., Tian, Y., Li, R., Chen, Y. (2022). A comprehensive evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using bronchoalveolar lavage fluid. Infect. Drug Resist., 15, 975-987. https://doi.org/10.2147/IDR.S354660.

Feyereisen, M., Mahony, J., O'Sullivan, T., Boer, V., & Van Sinderen, D. (2020). A plasmid-encoded putative glycosyltransferase is involved in hop tolerance and beer spoilage in *Lactobacillus brevis*. Applied and Environmental Microbiology, 86(3), e02268-19. https://doi.org/10.1128/AEM.02268-19.

Gao, Z., Yang, C., Zhang, X., Hu, B., Zhang, H., Zhang, Z., Kuang, W., Zheng, Q., Cao, J. (2023). Establishment of a rapid LAMP assay for Aeromonas hydrophila and comparison with the application of qPCR. Metabolites, 13(7), 841. https://doi.org/10.3390/metabo13070841.

Garofalo, C., Osimani, A., Milanovic, V., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2015). The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. Journal of Food Science, Food Microbiology & Safety. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13112.

Hanifehpour, H., Ashrafi, F., Siasi, E., & Fallahi, S. (2024). Evaluation and comparison of one-step real-time PCR and one-step RT-LAMP methods for detection of SARS-CoV-2. BMC Infectious Diseases, 24(1), 679. https://doi.org/10.1186/s12879-024-09574-9.

Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., & Taguchi, H. (2001). Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. Applied Microbiology and Biotechnology, 55(5), 596–603. https://doi.org/10.1007/s002530100600.

Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. C., Xiong, D., Wu, W., Yuejiong, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., Chang, H., Zhang, X., Wang, H., Cui, Z. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. Microbial Biotechnology, 13(4), 950–961. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586.

Ikeda, K., Uchihashi, K., Okuda, I., Xiang, Z., Nakayashiki, H. (2023). Specific detection of *Pyricularia oryzae* pathotype *Triticum* using qPCR and LAMP methods. Journal of General Plant Pathology. https://doi.org/10.1007/s10327-023-01162-0.

Illidge, S., Kort, R., Hertzberger, R., & Dutch Crispatus Citizen Science Collective. (2024). 'From women for women': A citizen science approach engaging women in the isolation and application of the vaginal health-associated bacterium *Lactobacillus crispatus*. PLoS One, 19(11), e0308526. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0308526.

Jevons, A. L., & Quain, D. (2022). Identification of spoilage microflora in draught beer using culture-dependent methods. Journal of Applied Microbiology, 133(6), 3728-3740. https://doi.org/10.1111/jam.15810.

Jomoui, W., Srivorakun, H., Chansai, S., & Fucharoen, S. (2022). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) colorimetric phenol red assay for rapid identification of α0-thalassemia: Application to population screening and prenatal diagnosis. PLoS One, 17(4), e0267832. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267832.

Kim, M., Shin, S. W., Shin, J., Kim, E., Yang, S., Gwak, Y., Lee, S., Kim, H. (2024). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid on-site detection of *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* in probiotic products. Food Bioscience, 57, 103562. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103562.

Kosack, C. S., Page, A.-L., & Klatser, P. R. (2017). A guide to aid the selection of diagnostic tests. Bulletin of the World Health Organization, 95(9), 639–645. https://doi.org/10.2471/BLT.16.187468.

Kubizniaková, P., Kyselová, L., Brožová, M., Hanzalíková, K., & Matoulková, D. (2021). The role of acetic acid bacteria in brewing and their detection in operation. Kvasny Prumysl, 67, 511–522. https://doi.org/10.18832/kp2021.67.511.

Li, M., Jin, X., Jiang, Q., Wei, H., Deng, A., Mao, Z., Wang, Y., Zeng, Z., Wu, Y., Liu, S., Kim, J., Wang, X., Liu, Y., Liu, J., Lv, W., Huang, L., Liao, Q., Huang, G., Zhang, L. (2023). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Potential Point-of-Care Testing for Vulvovaginal Candidiasis. Journal of Fungi (Basel), 9(12), 1159. https://doi.org/10.3390/jof9121159.

Mannier, C., & Yoon, J.-Y. (2022). Progression of LAMP as a result of the COVID-19 pandemic: Is PCR finally rivaled? Biosensors (Basel), 12(7), 492. https://doi.org/10.3390/bios12070492.

Nakayama, T., Yamazaki, T., Yo, A., Tone, K., Alshahni, M. M., Fujisaki, R., Makimura, K. (2017). Detection of fungi from an indoor environment using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. Bio, 22(2), 97-104. https://doi.org/10.4265/bio.22.97.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28(12), E63. https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63.

Oloniniyi, O. K., Kurosaki, Y., Miyamoto, H., Takada, A., & Yasuda, J. (2017). Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Journal of Virological Methods, 246, 8-14. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.03.011.

Peltzer, D., Tobler, K., Fraefel, C., Maley, M., & Bachofen, C. (2021). Rapid and simple colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Bovine alphaherpesvirus 1. Journal of Virological Methods, 289, 114041. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114041.

Poon, L. L. M., Leung, C. S. W., Chan, K. H., Lee, J. H. C., Yuen, K. Y., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2005). Detection of Human Influenza A Viruses by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Journal of Clinical Microbiology, 43(1), 427–430. https://doi.org/10.1128/jcm.43.1.427-430.2005.

Pourakbari, R., Gholami, M., Shakerimoghaddam, A., Motavalli Khiavi, F., Mohammadimehr, M., & Shakouri Khomartash, M. (2024). Comparison of RT-LAMP and RT-qPCR assays for detecting SARS-

CoV-2 in the extracted RNA and direct swab samples. Journal of Virological Methods, 324, 114871. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2023.114871.

Powell, C. D., & Kerruish, D. W. M. (2017). Beer spoiling yeasts: genomics, detection, and control. In N. A. Bokulich & C. W. Bamforth (Eds.), Brewing microbiology – current research, omics, and microbial ecology (pp. 289–327). Caister Academic Press. https://doi.org/10.21775/9781910190616.11.

Priya, G. B., Agrawal, R. K., Milton, A. A. P., Mishra, M., Mendiratta, S. K., Agarwal, R. K., Luke, A., Singh, B. R., Kumar, D. (2018). Development and evaluation of isothermal amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Clostridium perfringens* from chevon. Anaerobe, 54, 178–187. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.09.005.

Pu, R., Liu, S., Ren, X., Shi, D., Ba, Y., Huo, Y., Zhang, W., Ma, L., Liu, Y., Yang, Y., & Cheng, N. (2022). The screening value of RT-LAMP and RT-PCR in the diagnosis of COVID-19: systematic review and meta-analysis. Journal of Virological Methods, 300, 114392. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114392.

Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2017). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59(3), 462–473. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616.

Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology, 89(2–3), 105–124. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00153-3.

Selvarajah, D., Naing, C., Htet Htet, N., & Mak, J. W. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: a meta-analysis of diagnostic test accuracy. Malaria Journal, 19(211), 19. https://doi.org/10.1186/s12936-020-03307-2.

Sierra, A., Camelo, D., Lota, C., Arenas, N. E., & Soto, C. (2023). Specific identification of *Mycobacterium bovis* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) targeting the Region of Difference 12 (RD12) of the M. tuberculosis complex. MethodsX, 10, 102223. https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102223.

Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Cells, 10(8), 1931. https://doi.org/10.3390/cells10081931

Srividya, A., Maiti, B., Chakraborty, A., & Chakraborty, G. (2019). Loop Mediated Isothermal Amplification: A Promising Tool for Screening Genetic Mutations. Molecular Diagnosis & Therapy, 23(6), 723–733. https://doi.org/10.1007/s40291-019-00422-0.

Stewart, G. G., & Priest, F. G. (2006). Handbook of Brewing (2nd ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420015171.

Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., & Yamashita, H. (2005). Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 71(9), 5089–5097. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5089-5097.2005.

Suzuki, K., Koyanagi, M., & Yamashita, H. (2004). Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45. Journal of Applied Microbiology, 96(5), 946–953. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02244.x.

Thongon, R., Netramai, S., Kijchavengkul, T., Yaijam, G., & Debhakam, R. (2023). Mathematical modeling and optimization of pasteurization for the internal pressure and physical quality of canned beer. Heliyon, 9(11), e21493. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21493.

Vaughan, A., O'Sullivan, T., & Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. Journal of the Institute of Brewing, 111(4), 338–350. https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x.

Vergara, A., Boutal, H., Ceccato, A., López, M., Cruells, A., Bueno-Freire, L., Moreno-Morales, J., Puig de la Bellacasa, J., Castro, P., Torres, A., Marco, F., Casals-Pascual, C., & Vila, J. (2020). Assessment of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Rapid Detection of Pathogenic Bacteria from Respiratory Samples in Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. Microorganisms, 8(1), 103. https://doi.org/10.3390/microorganisms8010103.

Wang, Y., Wang, Y., Lan, R., Xu, H., Ma, A., Li, D., Dai, H., Yuan, X., Xu, J., & Ye, C. (2015). Multiple Endonuclease Restriction Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification: A Novel Analytically Rapid, Sensitive, Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection Technique. The Journal of Molecular Diagnostics, 17(4), 392–401. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.002.

Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., Bai, C., Chen, L., Liang, Y., Su, J., Wang, K., Liu, J., & Kjellerup, B. V. (2020). Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. Journal of Microbiology and Biotechnology, 30(7), 955–961. https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08069.

Yuan, X. Y., Wang, Y. L., Meng, K., Lan, R., Xu, H., Ma, A., Li, D., Dai, H., Yuan, X., Xu, J., & Ye, C. (2019). LAMP real-time turbidity detection for fowl adenovirus. BMC Veterinary Research, 15, 256. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2015-5.

Zhang, Y., Ren, G., Buss, J., Barry, A. J., Patton, G. C., & Tanner, N. A. (2020). Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. Biotechniques, 69(3), 178–185. https://doi.org/10.2144/btn-2020-0078

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Ganzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107.

Zhuang, L., Gong, J., Li, Q., Zhu, C., Yu, Y., Dou, X., Liu, X., Xu, B., & Wang, C. (2014). Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting bcfD gene. Letters in Applied Microbiology, 59(6), 658–664. https://doi.org/10.1111/lam.12328.

ZuraiK, A. A., Daboul, Y., Awama, M. A., Yazigi, H., Kayasseh, M. A., Georges, M. (2024). Rapid detection of FadA in *Fusobacterium nucleatum* using the quantitative LAMP colorimetric phenol red method in stool samples from colorectal cancer patients. Scientific Reports, 14(1), 13739. https://doi.org/10.1038/s41598-024-62846-x.

ANEXO I – NORMAS DO PERIÓDICO SUBMETIDO

Diretrizes para Autores

INFORMAÇÃO SOBRE CUSTOS
A revista não cobra taxas para submissão, avaliação, edição ou publicação e os trabalhos publicados têm acesso livre.

ARQUIVOS
Para a submissão inicial, solicitamos o envio de dois arquivos, "Capa" e "Manuscrito", e ambos devem ser anexados como "Texto do artigo".
Os dois arquivos devem estar em formato de documento do Microsoft Word (*.doc, *.docx). Pedimos para que o texto tenha formatação mínima. É sugerida, para o corpo do texto, a fonte Times New Roman ou Arial tamanho 12, espaçamento 1,5 e alinhamento justificado.

Capa
Documento de identificação da submissão. Este arquivo não será compartilhado com os Avaliadores.
Ele deve conter as seguintes informações:
1. Título do manuscrito (não exceder 20 palavras);
2. Seção (Biociências, Saúde ou Inovação -- mais informações na seção sobre a revista);
3. Nome completo dos autores, sem abreviações, acompanhados de legenda indicando:
a) Afiliação (departamento/curso/programa, instituto e universidade, seguido de cidade, estado e país);
b) Endereço de e-mail;
c) ORCID-iD (https://orcid.org/).
Observação: a revista limita o número de autores a 9 (nove).
4. Indicar um autor como "autor correspondente", incluindo endereço físico completo para correspondência;
5. Informação de como cada autor contribuiu com o trabalho, sendo observados os tipos de papéis ou funções que caracterizam uma coautoria (adaptado de https://credit.niso.org):
a) Conceituação: Ideias; formulação ou evolução de metas e objetivos de pesquisa relevantes.
b) Curadoria de dados: Atividades de gerenciamento para comentar dados (produzir metadados), limpar dados e manter dados de pesquisa (incluindo código de software, onde for necessário, para interpretar os dados propriamente ditos) para uso inicial e posterior reutilização.
c) Análise formal: Aplicação de técnicas estatísticas, matemáticas, computacionais ou outras técnicas formais para analisar ou sintetizar dados de estudo.
d) Aquisição de financiamento: Aquisição do apoio financeiro para o projeto que deu origem a esta publicação.
e) Investigação: Condução de um processo de pesquisa e investigação, especificamente realizando os experimentos, ou coleta de dados/evidências.
f) Metodologia: Desenvolvimento ou concepção de metodologia; criação de modelos.
g) Administração de projetos: Responsável pela gestão e coordenação do planeamento e execução da atividade de pesquisa.
h) Recursos: Fornecimento de materiais de estudo, reagentes, materiais, pacientes, amostras de laboratório, animais, instrumentação, recursos de computação ou outros instrumentos de análise.

i) Programas de computador: Programação, desenvolvimento de software; concepção de programas de computador; implementação do código de computador e algoritmos de suporte; teste de componentes de código existentes.
j) Supervisão: Responsabilidade de supervisão e liderança para o planejamento e execução da atividade de pesquisa, incluindo orientação para além da equipe principal.
l) Validação: Verificação, seja como parte da atividade ou separadamente, da replicação/reprodutibilidade geral dos resultados/experimentos e outros resultados de pesquisa.
m) Visualização: Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado, especificamente visualização/apresentação de dados.
n) Escrita (rascunho original): Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado, especificamente redação da versão inicial (incluindo tradução substantiva).
o) Escrita (revisão e edição): Preparação, criação e/ou apresentação do trabalho publicado por parte do grupo de pesquisa original, especificamente revisão crítica, comentário ou revisão – incluindo etapas de pré ou pós-publicação.
6. Declaração de conflitos de interesse (na ausência de conflitos de interesse, escrever "os autores não possuem conflitos de interesse a declarar");
7. Informar agências de fomento, se existentes.

Manuscrito
Conteúdo do trabalho, sem informações que possam identificar os autores. Este é o arquivo que será compartilhado com os Avaliadores.
Ele deve conter:
1. Título do manuscrito
- Até 20 palavras.
2. Título curto
- Até 10 palavras.
3. Resumo
Entre 200 e 300 palavras, em texto corrido. Mesmo sem apresentar os subtítulos para cada parte, a seguinte estrutura deve ser levada em consideração:
a) aspectos-chave do problema de pesquisa;
b) justificativa;
c) métodos;
d) resultados;
e) conclusões/implicações.
3. Palavras-chave
- 3-5 palavras-chave correspondentes aos DeCS/MeSH, em ordem alfabética.
4. Title, abstract e keywords
- Repetir os itens "1", "2" e "3" em inglês, respeitando as mesmas normas. Se a submissão for em inglês, solicita-se o envio desses itens também em português.
5. Corpo do texto
- Para um trabalho baseado em dados originais, são esperadas até 5000 palavras (sem contar com legendas para figuras e tabelas);
- Incluir numeração de linhas;
- Se necessário grifar alguma passagem no corpo do texto, utilizar somente itálicos;
- Evitar o uso de listas no corpo do texto (numeradas, com bullet points, etc.);
- Não utilizar citações diretas (entre aspas; transcrições diretas da fonte original), exceto se for para algum conceito ou definição estabelecida.
5.1. Seções e subseções
- Para artigos originais e revisões sistemáticas, dividir nas seções "Introdução", "Material e métodos", "Resultados", "Discussão" e "Conclusão". Obs.: É permitida a submissão com a

mescla das seções "Resultados" e "Discussão", mas se este formato não for considerado pertinente para o trabalho em questão, pode ser solicitada a sua separação. Assim, recomenda-se a submissão das seções individualizadas;
- Relatos de caso devem ser estruturados com “Introdução”, “Apresentação do caso”, “Discussão” e “Conclusão”;
- O formato para revisões narrativas é flexível, sendo utilizada a estrutura de tópicos que mais favorecer a organização e didática do documento;
- Se necessário criar subseções, evitar utilizar mais de dois níveis (evitar passar de "1.1", utilizando, por exemplo, "1.1.1");
- Para favorecer a legibilidade, sugere-se o uso de negritos para as seções e de itálicos para as subseções.

5.2. Considerações éticas

- Na seção "Material e Métodos", todos trabalhos que envolvam humanos (direta ou indiretamente) ou animais devem apresentar número do protocolo de aprovação do comitê de ética em pesquisa.

5.3. Figuras e tabelas

- Devem ser inseridas no texto acompanhadas de suas legendas, no local que for pertinente (geralmente após o parágrafo onde foram citadas pela primeira vez);
- Todas as figuras devem contar com legendas explicativas, assim como tabelas que contarem com abreviações ou símbolos. Em todos os casos, não incluir "Fonte: o(s) autor(es)" (ou similar) quando a figura for de autoria própria;
- O uso de figuras e de tabelas deve se restringir às seções Material e Métodos e Resultados.
- Todas as figuras e tabelas devem ser citadas no texto, sendo as figuras referidas como "Fig. n" e as tabelas como "Tabela n", sendo "n" o número da figura ou tabela;
- Esta revista não faz distinção entre Tabelas e Quadros, devendo todos serem referidos como "Tabelas".
- Em caso de aceite, as figuras podem ser solicitadas em arquivos separados com alta resolução, nos formatos PNG ou TIFF;
- Tabelas devem ser enviadas em formato editável, ou seja, não como figuras;
- A localização dos elementos, na publicação, pode sofrer alterações para fins de diagramação.

6. Referências

- Citações ao longo do texto e lista de referências devem utilizar o formato American Psychological Association (APA) 7ª edição (https://apastyle.apa.org/apa-style-help);
- Para fins de praticidade e melhores resultados, recomendamos o uso de gerenciadores de referências bibliográficas (Zotero, Mendeley, JabRef...). O arquivo CSL para o estilo APA 7th Edition pode ser baixado aqui.

6.1. Citações ao longo do texto

- Para citações entre parênteses, a citação sempre deve vir antes dos sinais de pontuação;
- Se o trabalho tiver somente um autor, utilizar (Silva, 2021); se tiver dois, (Silva & Pereira, 2022); no caso de três autores ou mais, empregar (Silva et al., 2023).
- Para citações narrativas (integradas na frase), citar o nome do autor seguido pelo ano entre parênteses (e.g. Segundo Silva et al. (2023), [...]). Para dois autores, apresentar o nome dos dois separados por “e”, e para três ou mais empregar o "et al.";
- Caso dois trabalhos possuam o mesmo nome de autor (e.g. "Silva et al."), incluir também as iniciais para diferenciação (e.g. "A. C. Silva et al., 2023" e "J. D. Silva et al., 2022"). Se as iniciais dos dois autores forem as mesmas, incluir os demais autores na citação até que algum seja diferente, seguido de "et al." se for o caso de ter mais autores após o diferencial.
- Para citar organizações, na primeira menção apresentar o nome por extenso seguido da abreviação entre colchetes, se existente (e.g. "Ministério da Educação [MEC], 2023"). Nas menções seguintes, utilizar somente a abreviação.

6.2. Lista de referências
- A lista de referências citadas no texto deve ser incluídas na seção Referências, inserida após a seção Conclusão;
- Utilizar alinhamento à esquerda;
- Apresentar as referências respeitando a ordem alfabética com base no sobrenome do primeiro autor (se igual, ir para o segundo autor; se igual, terceiro; etc.). Se todos os autores forem os mesmos, ordenar pelo ano de publicação, com a referência mais antiga antes. Se todos esses critérios forem iguais, ordenar alfabeticamente pelo título do trabalho.
- Se o trabalho possuir até 20 autores, apresentar os sobrenomes e iniciais de todos, se possuir 20 ou mais, apresentar o nome dos primeiros 19 seguido de reticências;
- Apresentar os periódicos com nomes completos (sem abreviações);
- Sempre que disponível, apresentar o DOI ao final da citação como link completo (http://doi.org/...);
- Referenciar no idioma correspondente ao texto, como para indicar edições (1ª ed. vs. 1st ed.) e locais de publicação de livros (Inglaterra vs. England).
- Para organizações, na lista de referências utilizar somente os nomes por extenso.
6.2.1. Exemplos
- Citação no texto (Hisakata et al., 2016; Hogue, 2001; Musk, 2006; Sambrook & Russell, 2001).
Referências:
- Artigo científico:
Hisakata, R., Nishida, S., & Johnston, A. (2016). An adaptable metric shapes perceptual space. Current Biology, 26(14), 1911–1915. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.047
- Capítulo de livro:
Hogue, C. W. V. (2001). Structure databases. In A. D. Baxevanis & B. F. F. Ouellette (Eds.), Bioinformatics (2nd ed., pp. 83–109). Wiley-Interscience.
- Site da internet:
Musk, E. (2006, August 2). The secret Tesla Motors master plan (just between you and me). Tesla Blog. https://www.tesla.com/blog/secret-tesla-motors-master-plan-just-between-you-and-me
- Livro:
Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). CSHL Press.
7. Materiais suplementares
- Se necessário, acrescentar uma seção com materiais suplementares após as referências;
- Citar os materiais suplementares no texto da mesma forma que figuras ou tabelas, porém com um "S" maiúsculo antes do número. Por exemplo: Figura S1 ou Tabela S1.

Política de privacidade
Os nomes e endereços informados nesta Revista são usados exclusivamente para os serviços prestados por essa publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Biociências
Trabalhos voltados para o estudo de processos biológicos como um todo, incluindo fenômenos a nível de organismo ou em contextos ecológicos.

Saúde
Estudos voltados para questões pertinentes à saúde humana. Isso pode se dar em diferentes níveis, sendo aceitos, por exemplo, estudos de ciência básica, epidemiológicos ou relatos de caso.

Inovação

Pesquisas que tenham como foco o desenvolvimento, proposição e avaliação de novas técnicas, soluções e produtos para questões pertinentes às Ciências da Vida como um todo.

ANEXO II – CAPÍTULO SUBMETIDO

Capítulo aceito para publicação no livro Métodos Microbiológicos Tradicionais e Avançados para a Segurança de Alimentos, Editora Científica Digital, com previsão de publicação em março de 2025. Este capítulo faz parte da dissertação de mestrado da aluna Maria Vitória, e sua contribuição para a elaboração deste trabalho foi realizada durante o desenvolvimento de sua pesquisa de mestrado.

científica digital

CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO

Recebido em: **30/10/2024**

Aceito em: **26/11/2024**

Submissão Nº: **241018047**

É com grande satisfação que informamos que o trabalho intitulado "**CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA NA PRODUÇÃO DE CERVEJA: MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO, IMPACTOS NA QUALIDADE E ABORDAGENS DE CONTROLE**", de autoria de **Renê**

Aduan Junior, **David Aciole Barbosa**, **Higor Barreto Campos**, **Yara Natercia Lima Faustino de Maria**, **Maria Vitória Cavalheiro Berlofa**, **Regina Costa de Oliveira**, **Luiz R. Nunes**, **Daniela Leite Jabes** e **Fabiano Bezerra Menegidio**, foi submetido ao processo de revisão por pares externos (Peer Review) e cumpriu todos os critérios de qualidade estabelecidos pela política editorial, recebendo o parecer de **ACEITO** para publicação como um capítulo do livro digital "**MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS TRADICIONAIS E AVANÇADOS PARA**

A SEGURANÇA DE ALIMENTOS". O trabalho encontra-se atualmente em fase de revisão final (ajustes de formatação e diagramação), com previsão de publicação para **30/03/2025**. A obra será publicada com ISBN, DOI, Conselho Editorial e Certificado de Publicação, garantindo sua disseminação e reconhecimento acadêmico.

Reinaldo Cardoso
Editor

Contaminação Microbiológica na Produção de Cerveja: Mecanismos de Degradação, Impactos na Qualidade e Abordagens de Controle

6.1. Renê Aduan Junior
EasyOmics
6.2. David Aciole Barbosa
EasyOmics
Higor Barreto Campos
Universidade de Mogi das Cruzes
Yara Natercia Lima Faustino de Maria
Universidade de Mogi das Cruzes
Maria Vitória Cavalheiro Berlofa
Universidade de Mogi das Cruzes
6.3. Regina Lucia Batista da Costa de Oliveira
EasyOmics
6.4. Luiz R. Nunes
Universidade Federal do ABC; Universidade de Mogi das Cruzes
6.5. Daniela Leite Jabes
EasyOmics; Universidade de Mogi das Cruzes
6.6. Fabiano Bezerra Menegidio
EasyOmics; Universidade de Mogi das Cruzes

RESUMO

A contaminação microbiológica na produção de cerveja representa um desafio substancial que afeta a qualidade sensorial e a viabilidade econômica das cervejarias. Organismos como bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas, leveduras selvagens e fungos comprometem a estabilidade, aparência e sabor da cerveja, gerando perdas financeiras com descarte de lotes, custos de controle e possíveis *recalls*. O controle eficaz exige técnicas avançadas de detecção, como PCR e sequenciamento de nova geração, e práticas rigorosas de sanitização. Estratégias preventivas, como monitoramento em tempo real e o uso de agentes antimicrobianos naturais, oferecem alternativas sustentáveis para minimizar a contaminação. O uso de materiais antimicrobianos no envase e a integração de sensores e IA nas linhas de produção são promissoras para uma gestão mais robusta da contaminação. Com uma abordagem integrada e investimento contínuo, as cervejarias podem aprimorar a segurança e a qualidade dos produtos no mercado competitivo.

Palavras-chave: Produção de cerveja, contaminação microbiológica, qualidade sensorial, sanitização, tecnologia de detecção.

INTRODUÇÃO

A cerveja, uma das bebidas mais antigas e populares do mundo, tem um papel cultural e econômico significativo em diversas sociedades. Estima-se que a produção global de cerveja atinja milhões de litros anualmente, com um mercado que movimenta bilhões de dólares. Essa relevância destaca a necessidade de manter altos padrões de qualidade para atender às expectativas dos consumidores e garantir a segurança do produto. A contaminação microbiológica representa um dos principais desafios nesse sentido, visto que microrganismos indesejados podem introduzir defeitos sensoriais, comprometer a estabilidade do produto e até torná-lo impróprio para consumo (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020; JESPERSEN & JAKOBSEN, 1996).

Os microrganismos que degradam a cerveja, também conhecidos como organismos contaminantes ou *spoilage organisms*, incluem uma variedade de bactérias e leveduras que podem sobreviver em condições desafiadoras, como baixo pH, presença de etanol e níveis reduzidos de nutrientes (SUZUKI, 2020). Esses microrganismos se diferenciam das cepas usadas no processo de fermentação, como *Saccharomyces cerevisiae*, e se caracterizam por induzir alterações indesejadas na bebida, incluindo sabores e aromas ácidos, amargos ou indesejavelmente frutados, além de turvação e formação de gases (SAKAMOTO & KONINGS, 2003). Tais características comprometem a qualidade sensorial e causam grandes perdas econômicas na indústria cervejeira (JUVONEN et al., 2008).

Entre os contaminantes mais comuns, destacam-se as bactérias ácido-lácticas (LAB, do inglês *Lactic Acid Bacteria*), as bactérias ácido-acéticas e certas leveduras selvagens, como *Brettanomyces* (GAROFALO et al., 2015). Essas espécies são conhecidas pela sua capacidade de sobreviver ao ambiente inóspito da cerveja, utilizando substratos residuais e produzindo metabólitos que alteram profundamente a composição química e sensorial da bebida (NAKAKITA et al., 2002). A natureza resistente desses microrganismos dificulta o controle e a eliminação durante o processo de fabricação, sendo, por isso, uma fonte constante de preocupação para cervejeiros (LIN et al., 2008).

Diante da crescente demanda por cervejas de qualidade superior e com características sensoriais únicas, a compreensão dos mecanismos de degradação microbiológica é essencial para desenvolver métodos eficazes de detecção, controle e prevenção de contaminantes. Este artigo explora a microbiota de organismos contaminantes da cerveja, discutindo desde os tipos de microrganismos envolvidos até os impactos sensoriais e

econômicos que causam. Além disso, são apresentados métodos modernos de detecção e controle que visam minimizar a presença de contaminantes e, consequentemente, preservar a qualidade da cerveja ao longo do tempo.

DESENVOLVIMENTO

6.7. Microbiota da Cerveja

A produção de cerveja depende de um processo microbiológico complexo, no qual a presença de microrganismos específicos é fundamental para transformar açúcares em álcool e produzir compostos aromáticos que definem o sabor característico da bebida. No entanto, ao lado das leveduras intencionalmente utilizadas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, existem microrganismos que podem causar contaminação indesejada e prejudicar a qualidade do produto final (VRIESEKOOP et al., 2012).

6.8. Leveduras de Fermentação e Microbiota Benéfica

A levedura é o microrganismo mais importante na fabricação da cerveja, responsável pela fermentação alcoólica, em que açúcares são convertidos em etanol e dióxido de carbono. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (utilizada principalmente em cervejas *ales*) e *Saccharomyces pastorianus* (utilizada em cervejas *lagers*) desempenham um papel central nesse processo. Além de produzir álcool, elas também contribuem para o perfil de aroma e sabor, liberando ésteres, fenóis e outros metabólitos secundários que definem a identidade sensorial de cada estilo de cerveja (SPITAELS et al., 2015).

Adicionalmente, certos estilos de cerveja, como as *lambics* e *sours*, empregam um consórcio de bactérias e leveduras selvagens, entre elas *Brettanomyces*, que contribui com um sabor peculiar de terroir. As bactérias ácido-lácticas, incluindo *Lactobacillus* e *Pediococcus*, são também parte da microbiota benéfica em alguns estilos específicos, responsáveis por induzir a acidez desejada em estilos como *berliner weisse* e *gose* (RODHOUSE & CARBONERO, 2017).

6.9. Organismos Patogênicos e Contaminantes

Ao longo do processo de fabricação, microrganismos contaminantes podem introduzir-se em várias etapas, especialmente em ambientes com protocolos de sanitização deficientes ou quando há vulnerabilidades no controle de qualidade. Esses contaminantes geralmente provêm de fontes ambientais, matérias-primas ou equipamentos mal desinfetados e podem sobreviver e se proliferar em virtude das características da cerveja, como baixo pH e alta concentração de álcool (GAROFALO et al., 2015).

As bactérias ácido-lácticas (LAB), notadamente *Lactobacillus* e *Pediococcus*, são os contaminantes bacterianos mais comuns, e são particularmente problemáticas devido à sua capacidade de sobreviver em ambientes ácidos e resistirem ao álcool. Além disso, algumas cepas de LAB podem desenvolver resistência a antibióticos e desinfetantes, o que aumenta a complexidade de controle (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020).

Outro grupo importante de contaminantes são as bactérias ácido-acéticas, especialmente *Acetobacter* e *Gluconobacter*, que tendem a proliferar em ambientes com presença de oxigênio. Estas bactérias utilizam o etanol residual como fonte de energia e produzem ácido acético como subproduto, gerando um sabor avinagrado que é desagradável na maioria dos estilos de cerveja (VAUGHAN et al., 2005).

6.10. Fungos e Leveduras Selvagens

Leveduras selvagens, como *Brettanomyces*, apesar de desejadas em alguns estilos, são consideradas contaminantes na maioria das cervejas, já que podem introduzir sabores indesejados como amargor, turvação excessiva e aroma de couro ou cavalo. Além de *Brettanomyces*, outras leveduras do ambiente e fungos podem se infiltrar no processo de fabricação e causar problemas significativos (ARAUJO PIRAINE et al., 2021).

6.11. Impacto do Ambiente de Produção

Fatores ambientais, como a ventilação, umidade e temperatura nas áreas de produção e armazenamento, também influenciam a microbiota presente. Espaços úmidos e com ventilação inadequada são mais propensos ao crescimento de fungos e leveduras selvagens (TIMKE et al., 2004). Os equipamentos e as superfícies que entram em contato

com a cerveja precisam ser constantemente monitorados, uma vez que a formação de biofilmes pode facilitar a proliferação de organismos contaminantes e permitir que eles resistam à ação de desinfetantes (VÁVROVÁ et al., 2014).

Em suma, a microbiota da cerveja é uma composição complexa de microrganismos desejáveis, que contribuem para a qualidade e o sabor da bebida, e de contaminantes, que prejudicam essas características. O entendimento detalhado dessa microbiota permite que os produtores implementem práticas de controle e monitoramento para manter a qualidade e evitar perdas financeiras, além de proteger a saúde do consumidor.

6.12. Organismos Contaminantes

Organismos contaminantes, também conhecidos como *spoilage organisms*, são aqueles que degradam a qualidade da cerveja ao provocar mudanças químicas, sensoriais e visuais que comprometem o produto final (VRIESEKOOP et al., 2012; LIU, 2015). Em grande parte, esses microrganismos se adaptaram para prosperar em ambientes hostis, como os de baixa acidez e presença de etanol característicos da cerveja. Eles incluem bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas, leveduras selvagens e fungos ambientais, entrando no processo de produção por diversas vias, como contaminações cruzadas ou falhas na esterilização de equipamentos (HILL, 2015).

As bactérias ácido-lácticas (LAB) são microrganismos gram-positivos conhecidos por sua capacidade de converter carboidratos em ácido lático. Entre os mais comuns estão os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que sobrevivem em ambientes ácidos e suportam concentrações moderadas de álcool (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020). Em muitos estilos de cerveja, essas bactérias são indesejadas, pois provocam alterações de sabor, acidez e aroma, mas em certos estilos, como as *sours*, sua presença é controlada para promover perfis sensoriais específicos. As LAB causam degradação ao metabolizarem carboidratos residuais da cerveja, produzindo ácido lático, o que intensifica a acidez de forma indesejada na maioria das cervejas (MENZ et al., 2010). A acidificação resultante pode ser especialmente indesejável em estilos de sabor mais suave, nos quais a acidez se destaca negativamente. Além disso, algumas espécies de LAB produzem diacetil, um composto que resulta em um sabor amanteigado e metálico, um defeito sensorial notório em cervejas como *lagers* (OLDHAM & HELD, 2023). Outra característica de algumas LAB é a produção de exopolissacarídeos, que causam turbidez

na bebida, afetando a aparência e tornando o sabor e a textura pegajosos e de viscosidade desagradável (ROUSE & VAN SINDEREN, 2008). Em razão dessas características e pela sua resistência a desinfetantes, as LAB exigem um controle rigoroso e práticas de limpeza com desinfetantes potentes para evitar sua proliferação (TASKILA et al., 2009).

Outro grupo importante de contaminantes são as bactérias ácido-acéticas, com destaque para *Acetobacter* e *Gluconobacter*, que desempenham papel importante na indústria de vinhos, mas são prejudiciais para a cerveja (SAKAMOTO & KONINGS, 2003). Essas bactérias aeróbicas proliferam na presença de oxigênio e são capazes de metabolizar etanol em ácido acético, resultando em um sabor avinagrado e oxidado. Embora geralmente não sobrevivam em ambientes anaeróbicos, essas bactérias podem entrar no processo em fases como o envase ou o armazenamento, especialmente se os recipientes não estiverem bem selados (VAUGHAN et al., 2005). Uma vez presentes, utilizam o etanol como substrato, e o processo de oxidação modifica o perfil sensorial da cerveja, com aroma vinagrete que se intensifica à medida que a contaminação progride. Além de alterar o sabor e aroma, a oxidação degrada compostos aromáticos essenciais, como ésteres e álcoois superiores, que são responsáveis por notas sensoriais complexas e valorizadas em diferentes estilos (GAROFALO et al., 2015).

Leveduras selvagens, particularmente *Brettanomyces*, representam um desafio significativo para a indústria de cerveja, pois, embora sejam desejadas em alguns estilos específicos, agem como contaminantes em outros. *Brettanomyces* e outras leveduras selvagens possuem alta resistência ao álcool e ao baixo pH, o que lhes permite sobreviver e proliferar em ambientes onde outras leveduras não conseguem (SPITAELS et al., 2015). Em alguns estilos, como *lambics* e *gueuze*, *Brettanomyces* contribui com perfis de sabor específicos, mas em *lagers* e *ales* tradicionais, é uma fonte de contaminação. Essa levedura é capaz de produzir compostos fenólicos, como 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, que são responsáveis por aromas que remetem a couro e especiarias, características indesejáveis para a maioria das cervejas (ARAUJO PIRAINE et al., 2021). Além disso, a capacidade de *Brettanomyces* de formar biofilmes nas superfícies dos tanques e barris permite que essa levedura sobreviva a procedimentos de limpeza e desinfecção convencionais, contaminando subsequentemente novos lotes. A remoção de leveduras selvagens exige limpezas de alta pressão e sanitização específica, tornando-as um dos maiores desafios para cervejarias (KUBOTA et al., 2008).

Fungos ambientais e leveduras indesejadas, como *Penicillium* e *Aspergillus*, também podem interferir na produção de cerveja, especialmente quando se introduzem por meio de matérias-primas ou pela falta de higienização adequada em áreas de armazenamento e produção (HILL, 2015). Esses fungos, apesar de menos comuns que as leveduras e bactérias mencionadas, podem representar uma séria ameaça à segurança do consumidor devido à produção de compostos tóxicos. Espécies como *Aspergillus*, por exemplo, produzem micotoxinas, substâncias tóxicas perigosas à saúde humana. Em casos severos de contaminação, essas toxinas tornam a bebida imprópria para o consumo. Além do risco à saúde, fungos também geram odores desagradáveis, como de mofo, que contaminam a cerveja e alteram negativamente o perfil sensorial (SHIMOKAWA et al., 2021). Em regiões com alta umidade, o controle desses contaminantes exige atenção redobrada à ventilação e controle de umidade, e a sanitização dos equipamentos e áreas de armazenamento deve ser feita com rigor.

Entre as adaptações de sobrevivência dos organismos contaminantes, a capacidade de formar biofilmes é uma das mais problemáticas. Biofilmes são agregados de microrganismos que aderem a superfícies, formando uma matriz de exopolissacarídeos que age como barreira protetora (MAIFRENI et al., 2015). Essa matriz dificulta a penetração de agentes antimicrobianos, permitindo que os contaminantes se proliferem e resistam a métodos convencionais de limpeza. Por sua estrutura e proteção, biofilmes mantêm uma contaminação persistente nos tanques e tubulações, criando uma fonte de contaminação contínua para os lotes subsequentes (VÁVROVÁ et al., 2014). A presença desses biofilmes em equipamentos requer protocolos de limpeza especializados, incluindo o uso de sanitizantes capazes de quebrar a matriz protetora e a aplicação de métodos mecânicos de abrasão para remover fisicamente os contaminantes. Esses procedimentos específicos são essenciais para impedir a contaminação crônica e preservar a qualidade do produto final (SIEGRIST et al., 2015).

6.13. Mecanismos de Degradação

Os mecanismos pelos quais os contaminantes alteram a cerveja são complexos e multifacetados, envolvendo diversas reações metabólicas que modificam o perfil sensorial e a estabilidade do produto (KUBOTA et al., 2008; MAIFRENI et al., 2015). A degradação causada pelos contaminantes começa com a produção de metabólitos ácidos

e voláteis que alteram o sabor e o aroma, continua com a formação de biofilmes que dificultam a limpeza e o controle desses microrganismos e é acentuada pela produção de exopolissacarídeos e pela resistência natural dos contaminantes a desinfetantes (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020). Esses processos atuam em sinergia para criar defeitos perceptíveis na cerveja, que podem variar de uma leve alteração no sabor a uma transformação completa da bebida em algo impróprio para consumo.

A produção de compostos ácidos é um dos processos mais imediatos e comuns de degradação observados em contaminações por bactérias ácido-lácticas e ácido-acéticas. Esses compostos afetam o pH da cerveja, tornando-a mais ácida e, consequentemente, alterando sua composição química e sensorial (ATTCHELOUWA et al., 2018). Em estilos de cerveja onde o perfil de sabor é leve, como as *pilsners* ou *lagers*, até mesmo uma pequena alteração no pH pode ser perceptível, levando a um sabor azedo indesejado. O ácido lático, produzido principalmente pelas bactérias *Lactobacillus* e *Pediococcus*, é o responsável por esse sabor azedo. Em estilos *sours*, a presença de ácido lático é intencional e monitorada, mas, em outros estilos, resulta em uma alteração de sabor que é rapidamente percebida como um defeito (JUVONEN et al., 2008). Em casos mais severos, a acidez pode provocar uma sensação de adstringência, deixando a bebida desagradável ao paladar e causando uma percepção de “asperidade” no sabor.

Além disso, as bactérias ácido-acéticas, como *Acetobacter*, utilizam o etanol da cerveja como substrato para produzir ácido acético, o que resulta em um aroma e sabor de vinagre (SAKAMOTO & KONINGS, 2003). Essa degradação é um problema significativo em cervejas que passaram por processos de fermentação, uma vez que o etanol produzido serve como combustível para a atividade metabólica dessas bactérias. Em pequenas quantidades, o ácido acético pode passar despercebido, mas, quando o processo de oxidação continua, a concentração desse composto se torna mais elevada e confere uma nota avinagrada forte que domina o paladar. A oxidação contínua provoca a degradação de compostos aromáticos essenciais, como ésteres e álcoois superiores, que conferem à cerveja suas notas de frutas, flores e outras características desejáveis (VAUGHAN et al., 2005).

Outro mecanismo crítico é a produção de compostos voláteis e fenólicos pelas leveduras selvagens, especialmente a *Brettanomyces*. Essa levedura tem a capacidade única de sintetizar uma ampla gama de compostos fenólicos, que são altamente reativos e influenciam o perfil sensorial da cerveja de maneira drástica (SPITAELS et al., 2015).

Entre os compostos produzidos, os mais notáveis são o 4-etilfenol e o 4-etilguaiacol, que geram aromas que lembram couro, cavalo e especiarias. Esses aromas são tão penetrantes que, mesmo em pequenas quantidades, são facilmente detectáveis e dominam o perfil sensorial da bebida (LIU, 2015). Embora esses compostos sejam apreciados em estilos como *lambics* e *gueuze*, que são conhecidos por seu caráter robusto e complexo, em estilos mais leves e suaves esses compostos são considerados defeitos graves. A presença de compostos fenólicos pode transformar uma cerveja tradicional em algo completamente inesperado, frustrando as expectativas do consumidor e, muitas vezes, levando à rejeição do produto (ARAUJO PIRAINE et al., 2021).

A formação de biofilmes é um dos mecanismos mais insidiosos pelos quais os microrganismos contaminantes perpetuam a contaminação. Biofilmes são agregados de células microbianas que aderem a superfícies, como as de tanques, válvulas e tubulações, e são mantidos juntos por uma matriz protetora de exopolissacarídeos (MAIFRENI et al., 2015). Essa matriz age como uma barreira física que impede a penetração de desinfetantes e outros agentes antimicrobianos, criando um ambiente protegido onde os microrganismos podem sobreviver e se proliferar sem interferência. A formação de biofilmes é especialmente comum entre bactérias como *Pediococcus* e leveduras como *Brettanomyces*, que aproveitam as imperfeições e juntas nos equipamentos para estabelecer suas colônias (KUBOTA et al., 2008). Como resultado, esses microrganismos podem continuar a contaminar novos lotes de cerveja, mesmo após processos de limpeza regulares. A erradicação de biofilmes é um desafio, exigindo o uso de desinfetantes específicos e técnicas mecânicas, como escovação e abrasão, para remover fisicamente o biofilme (SHIMOKAWA et al., 2021).

A produção de exopolissacarídeos é outro mecanismo pelo qual os microrganismos alteram a textura e a aparência da cerveja. Certas bactérias, principalmente as ácido-lácticas, produzem exopolissacarídeos durante o seu metabolismo (HILL, 2015). Esses polímeros complexos se misturam com a cerveja, aumentando sua viscosidade e provocando turbidez. Em alguns estilos, uma leve turbidez pode ser aceitável, mas a produção excessiva de exopolissacarídeos resulta em uma bebida de aparência opaca e textura pegajosa (TASKILA et al., 2009). Esse efeito pode afetar negativamente a experiência do consumidor, que espera uma cerveja límpida e refrescante, especialmente em estilos mais leves. Além disso, os exopolissacarídeos podem interferir na formação e na estabilidade da espuma da cerveja, que é um aspecto visual e sensorial importante

(KONG, 2003). Cervejas com produção excessiva de exopolissacarídeos podem apresentar uma espuma instável, que desaparece rapidamente, reduzindo o apelo visual e comprometendo a experiência geral de consumo.

Por fim, a resistência a desinfetantes é um mecanismo de sobrevivência que torna a eliminação desses microrganismos ainda mais complicada. Muitos dos contaminantes que degradam a cerveja são altamente resistentes a condições ambientais adversas e podem sobreviver em concentrações de desinfetantes subótimas, especialmente quando protegidos por biofilmes (TURVEY et al., 2017). As LAB, por exemplo, são notoriamente resistentes a vários desinfetantes, incluindo o álcool e o cloro, quando não utilizados nas concentrações adequadas. Essa resistência torna o controle da contaminação mais difícil, pois, mesmo com a aplicação de desinfetantes, os microrganismos podem sobreviver e contaminar futuros lotes de cerveja (STORGÅRDS et al., 2006). Para reduzir a resistência e assegurar a eliminação dos contaminantes, as cervejarias precisam adotar protocolos de sanitização rigorosos e variados, alternando desinfetantes e aplicando técnicas de limpeza física para assegurar a remoção completa dos microrganismos.

Em conjunto, esses mecanismos de degradação — produção de compostos ácidos e voláteis, formação de biofilmes, produção de exopolissacarídeos e resistência a desinfetantes — afetam a qualidade final da cerveja de maneira significativa, alterando tanto o sabor quanto a aparência e estabilidade do produto. O impacto cumulativo desses processos não apenas reduz a qualidade da bebida, como também compromete a confiabilidade e a reputação da cervejaria (QUE, 2011). Para os produtores, a compreensão desses mecanismos é essencial para implementar controles eficazes e prevenir a degradação, mantendo o padrão de qualidade esperado pelos consumidores e minimizando as perdas associadas à contaminação microbiológica.

6.14. Impactos na Qualidade da Cerveja

A presença de microrganismos contaminantes na cerveja tem um impacto direto e perceptível na sua qualidade. Essas alterações afetam os atributos sensoriais, como o sabor e o aroma, influenciam a aparência e a textura e comprometem a estabilidade do produto ao longo do tempo (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020; SUZUKI, 2011).

A qualidade sensorial da cerveja é um dos principais fatores que determinam a aceitação

do produto pelo consumidor, e qualquer alteração perceptível pode levar à rejeição, afetando a imagem da marca e a confiança do consumidor (VRIESEKOOP et al., 2012). Assim, compreender como os contaminantes impactam a qualidade da cerveja é fundamental para manter os padrões de produção e garantir uma experiência consistente ao consumidor.

A primeira e mais evidente alteração causada pelos contaminantes ocorre no sabor e aroma da cerveja. A contaminação por bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* e *Pediococcus*, provoca uma acidez que é evidente ao paladar, gerando um sabor azedo indesejado (JESPERSEN & JAKOBSEN, 1996). Essa acidez altera o equilíbrio sensorial da bebida, transformando o perfil de sabor esperado e criando um produto que diverge significativamente do original. A presença de ácido acético, produzido por bactérias ácido-acéticas como *Acetobacter*, é ainda mais perceptível, com uma característica avinagrada que domina o paladar (Vaughan et al., 2005).

Além da acidez, compostos fenólicos e voláteis produzidos por leveduras selvagens, especialmente *Brettanomyces*, introduzem sabores e aromas indesejáveis que são descritos como terrosos, de couro ou até metálicos (SPITAELS et al., 2015). Esses compostos fenólicos são facilmente detectáveis mesmo em pequenas concentrações, dominando o perfil de sabor e aroma da cerveja e tornando-a intragável para consumidores que não estão acostumados a esse perfil sensorial específico (ATTCHELOUWA et al., 2018). Ademais, devido a sua natureza volátil, esses compostos também podem interferir na percepção dos aromas primários da cerveja, especialmente aqueles derivados do lúpulo e da levedura utilizada na fermentação. O resultado é uma experiência sensorial desequilibrada em que as características desejadas da bebida são suprimidas ou distorcidas pelos compostos gerados pela contaminação (LIU, 2015).

Outro aspecto sensorial importante afetado pela contaminação é a aparência visual da cerveja. Certos contaminantes, como as bactérias ácido-lácticas, produzem exopolissacarídeos que aumentam a turbidez da bebida (MAIFRENI et al., 2015). A aparência opaca e turva é indesejável em estilos em que se espera uma coloração clara e límpida, como nas *lagers* e *pilsners*, e pode causar uma impressão negativa no consumidor, que associa a turbidez a um produto de qualidade inferior ou mal armazenado (HAMMOND et al., 1999). Em estilos em que uma leve turbidez é aceitável, como as cervejas de trigo, a produção excessiva de exopolissacarídeos ainda pode afetar

a experiência visual, criando um aspecto viscoso e reduzindo a formação de espuma, que é um dos indicadores de frescor e qualidade.

A textura da cerveja também é alterada pela produção de exopolissacarídeos, que aumentam a viscosidade da bebida, resultando em uma sensação pegajosa e densa no paladar (KUBOTA et al., 2008). Essa alteração de textura é particularmente indesejável em estilos leves e refrescantes, que são valorizados por sua suavidade e facilidade de consumo. A presença de exopolissacarídeos pode criar uma sensação de "corpo pesado" na cerveja, que não é esperada em muitos estilos e pode desagradar ao consumidor (SIEGRIST et al., 2015). Além disso, a viscosidade adicional pode interferir na formação e estabilidade da espuma, reduzindo o apelo visual e afetando a percepção de qualidade do produto (TASKILA et al., 2009).

Outro impacto significativo dos contaminantes é a redução da estabilidade da cerveja ao longo do tempo. Cervejas contaminadas tendem a perder rapidamente suas qualidades sensoriais, uma vez que os microrganismos continuam a metabolizar os compostos presentes na bebida mesmo após o envase (KONG, 2003). Esse metabolismo contínuo gera uma série de subprodutos, como gases, ácidos e compostos voláteis, que alteram progressivamente o sabor e o aroma da cerveja. A produção de dióxido de carbono em garrafas e latas, por exemplo, pode levar ao aumento da pressão interna, resultando em uma bebida excessivamente gaseificada ou até mesmo em vazamento e explosão de recipientes (SHIMOKAWA et al., 2021). A atividade contínua dos contaminantes também contribui para a instabilidade da espuma e a degradação dos compostos aromáticos, fazendo com que a cerveja perca suas características originais em um curto período de tempo (TURVEY et al., 2017).

Por fim, esses impactos na qualidade da cerveja afetam a experiência do consumidor e a reputação e a rentabilidade da cervejaria. A produção de lotes contaminados leva a um aumento nos custos, tanto pela necessidade de *recall* e descarte de produtos como pela implementação de medidas de controle de qualidade mais rigorosas para evitar futuras contaminações (HILL, 2015). Além disso, a percepção negativa por parte dos consumidores pode resultar na perda de clientes e prejudicar a imagem da marca. Em um mercado competitivo, onde a qualidade e a consistência são elementos-chave para a fidelização dos consumidores, a contaminação e a consequente degradação da cerveja representam uma ameaça significativa para a sustentabilidade das operações da cervejaria (STORGÅRDS et al., 2006).

Esses efeitos acumulados de alterações sensoriais, instabilidade e impacto visual mostram que a presença de contaminantes representa um grande desafio para a indústria cervejeira. Garantir a integridade da qualidade da cerveja, portanto, requer práticas rigorosas de controle microbiológico e sanitização, assegurando que o produto final ofereça uma experiência consistente e satisfatória ao consumidor.

6.15. Técnicas de Detecção e Controle

A detecção e o controle de microrganismos contaminantes são etapas fundamentais para preservar a qualidade da cerveja e assegurar que os consumidores recebam um produto consistente e seguro (SHIMOKAWA et al., 2021). Os avanços nas técnicas laboratoriais e os métodos de sanitização rigorosa vêm permitindo às cervejarias identificarem rapidamente os contaminantes e prevenir a sua proliferação, o que reduz o risco de contaminação ao longo do processo de produção e armazenamento (OLDHAM & HELD, 2023). Essas práticas de detecção e controle são essenciais para mitigar os impactos negativos dos contaminantes sobre a qualidade da cerveja, a viabilidade econômica e a reputação da marca (JUVONEN et al., 2008).

A detecção precoce de contaminantes evita que os organismos indesejáveis se proliferem durante o processo de fabricação. Métodos clássicos, como a cultura microbiológica em meios seletivos, continuam a ser utilizados por serem eficazes e acessíveis (STORGÅRDS et al., 2006). No entanto, essas técnicas, embora eficazes, têm limitações: o cultivo de microrganismos pode ser demorado, pois alguns contaminantes possuem tempos de crescimento lentos. Por essa razão, técnicas moleculares mais modernas, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), têm se tornado cada vez mais populares (JUVONEN & HAIKARA, 2009). A PCR permite a detecção rápida e precisa de sequências de DNA específicas de contaminantes em amostras de cerveja. Ao amplificar fragmentos de DNA dos microrganismos, a PCR identifica com precisão a presença de contaminantes em poucas horas, possibilitando uma resposta imediata e prevenindo que a contaminação se espalhe para outros lotes (OLDHAM & HELD, 2023).

Outro avanço significativo na detecção é o uso de técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Embora mais complexo e custoso, o NGS permite identificar a composição completa da microbiota em amostras de cerveja, proporcionando uma visão detalhada dos contaminantes presentes, mesmo em baixas concentrações (JUVONEN et

al., 2008). Essa tecnologia é particularmente útil para detectar contaminações cruzadas em que múltiplos organismos podem estar presentes simultaneamente. Ao oferecer uma análise ampla, o NGS permite que as cervejarias compreendam melhor a diversidade e a dinâmica dos contaminantes em suas instalações, ajudando a traçar estratégias de controle mais eficazes (OLDHAM & HELD, 2023).

No entanto, a detecção por si só não é suficiente para garantir a qualidade da cerveja. Práticas de sanitização rigorosa e métodos de controle preventivo são indispensáveis para evitar a entrada e a proliferação de microrganismos ao longo de todo o processo de produção (SIEGRIST et al., 2015). A limpeza e desinfecção cuidadosa dos equipamentos e das superfícies em contato com a cerveja são essenciais para evitar a formação de biofilmes e a presença de organismos resistentes. Produtos desinfetantes, como álcoois, peróxidos e compostos à base de cloro, são amplamente utilizados e devem ser aplicados de acordo com as especificações de concentração e tempo de contato para garantir sua eficácia (MAIFRENI et al., 2015). A alternância de desinfetantes também é recomendada, uma vez que o uso contínuo de um único agente pode resultar na adaptação e resistência dos contaminantes. Em áreas onde o biofilme é uma ameaça constante, como tubulações e válvulas, a limpeza mecânica, com escovas ou jatos de alta pressão, auxilia na remoção física de microrganismos incrustados, quebrando a matriz de exopolissacarídeos que protege os contaminantes (STORGÅRDS et al., 2006).

A filtração é outra técnica eficaz de controle, especialmente na fase de envase. A filtragem da cerveja antes do envase remove partículas e microrganismos que possam ter sobrevivido às etapas anteriores de sanitização (QUE, 2011). Filtros de diferentes porosidades são utilizados para reter tanto contaminantes maiores quanto microrganismos em suspensão, garantindo um produto final limpo e seguro (HAMMOND et al., 1999). Em algumas cervejarias, sistemas de filtração de membrana com poros ultrafinos são empregados para capturar bactérias e leveduras antes do envase. Além disso, a microfiltração permite manter o teor de compostos voláteis e aromáticos, preservando o perfil sensorial da cerveja, enquanto remove potenciais contaminantes microbiológicos (QUE, 2011).

Outra abordagem para o controle de contaminantes é o uso de agentes naturais e biológicos para limitar o crescimento de microrganismos. Certos extratos de plantas e óleos essenciais, como os de alecrim e tomilho, têm propriedades antimicrobianas e podem ser usados como complementos aos desinfetantes tradicionais (LIU, 2015).

Embora menos comuns, os bacteriófagos — vírus que infectam bactérias específicas — têm sido explorados para o controle de contaminantes bacterianos em bebidas. Esses vírus são altamente específicos, podendo atacar espécies bacterianas indesejadas sem afetar a microbiota desejada ou o perfil sensorial da cerveja (TURVEY et al., 2017). Essa abordagem biológica é ainda experimental, mas tem o potencial de proporcionar uma alternativa natural e seletiva para o controle de contaminações.

A manutenção de um ambiente anaeróbico é uma estratégia eficaz para limitar a atividade de microrganismos aeróbicos, como as bactérias ácido-acéticas, que necessitam de oxigênio para proliferar (KONG, 2003). Durante o armazenamento e o envase, o controle do oxigênio é fundamental para impedir a oxidação e reduzir o crescimento desses contaminantes. O uso de sistemas de envase anaeróbico e de tampas de alta qualidade, que impedem a entrada de ar, reduz significativamente a probabilidade de contaminação oxidativa. Além disso, o monitoramento contínuo dos níveis de oxigênio dissolvido na cerveja ajuda a detectar qualquer aumento que possa indicar a presença de microrganismos aeróbicos (SIEGRIST et al., 2015).

Por fim, o monitoramento contínuo e a manutenção de um rigoroso sistema de controle de qualidade são indispensáveis para garantir a eficácia dessas práticas (HILL, 2015). A implementação de testes regulares em amostras de diferentes pontos do processo permite identificar rapidamente qualquer sinal de contaminação, possibilitando que ações corretivas sejam tomadas antes que o produto final seja comprometido (TURVEY et al., 2017). A criação de um protocolo de controle de qualidade, com etapas de verificação sistemática e análise microbiológica periódica, é determinante para assegurar que a produção permaneça livre de contaminantes. Treinamentos frequentes para as equipes de produção e manutenção sobre práticas de higiene e sanitização também contribuem para a prevenção de contaminações e promovem uma cultura de segurança e qualidade no ambiente de produção (KONG, 2003).

6.16. Impactos Econômicos e Industriais

A contaminação microbiológica na produção de cerveja impacta significativamente a qualidade sensorial e a sustentabilidade econômica e operacional das cervejarias, o que leva a perdas econômicas substanciais e exige ações rigorosas de controle (LIU, 2015; VRIESEKOOP et al., 2012). O descarte de lotes comprometidos, os custos adicionais

para o controle de qualidade e o prejuízo com *recalls* estão entre as principais consequências dessa contaminação, que afeta diretamente a viabilidade financeira da indústria (RODRÍGUEZ-SAAVEDRA et al., 2020). Nesse cenário, práticas preventivas e de controle rigoroso tornam-se imprescindíveis para mitigar os efeitos adversos e assegurar a segurança do produto (JUVONEN et al., 2008).

A alta demanda por insumos de qualidade e equipamentos de detecção de ponta, como PCR e sequenciamento de nova geração, eleva o custo operacional das cervejarias. O investimento nesses métodos de monitoramento e controle é necessário para evitar contaminações, mas pode ser desafiador, especialmente para pequenas e médias empresas (GAROFALO et al., 2015; OLDHAM & HELD, 2023). Além disso, o impacto sobre a reputação da marca é significativo: em casos de contaminação, a divulgação rápida em redes sociais pode comprometer a confiança do consumidor, exigindo medidas de reposicionamento que demandam recursos e planejamento estratégico (SPITAELS et al., 2015; SIEGRIST et al., 2015).

Do ponto de vista industrial, a presença de contaminantes afeta diretamente a eficiência operacional, pois processos de limpeza e desinfecção intensiva precisam ser realizados, levando à interrupção das atividades produtivas e a custos adicionais com mão de obra e insumos (SHIMOKAWA et al., 2021). Em resposta à necessidade de qualidade rigorosa, muitas cervejarias estabelecem parcerias com fornecedores altamente confiáveis e realizam testes laboratoriais frequentes para assegurar a integridade dos ingredientes e reduzir o risco de contaminação inicial (ATTCHELOUWA et al., 2018; ARAUJO PIRAINE et al., 2021).

A conformidade com padrões regulatórios de segurança alimentar e qualidade sanitária é essencial para evitar sanções, recalls e eventuais interrupções nas atividades industriais, obrigando as cervejarias a manterem elevados padrões de controle microbiológico (SAKAMOTO & KONINGS, 2003; STORGÅRDS et al., 2006). Investimentos em sistemas avançados de monitoramento e controle não só protegem a qualidade do produto final, mas também garantem a viabilidade econômica e operacional a longo prazo. Dessa forma, a adoção de uma abordagem preventiva e integrada se faz necessária para que a indústria cervejeira enfrente com eficácia os desafios impostos pela contaminação microbiológica, promovendo segurança e qualidade para o consumidor final.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação microbiológica na produção de cerveja compromete a qualidade do produto e a viabilidade econômica das cervejarias. Organismos como bactérias ácido-lácticas, leveduras selvagens e fungos afetam sabor, aroma e estabilidade da cerveja. Controlar esses contaminantes exige conhecimento técnico, práticas de sanitização rigorosas e técnicas modernas de detecção, como PCR. Avanços, como monitoramento em tempo real e o uso de agentes antimicrobianos naturais, mostram-se promissores. Com uma abordagem integrada e investimento em tecnologias, a indústria pode melhorar a segurança e a qualidade da cerveja em um mercado competitivo.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio financeiro e institucional oferecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEP), que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ARAUJO PIRAINE, R. E.; LEITE, F. P.; BOCHMAN, M. L. Mixed culture metagenomics of the microbes making sour beer. **bioRxiv**, 2021.

ATTCHELOUWA, C. K.; N'GUESSAN, F.; AKÉ, F.; DJÈ, M. Molecular identification of yeast, lactic and acetic acid bacteria species during spoilage of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-10, 2018.

GAROFALO, C. et al. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2845-52, 2015.

HILL, A. E. Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. **Journal of Brewing**, 2015.

JESPERSON, L.; JAKOBSEN, M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 139-55, 1996.

JUVOEN, R.; KOIVULA, T.; HAIKARA, A. Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 162-9, 2008.

KONG, Q. New Identification Techniques of Spoilage Microorganism in Beer Brewing. **Liquor-making Science & Technology**, 2003.

KUBOTA, H.; SENDA, S.; NOMURA, N.; TOKUDA, H.; UCHIYAMA, H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 381-386, 2008.

LIN, J. et al. Monitoring Spoilage Bacteria and Wild Yeasts in Eastern Chinese Breweries. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, p. 43-47, 2008.

LIU, S. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 357-374, 2015.

MAIFRENI, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; BUIATTI, S.; PICON, S.; MARINO, M. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment**. Food Control**, v. 50, p. 809-814, 2015.

MENZ, G.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; CORICH, V.; ALDRED, P.; VRIESEKOOP, F. Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 116, p. 14-22, 2010.

NAKAKITA, Y. et al. A Strategy for Detection of All Beer-Spoilage Bacteria. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 60, p. 63 - 67, 2002.

OLDHAM, R. C.; HELD, M. A. Methods for detection and identification of beer-spoilage microbes**. Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

QUE, H. P. Novel methods for detection and control of spoilage in brewing. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, p. 133-141, 2011.

RODHOUSE, L.; CARBONERO, F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 462-473, 2017.

RODRÍGUEZ-SAAVEDRA, M.; GONZÁLEZ DE LLANO, D.; MORENO-ARRIBAS, M. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. **Food Research International**, v. 138 Pt A, p. 109762, 2020.

ROUSE, S.; van SINDEREN, D. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing**. Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1724-33, 2008.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 105-124, 2003.

SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 23-32, 2015.

SUZUKI, K. Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon: A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, p. 245 - 259, 2020.

TASKILA, S.; O'HANLON, R.; KOBUSCH, M. Improved Enrichment Cultivation of Beer Spoiling Lactic Acid Bacteria by Continuous Glucose Addition to the Culture. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 115, p. 177-182, 2009.

TIMKE, M. et al. Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence in situ hybridisation and isolation techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 100-107, 2004.

TURVEY, J. M.; THOMPSON, D. M.; JIMENEZ, J. Evaluation of bacteriophage for control of beer spoilage bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 2, p. 214-225, 2017.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; SINDEREN, D. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review**. Journal of The Institute of Brewing**, v. 111, p. 355-371, 2005.

VÁVROVÁ, A. et al. MALDI-TOF MS Analysis of Anaerobic Bacteria Isolated from Biofilm-Covered Surfaces in Brewery Bottling Halls. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, p. 101 - 95, 2014.

VRIESEKOOP, F. et al. 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 335-345, 2012.