

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RICARDO VENTURA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS E AVALIAÇÕES DE
ANTIMICROBIANOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL
CARBURANTE**



unesp

**ARARAQUARA
2015**

RICARDO VENTURA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS E AVALIAÇÕES DE
ANTIMICROBIANOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL
CARBURANTE**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Laluce

ARARAQUARA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

V468d Ventura, Ricardo
Desenvolvimento de técnicas e avaliações de
antimicrobianos visando a produção de etanol carburante /
Ricardo Ventura – Araraquara : [s.n], 2016
120 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Cecília Laluce

1. Etanol. 2. Melaço. 3. Fermentação. 4. Bactérias
produtoras de ácido láctico. 5. Bactericida. I. Título.

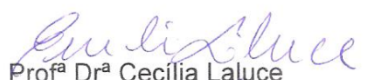
Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RICARDO VENTURA

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.


Araraquara, 04 de fevereiro de 2016

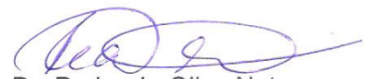
BANCA EXAMINADORA


Prof^ª Dr^a Cecília Lauce
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Arnaldo Sarti
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Clóvis Parazzi
Centro de Ciências Agrárias – UFSCar, São Carlos


Prof^ª Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis
Instituto de Biociências – UNESP, Rio Claro


Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Faculdade de Ciências e Letras – UNESP, Assis

Dados curriculares

Nome: Ricardo Ventura

Nome em citações bibliográficas: VENTURA, R.

Endereço profissional: Instituto de Química - Unesp - Depto. de Bioquímica e Tecnologia - R. Prof. Francisco Degni nº 55 - CEP 14.800-900 - Araraquara-SP.

Formação Acadêmica

- . Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada): Instituto de Biociências – Unesp Rio Claro (2007)
- . Bacharelado em Químico Industrial: Universidade de Ribeirão Preto (1992)
- . Tecnologia em açúcar e álcool: Associação de Ensino de Ribeirão Preto (1983)

Formação complementar

- . Eficiência industrial na prod. de etanol – Bio Contal, Sertãozinho-SP (2011)
- . Gestão de projetos com MS Project – ITAL, Campinas - SP (2011)
- . Microbiologia enológica – Uni Rioja/UNESP, Rio Claro - SP (2008)
- . Confiabilidade analítica – SENAC Educação Ambiental, São Paulo - SP (2006)
- . Fermentando com alta eficiência – Fermentec, Piracicaba - SP (2006)
- . Tecnologia de produção de cachaça – CRQ IV, Ribeirão Preto - SP (2006)
- . Tratamento de efluentes – SENAC Educação Ambiental, São Paulo - SP (2004)
- . Certificação ISO 14.000 – Fund. Vanzolini, São Paulo - SP (2002)
- . Gerência de produtos – ESPM, São Paulo - SP (2002)
- . Marketing estratégico e operacional – ESPM, São Paulo - SP (2001)
- . Formação de preços na indústria – SEBRAE, São Paulo - SP (2000)
- . QS 9000 (PPAP, APQP, FMEA) – Bureau Veritas, São Paulo - SP (1998)
- . Gestão estratégica da produção – USP, São Paulo - SP (1999)
- . Avaliação estratégica de negócios na ind. química – USP, São Paulo - SP (1998)
- . Tratamento de águas industriais – Aquatec/Drew, Ribeirão Preto - SP (1986)

Produção bibliográfica

SILVA, R. P.; VENTURA, R.; VIOLA, M.C.; et al. NBR 9292 - Líquidos para freios hidráulicos tipos 3, 4 e 5. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

SILVA, R. P.; VENTURA, R.; VIOLA, M.C.; SANTOS, L. E.; et al. NBR 14261 - Solução arrefecedora para motor endotérmico - Requisitos e determinações das características. Rio de Janeiro: ABNT, 1998.

DELALIBERA, M. C. B; VENTURA, R.; CHAGAS, V. C. Determinação comparativa de níveis de infecção utilizando-se metodologia de análise microscópica e cultura em placas de Petri. STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 12, p. 37-38, 1984.

Apresentação de trabalho

VENTURA, R. Biorrefinarias: Tecnologias para produção de químicos a partir de fontes renováveis. 2015. Seminários Gerais da PG em Biotecnologia - IQ-UNESP Araraquara.

VENTURA, R.; LALUCE, C. Alternative use of a non-antibiotic biocide to improve ethanol fermentation with cell recycling. 2014. Simpósio BBEST. Campos do Jordão, 2014.

VENTURA, R. Aumento da eficiência fermentativa e redução de custo na produção de etanol. 2014. Reunião Fermentec. Ribeirão Preto, 2013.

VENTURA, R.; LALUCE, C. Control of bacterial contaminants in ethanol production process using natural biocides. Advanced Scholl of Bioorganic Chemistry. Araraquara, 2013.

VENTURA, R. Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica. Congresso internacional sobre uso da levedura na alimentação animal. Campinas, 2009.

VENTURA, R. ; MENEZES, A.; MELLO, G. Determinação de Residual de Monensina Sódica em Levedura Seca Oriunda de Fermentação Etanólica. SMA. Rio Claro, 2009.

VENTURA, R. Monitoramento da fermentação alcoólica através da quantificação de ácido láctico. SMA. Rio Claro, 2007.

VENTURA, R.; ANGELIS, D. F. Importância do monitoramento e controle da produção de ácido láctico na produção de etanol. SINAFERM. Curitiba, 2007.

VENTURA, R. Lactic acid quantification in Brazilian ethanol production. SIPAL. Campos do Jordão, 2005.

Atuação profissional:

- . Bolsista TT2 MCT/CNPq/CT - BIOTEC nº 27/2010 (2014)
- . Integra Química - Sócio gerente (desde 2013)
- . Química Real - Gerente técnico (2007 – 2012)
- . Centro Paula Souza - Professor ETEC em curso técnico em açúcar e álcool (2003 – 2006)
- . Phibro Internacional - Gerente de negócio (2002 – 2004)
- . BASF - Gerente de produto; repres. técnico; técnico lab. aplicação (1989 – 2002)
- . Shell Petróleo - Estagiário em base de combustíveis e lubrificantes (1988).
- . Analítica Equip. de Laboratório - Vendedor técnico (1986 – 1987)
- . Usina Santa Elisa - Sup. de laboratório; microbiologista (1985 – 1986)
- . Usina Santa Rita - Sup. de fermentação, analista laboratório; estagiário (1982 – 1985)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força nessa árdua jornada.

À minha mãe pelo amor, apoio moral e logístico ao longo do curso.

À Prof. Dra. Cecília Laluze, por ter me aceitado em seu laboratório.

Aos colegas Jéssica, Maria Olívia e Ismael pelo companheirismo, auxílio no laboratório, dicas e convívio amistoso ao longo do curso.

As estagiárias Thamyres, Chadia e Mariana pelo auxílio durante os preparativos de experimento, análises e, é claro, administração das vidrarias.

Ao técnico Fernando Delfino pelo auxílio com o cromatógrafo a gás.

À Dra. Eloísa da Al Sukkar biotecnologia pelas análises de CIM.

As equipes da pós-graduação e biblioteca do IQ, pelo atendimento prestativo.

Ao professor Pedro Oliva por suas valiosas críticas na qualificação e pela amostra do biocida TCC.

À Vânia, do laboratório de produtos naturais, pela amostra de maitenina.

A colega Ana Paula, da UFSCar pela amostra da bactéria *L. fermentum*.

Ao CNPQ pelas bolsas parciais que foram de grande valia num período difícil durante parte do curso.

Aos professores Dejanira e Otávio (Vico) pelo incentivo desde a época do mestrado.

À professora Marisa pelas análises estatísticas.

Aos membros da banca pela presença e contribuição.

À minha querida mãe Geny, um anjo em minha vida, **OFEREÇO**

À memória de minha avó Ricarda, com saudade, **DEDICO**.

Lista de abreviaturas e siglas

ART: Açúcares redutores totais

ARRT: Açúcares redutores residuais totais

ATP: Adenosina trifosfato

Bx: Brix (porcentagem de sólidos solúveis)

CBA: Cloreto de benzalcônio

CIM: Concentração inibitória mínima

COS: Cloro oxigenado solúvel

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EDTA: Etilene diamino tetracetic ácido (ácido diamino tetra cético)

g: gramas

h: horas

HEDTA: Ácido hidroxí etileno diamino tetra cético

HS: Huwa-San

MT: maitenina

MN: Monensina

mL: mililitro

mM: milimolar

m/m: massa por massa

m/v: massa por volume

min: minutos

nm: nanômetros

NAD: Nicotinamida adenosina di-nucleotídeo

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenado

ppm: partes por milhão (mg/L)

rpm: Rotações por minuto

SL: Salinomicina

TCC: Triclorocarbanilida

v/v: volume por volume

YPD: Yeast peptone dextrose (extrato de levedura, peptona e glicose)

η : rendimento

μL : microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota bioquímica simplificada do metabolismo da glicose a etanol.	25
Figura 2 - Esquema do processo de fermentação etanólica Melle-Boinot.	27
Figura 3 - Esquema de difusão passiva do ácido láctico em meio ácido e excreção de H ⁺ dissociado do íon lactato em <i>S. cerevisiae</i> .	31
Figura 4 - Compostos metabólicos de efeito fungicida, produzidos por bactérias lácticas.	32
Figura 5 - Co-floculação entre leveduras e lactobacilos em fermentação etanólica, registrada por microscopia eletrônica de varredura.	33
Figura 6 - Esquema de propagação de levedura pelo sistema de cortes em batelada alimentada com mosto de melaço 10° Bx.	49
Figura 7 - Esquema dos quadrados de uma câmara de Neubaer, com destaque par os quadrículos utilizados nas contagens.	56
Figura 8 - Câmara para contagem de bactérias de Helber.	57
Figura 9 - Esquema do procedimento de diluições em série e cultivo de bactérias.	58
Figura 10 - Efeito do tratamento dos inóculos com ácido sulfúrico (AS) nas concentrações 0,6%, 1,2% e 1,8% (m/v) sobre a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melaço (22° Bx; 405 mg/L de ácido láctico) a 35° C, por 5 ciclos.	61
Figura 11 - Efeito do tratamento com ácido sulfúrico nas doses 0,6%, 1,2% e 1,8% (m/v) sobre a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melaço (22° Bx; 1.205 mg/L de ácido láctico) a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos	62
Figura 12 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>L. fermentum</i> (A) e bactéria láctica isoladas de fermentação alcoólica industrial (B) contendo corante resazurina.	63
Figura 13 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton, inoculado com levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.	64
Figura 14 - Viabilidade de levedura PE-2 após 6 horas de fermentações em mosto de melaço 22° Brix a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos, tratadas com: Huwa-San (HS) 200 e 1000 ppm; e ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm.	66
Figura 15 - Viabilidades médias de levedura PE-2 em 5 ciclos fermentativos de 6 horas em mosto de melaço 22° Brix a 35° C, submetidas aos tratamentos: Huwa-San (HS) 200 ppm; ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm, e controle (C).	67
Figura 16 - Brotamento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao longo de 5 ciclos sucessivos de fermentação tratadas com 1000 ppm de Huwa-San (HS) e 1.800 ppm de ácido sulfúrico (AS), e controle, sem tratamento (C).	68

- Figura 17** - Crescimento de levedura em meio YPD, após 24 horas a 33° C. Placa A inoculada com amostra de fermentação tratada com 1.000 ppm de Huwa-San contendo $6,4 \times 10^7$ cel./mL; a placa B tratada com 1.800 ppm de ácido sulfúrico $1,3 \times 10^7$ cel./mL; e a placa C sem tratamento contendo $4,2 \times 10^8$ cel./mL. 69
- Figura 18** - Coloração de mosto de melação fermentados após cinco ciclos, cujos inóculos foram tratados com ácido sulfúrico 600 ppm (C); Huwa-San 200 ppm (B) e sem tratamento (A). 69
- Figura 19** - Viabilidade da levedura PE-2 em fermentações contaminadas, tratadas com cloro oxigenado (COS 50 e 100 ppm) e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos. 73
- Figura 20** - Leveduras PE-2 (400 x) após fermentação contaminada com bactéria láctica, com inóculo tratado com 100 ppm de cloro oxigenado. As células claras são viáveis e as coradas em azul estão mortas. 73
- Figura 21** - Produção de ácido láctico relativo à atividade bacteriana em fermentações tratadas com cloro oxigenado (COS) nas concentrações 50 e 100 ppm, e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos. 74
- Figura 22** - Ácido láctico produzido ao longo de cinco ciclos de fermentações, com inóculos tratados com concentrações 50; 80; 100 ppm do biocida triclorocarbanilida associada com cloreto de benzalcônio (TCC + CBA) e 1,2% ácido sulfúrico (AS). 78
- Figura 23** - Produção de ácido láctico ao longo de 5 ciclos de fermentações inoculadas com *S. cerevisiae* e bactéria láctica isolada de fermentação industrial. O inóculo misto foi tratado com 50 ppm de gluconato de clorexidina (GC) em associação com 40 ppm de cloreto de benzalcônio no mosto em comparação a inóculo tratado com 600 ppm de ácido sulfúrico (AS). 80
- Figura 24** - Concentração de ácido láctico após 6 horas de fermentação de mosto de melação 22° Bx a 35° C, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, tratados com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB) e 600 ppm de ácido sulfúrico. 82
- Figura 25** - Etanol produzido nos ciclos sucessivos de fermentações inoculadas com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*, após tratamentos com ácido sulfúrico, maitenina (MT) e extrato de lúpulo (BB). 84
- Figura 26** - Viabilidade de *S. cerevisiae* após fermentações tratadas com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB); 600 ppm de ácido sulfúrico (AS). 84
- Figura 27** - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melação 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL). 86
- Figura 28** - Produção de etanol ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melação 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL). 88

Figura 29 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> . Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).	89
Figura 30 - Produção de biomassa de levedura ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> . Os inóculos foram tratados nos ciclos dois e nove, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).	89
Figura 31 - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e bactéria láctica de fermentação industrial, tratadas com 3 ppm de monensina (MN) e 6 ppm de salinomicina (SL) no segundo ciclo, e 5 ppm de monensina no sétimo ciclo e 10 ppm de salinomicina no nono ciclo.	91
Figura 32 - Produção de etanol em fermentações de mosto de melão inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , tratadas com monensina e salinomicina ao longo de 10 ciclos fermentativos.	92
Figura 33 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentações tratadas com salinomicina e monensina ao longo de 10 ciclos fermentativos.	93
Figura 34 - Produção de biomassa ao longo de dez ciclos fermentativos tratados com salinomicina (SL) e monensina (MN).	93
Figura 35 - Ácido láctico produzido em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA em comparação com 1.200 ppm de ácido sulfúrico.	94
Figura 36 - Produção de etanol em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA, e 600 ppm de ácido sulfúrico.	95
Figura 37 - Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com ácido sulfúrico (0,6%) e HEDTA 0,2 e 1% ao longo de cinco ciclos fermentativos.	95
Figura 38 - Índice de flocculação de suspensões de levedura PE-2 em fermentações tratadas com 500 e 1.000 ppm de EDTA.	96
Figura 39 - Flocculação de leveduras em fermentação etanólica contaminada com bactéria láctica, em aumento de 1.000 X.	97
Figura 40 - Curva padrão de calibração de sacarose 0,1% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais (ART) em função da absorbância (546nm), pelo método DNS em espectrofotômetro Bioespectro mod. SP-22.	118
Figura 41 - Bactéria láctica isolada de fermentação industrial vista ao microscópio ótico (aumento 1000 x) em suspensão (A) e em coloração de Gram (B).	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica de melão de cana-de-açúcar	23
Tabela 2 - Antibióticos utilizados em fermentação alcoólica e seus respectivos mecanismos, efeitos e espectro de ação.	36
Tabela 3 - Produtos utilizados nos tratamentos dos inóculos mistos e no mosto de melão submetidos a fermentação.	51
Tabela 4 - Produção de ácido láctico em caldo MRS inoculado com <i>L. fermentum</i> ($3,5 \times 10^7$ bact./mL) com diferentes concentrações do biocida Huwa-San.após 6 horas de fermentação a 37°C.	65
Tabela 5 - Viabilidade (%) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 tratada com produto Huwa-San e ácido sulfúrico após 6 horas de fermentação em diferentes temperaturas.	65
Tabela 6 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos tratados com Huwa-San 200 ppm e ácido sulfúrico 1.200 ppm.	70
Tabela 7 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (500 ppm) e ácido sulfúrico (1.800 ppm).	81
Tabela 8 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx a 35°C, inoculadas com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (1.000 ppm) e ácido sulfúrico (1.800 ppm).	81
Tabela 9 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentação de mosto de melão 22° BX em batelada, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico (1,8% m/v).	75
Tabela 10 - Parâmetros do 2º ciclo de fermentação de mosto de melão industrial em batelada, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico (1,8% m/v).	75
Tabela 11 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> sem tratamento, nos tempos zero e após 6 horas a 35°C.	76
Tabela 12 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentações com inóculos mistos (<i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i>) tratados com biocida TCC + CBA 4% após 6 horas.	77
Tabela 13 - Parâmetros de fermentações tratadas com concentrações crescentes do biocida TCC+CBA 2% em ausência e presença de ácido sulfúrico (600 00m) após 6 horas.	77
Tabela 14 - Efeito inibitório do digluconato de clorexidina sobre a produção de ácido láctico e viabilidade da levedura em fermentações de melão por <i>S. cerevisiae</i> contaminados por <i>L. fermentum</i> .	80
Tabela 15 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C.	81

Tabela 16 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculados com <i>S. cerevisiae</i> e de <i>L. fermentum</i> , após 6 horas de fermentação a 35° C, com inóculos tratados com antibacterianos naturais maitenina e extrato de lúpulo; e ácido sulfúrico.	82
Tabela 17 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C.	85
Tabela 18 - População de bactérias em fermentações de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , antes e após tratamento com antibióticos ionóforos.	86
Tabela 19 - Parâmetros de fermentação de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , após 6 horas a 35° C..	90
Tabela 20 - pH e população de bactérias em fermentações de mosto de melação 22° Bx, inoculado com <i>S. cerevisiae</i> e bactéria láctica isolada de fermentação industrial (BAL), antes e após tratamento com antibióticos ionóforos.	90
Tabela 21 - Concentrações de açúcares redutores totais (ART%) nos melações e mosto 22° Bx, obtidas pelo método DNS, a partir da curva padrão (Figura 40).	118
Tabela 22 - Viabilidade de levedura em fermentações contendo diferentes concentrações de ácido láctico e ácido sulfúrico, referente às Figuras 10 e 11.	119
Tabela 23 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com biocida TCC + CBA, em comparação com ácido sulfúrico, referente à Figura 22.	119
Tabela 24 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com a maitenina, extrato de lúpulo, e com ácido sulfúrico, referente à figura 24.	119
Tabela 25 - Concentração de etanol em fermentações tratadas com a maitenina, extrato de lúpulo, em comparação com ácido sulfúrico, referente à figura 25	120
Tabela 26 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com <i>L. fermentum</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 27.	120
Tabela 27 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com <i>Lactobacillus ssp.</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 31.	120
Tabela 28 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com <i>L. fermentum</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 28.	120
Tabela 29 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com <i>Lactobacillus ssp.</i> , tratadas com salinomicina e monensina, referente à figura 32.	120

RESUMO

A contaminação bacteriana nas destilarias de etanol é um problema crônico que afeta o rendimento, na medida em que esses microrganismos competem pelo substrato a ser convertido em álcool pelas leveduras e liberam produtos indesejados no meio. A adição de ácido sulfúrico ao inóculo é a prática mais utilizada no controle dessas bactérias, contudo é uma substância de baixa eficácia, que também afeta a levedura. Antibacterianos utilizados complementarmente devem levar em conta a seletividade; o espectro de ação; e ainda restrições em fermentações que utilizam o excedente de levedura para ração animal. Nesse contexto, esse trabalho se propôs a estudar diversos biocidas, com base na literatura e desempenho em outras áreas. Foram realizadas fermentações por bateladas em frascos agitados em condições operacionais padrão (pH, temperatura, concentração de açúcares) com recuperação de células ao final de cada ciclo, reproduzindo o processo industrial. Os inóculos contendo leveduras e bactérias foram tratados com os seguintes produtos: peróxido de hidrogênio aditivado com prata; cloro oxigenado; triclorocarbanilida; cloreto de benzalcônio; digluconato de clorexidina; maitenina; salinomicina, e agentes quelantes EDTA e HEDTA, além dos produtos referência (beta ácido de lúpulo e monensina). Ao final das fermentações foram analisadas a população de bactérias, a viabilidade da levedura, e os teores de ácido láctico e etanol. O biocida a base de peróxido, na dose 1.000 ppm não mostrou a mesma eficácia registrada nos testes preliminares *in vitro*, que apontaram CIM de 200 ppm para bactérias lácticas; os biocidas triclorocarbanilida (80 ppm) associado ao cloreto de benzalcônio e clorexidina (50 ppm) tiveram desempenho inferior ao reportado na literatura. O cloro oxigenado na dose 100 ppm afetou tanto a bactéria quanto a levedura. Os extratos vegetais (lúpulo e maitenina), dosado a 30 ppm, se mostraram inócuos à levedura, e exibiram efeito bacteriostático sobre bactérias. Os antibióticos ionóforos (monensina 3 ppm e salinomicina 6 ppm) foram os mais efetivos na inibição das bactérias, preservando a viabilidade e metabolismo da levedura, com maior produção de etanol. Os agentes quelantes na concentração 1.000 ppm não foram efetivos na desfloculação microbiana, nem aumentaram a produção de etanol.

Palavras-chave: Fermentação etanólica. Contaminação bacteriana. Biocidas. Descontaminação de levedura. Tratamento de melaço.

ABSTRACT

Bacterial contamination in ethanol distilleries is a chronic problem that affecting the yield, once these microorganisms compete for the substrate to be converted to alcohol by yeast, as well as release undesired products in the medium. The addition of sulfuric acid to the inoculum is the most used practice to control such bacteria, but is a substance of low efficacy, which also affects the yeast. Antibacterial used in addition should take into account the selectivity; spectrum; and also restriction in fermentation that uses yeast surplus for animal feed. In this context, this work proposes to study various biocides, based on the literature and performance in other areas. Batch fermentations were performed in shake flasks under standard operational conditions (pH, temperature, sugar concentration) with a recovery of cells at the end of each cycle, reproducing the industrial process. The inoculum containing yeast and bacteria were treated with hydrogen peroxide plus silver; oxygenated chlorine; trichlorocarbanilide plus benzalkonium chloride; chlorhexidine digluconate; maytenin; salinomycin, and chelating agents EDTA and HEDTA, indeed the reference products (beta hops acid and monensin). At the end of fermentations were performed analysis of population of bacteria, yeast viability and lactic acid and ethanol concentration. The peroxide-based biocide in the dose 1000 ppm did not showed the same efficacy recorded in preliminary tests *in vitro*, which showed a MIC of 200 ppm for lactic acid bacteria; the trichlorocarbanilide biocides (80 ppm) associated with benzalkonium chloride and chlorhexidine (50 ppm) had underperformed reported in the literature. Oxygenated chlorine at dose 100 ppm affected both the bacterium as yeast. The plant extracts (hops and maytenin), dosed at 30 ppm, exhibited bacteriostatic effect on bacteria and proved harmless to yeast. Antibiotic ionophores (monensin - 3 ppm and salinomycin - 6 ppm) showed higher bactericidal effect, preserving the viability and metabolism of the yeast with increased ethanol production. Chelating agents at concentration 1000 ppm were not effective in microbial deflocculating and not increased ethanol production.

Keywords: Ethanol fermentation. Bacterial Contamination. Biocides. Yeast decontamination. Molasses treatment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	Revisão da literatura	21
2.1	A importância do etanol combustível	21
2.2	Matérias-primas para produção de etanol	21
2.3	O microrganismo da fermentação	24
2.4	Fermentação etanólica	25
2.5	Processos industriais para produção de etanol	26
2.5.1.	Processo de fermentação Melle-Boinot	27
2.6	Extração de levedura de fermentação para nutrição animal	28
2.7	Contaminação bacteriana na fermentação etanólica	28
2.8	Floculação entre leveduras e bactérias	32
2.9	Controle da contaminação em fermentação etanólica	34
2.9.1	Ácido sulfúrico	35
2.9.2	Antibióticos	36
2.9.3	Peróxidos	38
2.9.4.	Antibacterianos diversos	39
2.9.5	Agentes quelantes	41
3	Objetivos	43
4	Material e métodos	45
4.1	Microrganismos e manutenção	45
4.1.1	Levedura	45
4.1.2	Bactérias	45
4.2	Meios de cultivo e manutenção	45
4.2.1	Meio YPD	45
4.2.2	Meio MRS	46
4.2.3	Caldo MRS	46
4.2.4	Mosto de melação 10° Bx	46
4.2.5	Mosto de melação 22° Bx	47
4.3	Antibacterianos e agentes químicos	47
4.4	Preparo das soluções de trabalho	48
4.5	Propagação e manutenção da levedura	48
4.6	Propagação das bactérias	50
4.7	Preparo do inóculo misto	50
4.8	Tratamentos antibacterianos	50

4.9 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San pelo método de microdiluição em placas	51
4.9.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre <i>S. cerevisiae</i> e bactéria lática.....	51
4.9.2 Determinação da concentração inibitória mínimas do Huwa-San sobre <i>L. fermentum</i> pelo método de macrodiluição em tubos.....	52
4.11 Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico	53
4.12 Teste de desfloculação celular	53
4.13 Ensaio analítico.....	54
4.14 Ensaio microbiológico	55
5 Resultados e discussão	61
5.1 Variação na viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico em diferentes concentrações.....	61
5.2 Avaliação da atividade biocida do Huwa-San sobre microbiota de fermentação etanólica.....	63
5.2.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre levedura PE-2 e bactérias lácticas.....	63
5.2.2 Efeito de tratamentos com Huwa-San sobre viabilidade de levedura PE-2 em fermentação.....	65
5.2.3 Efeito do produto Huwa-San sobre brotamento de levedura PE-2	67
5.2.4 Efeito do produto Huwa-San sobre cultivo de levedura PE-2	68
5.2.5 Efeito do tratamento dos inóculos mistos com Huwa-San sobre levedura PE-2 e <i>L. fermentum</i> em fermentação.....	70
5.3 Efeito do cloro oxigenado (COS) sobre levedura e bactéria láctica em fermentação	72
5.4 Efeito de tratamentos com triclorocarbanilida em associação com cloreto de benzalcônio sobre <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> em fermentação.....	76
5.5 Efeito do digluconato de clorexidina sobre <i>S. cerevisiae</i> e bactérias lácticas em fermentação.....	79
5.6 Efeito da maitenina e extrato de lúpulo sobre microbiota de fermentação etanólica....	81
5.7 Efeito de antibióticos ionóforos sobre bactérias lácticas e levedura PE-2 em fermentação etanólica	85
5.7.1 Efeito de salinomicina e monensina sobre <i>L. fermentum</i> e levedura PE-2 em fermentação etanólica	85
5.8.2 Desfloculação de células com EDTA	96
6 Conclusões	99
7 Recomendações para próximos trabalhos	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	118

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As alterações climáticas e o acúmulo de substâncias tóxicas provocadas pelo uso de combustíveis fósseis em países com grande frota de veículos têm aumentado a importância e a demanda de álcool combustível – renovável e menos poluente (BALAT; BALAT, 2009). A fermentação, processo pelo qual leveduras convertem os açúcares em álcool, é a etapa mais crítica da produção do etanol (KELSALL; LYONS, 2003). Desse modo, medidas devem ser tomadas para aumentar a produtividade industrial desse biocombustível, o que exige melhor controle microbiológico da fermentação (BASÍLIO et al., 2008).

Uma dessas premissas é manter as células de levedura operando com alta viabilidade, metabolismo eficiente e, conseqüentemente maior produtividade. Nesse sentido, controlar a contaminação bacteriana e manter o pH adequado do mosto é fundamental para proteger a levedura, de modo a obter eficiência e baixo custo de produção (OLIVA-NETO et al., 2013).

O sistema de reciclo de células adotado nas destilarias brasileiras, embora seja vantajoso em diversos aspectos, submete as leveduras a condições de estresse por vários fatores que outros processos de produção de etanol não enfrentam (AMORIM et al., 2011). Substâncias contidas no meio fermentativo, como ácido láctico, sulfito, e etanol, em presença de alta acidez e temperaturas elevadas, têm um efeito sinérgico negativo sobre o metabolismo da levedura (DORTA et al., 2006).

Assim, inovações tecnológicas na fermentação alcoólica correspondem ao uso mais restrito do ácido sulfúrico e o controle da produção de ácido láctico. Isso passa pela pesquisa e desenvolvimento de novos agentes químicos e estratégias alternativas para controlar a contaminação bacteriana (OLIVA-NETO et al., 2013; NARENDRANATH; BREY, 2009).

Nesse contexto, esse trabalho se propôs a avaliar novos produtos destinados ao tratamento do mosto e da levedura, de modo a conter o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico e diminuir o uso do ácido sulfúrico no processo.

Revisão da Literatura

2 Revisão da literatura

Aspectos relevantes da matéria-prima, do processo e produtos utilizados na fermentação etanólica são abordados a seguir.

2.1 A importância do etanol combustível

Atualmente, uma das preocupações mundiais é a busca por fontes de energia alternativas ao petróleo, combustível fóssil não renovável, de reservas limitadas e que contribui para o efeito estufa (ALVES et al., 2012). Nesse contexto, os biocombustíveis têm recebido atenção crescente por serem renováveis e menos poluentes, com destaque para o etanol produzido a partir de substratos obtidos de fontes vegetais (CAVALHEIRO et al., 2012).

O etanol já é o biocombustível mais utilizado para transporte em todo mundo, e com programas em vários continentes, a demanda poderá exceder 125 bilhões de litros em 2020 (BALAT; BALAT, 2009). Nos EUA, o etanol de milho é usado como aditivo oxigenado de gasolina em substituição ao éter de petróleo (PILGRIM, 2009); e no Brasil, o álcool de cana abastece a crescente frota de veículos com motores flexíveis, que aceitam álcool ou gasolina em qualquer proporção (BANCO..., 2008).

A diminuição de emissões de gás de efeito estufa, pelo o uso de etanol de cana em substituição de combustível fóssil, equivale a 27,5 milhões de toneladas de CO₂ anualmente, uma vez que a planta absorve o gás carbônico ao realizar fotossíntese (GOLDEMBERG et. al., 2008).

2.2 Matérias-primas para produção de etanol

As matérias-primas disponíveis para produção de etanol via fermentação são classificadas em três grupos: açúcares, amidos, e materiais celulósicos. Os açúcares podem ser convertidos diretamente em álcool etílico por leveduras ou bactérias, enquanto que o amido do milho deve ser primeiramente hidrolisado por enzimas específicas até açúcares fermentáveis. Finalmente, os materiais celulósicos, como resíduos agrícolas, necessitam de processos de hidrólise mais complexos, antes de serem fermentados (LIN; TANAKA, 2005).

De importância industrial, destacam-se a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) – a matéria-prima básica do álcool brasileiro, e o milho (*Zea mays*), utilizado nos EUA. O rendimento em etanol da cana pode chegar a 9 mil litros por hectare cultivado, enquanto que o milho rende no máximo 4,4 mil litros na mesma área (WHEALS et al., 1999).

Outra vantagem do etanol de cana é o balanço energético. A relação entre a energia renovável obtida por energia fóssil utilizada é de 8,9, enquanto que no etanol milho é de apenas 1,3 (MACEDO, 2007). O álcool de cana no Brasil também tem o menor custo de produção relação ao etanol de milho dos EUA, e o produzido de beterraba na União Europeia (BURNQUIST, 2007).

2.2.1 Melaço

Para a produção industrial de etanol, os melaços de cana ou beterraba se destacam por sua relativa abundância, caráter renovável, disponibilidade, fácil transporte e manipulação, além do baixo custo (ERGUN; MUTLU; GÜREL, 1997).

O melaço de cana é obtido da centrifugação do xarope cristalizado para produção de açúcar, contendo em média 80% (m/v) de sólidos solúveis, devendo ser diluído em água para se obter mostos de 20% (m/v) de açúcares totais antes de ser enviado à fermentação (TANG et al., 2010; AMORIM; BASSO; LOPES, 2009).

O melaço diluído é um substrato prontamente assimilável por *S. cerevisiae*, pois o açúcar predominante é a sacarose, a qual pode ser hidrolisada em seus monossacarídeos constituintes (glicose e frutose), pela ação da enzima invertase presente na levedura (POWER, 2003).

Embora contenha grande parte dos nutrientes essenciais ao metabolismo da levedura (Tabela 1), os melaços também carregam uma série de íons metálicos como cálcio, sódio, ferro, cobre e alumínio, alguns dos quais, em alta concentração, podem ser tóxicos e causar inibição desse microrganismo (LIU et al., 2008).

Além disso, a qualidade e a composição dos melaços podem variar de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem, a região geográfica, o tipo de tratamento do caldo, as condições de operação da fábrica de açúcar e estocagem. Desse modo, a fermentação de mostos de melaço ocorre de modo diferente a cada batelada (PIGGOT, 2003).

Tabela 1 - Composição típica de melaço de cana-de-açúcar.

Substância	Concentração (g/100)
Água	17,0 – 25,0
Sólidos totais	80,5 – 82,3
Sacarose	30,0 – 40,0
Açúcares invertidos	9,0 – 30,0
Outros carboidratos	2,0 – 5,0
Nitrogênio	0,5 – 8,2
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,2 – 1,30
Óxido de cálcio	0,6 – 1,5
Óxido de magnésio	0,07 – 0,4
Potássio	3,5 – 5,0
Cinzas	3,5 – 15,0
Sulfato	1,6
Gorduras, esteróis e fosfolipídeos	0,1 – 1,0
Ácidos não nitrogenados	2,0 – 8,0

Fonte: OLBRICH (1963); TECLU et al. (2009).

O alumínio contido no melaço é convertido à sua forma tóxica (Al⁺³) pela acidez da fermentação, diminuindo a viabilidade da levedura, os níveis de trealose celular, e a taxa de fermentação. Efeitos também observados em alta concentração de potássio, como os mostos de melaço de cana (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009).

O cálcio, aplicado na forma de cal (CaO) no processo de produção de açúcar, é responsável por diversos efeitos negativos na fermentação etanólica. A partir de 0,18% (m/v) ocorre diminuição na taxa de fermentação e em concentrações de 2,16% a fermentação é praticamente interrompida pela possível inibição da enzima invertase da levedura (CHOTINEERANAT et al., 2010). Em concentrações superiores a 1 mM a captação de aminoácidos é reprimida, e acima de 25 mM inibe o crescimento da levedura e a produção de etanol e biomassa (HEGGART et al., 1999 apud RUSSELL, 2003). Esse elemento também potencializa a floculação entre as leveduras e bactérias do gênero *Lactobacillus* (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009).

A contaminação microbiológica também está presente em melaços, pois microrganismos do caldo podem sobreviver ao processo térmico e proliferar na superfície úmida dos tanques de estocagem (INGLEDEW; AUSTIN; KRAUS, 2009). Significativa diversidade de microrganismos, entre fungos, leveduras e bactérias foi identificada por Pillai et al. (2011) em melaço de fábrica de açúcar indiana, portanto, é de se esperar que metabólitos microbianos sejam comuns em melaços.

A dextrana – polímero de glicose produzido pelo gênero *Leuconostoc* é contabilizada como açúcar redutor, mas não é fermentável, e aumenta a formação de espuma nas dornas (PIGGOT, 2003). O ácido láctico – composto orgânico de baixa massa molecular produzido por *Lactobacillus* e inibidor da levedura (OLIVANETO; YOKOYA, 1994) foi detectado em concentrações entre 0,05 a 0,88 % (m/v) em melaços de usinas de açúcar do estado de São Paulo (VENTURA, 2007).

Desse modo, tratamentos térmico e físico-químico têm sido sugeridos para controlar a contaminação microbiológica em melaços, antes de ser enviado à fermentação (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; TANG et al., 2010).

2.3 O microrganismo da fermentação

Embora algumas espécies de bactérias possuam metabolismo fermentativo, como *Z. mobilis*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é virtualmente o único microrganismo de uso comercial para produção de álcool (ZANDYCKE, 2009), pois, mesmo em presença de oxigênio, metaboliza altas concentrações de glicose pela via fermentativa, denominado efeito Crabtree (RUSSEL, 2003).

Leveduras são classificadas como fungos ascomicetos unicelulares eucarióticos, não filamentosos, e heterotróficos (utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia), e se reproduzem por brotamento. Apresentam formas esférica, ovoide a elipsoide; tamanho de 1 a 5 µm de largura e 5 a 30 µm de comprimento, não possuem flagelos ou outros meios de locomoção, e têm parede celular rígida formada por mananas (PELCZAR et al., 1996; WALKER, 1998).

Legras et al. (2007) identificaram 575 genótipos diferentes em 651 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de vinícolas, cervejarias, destilarias de etanol e panificação, coletadas em 56 regiões dos vários continentes, o que constata a domesticação desse microrganismo pelo homem ao longo da história.

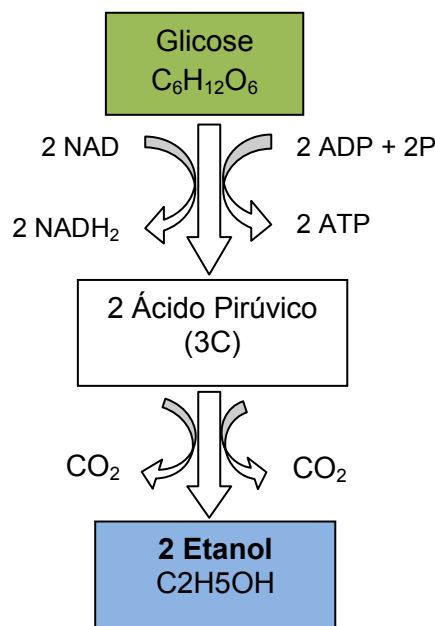
O amplo uso dessa levedura se deve às características de interesse industrial, tais como: utilização de várias fontes de carbono, crescimento rápido, metabolismo aeróbio e anaeróbio, alto desempenho fermentativo, permanência e dominância no processo, facilidade de manipulação genética (LALUCE et al., 2012). *S. cerevisiae* também é tolerante a altas concentrações de álcool, bem como é reconhecida como segura para ser utilizada como aditivo em alimentos e ração animal (LIN; TANAKA, 2005).

Nas fermentações industriais para produção de etanol são empregadas leveduras selecionadas (PELCZAR et al., 1996). Linhagens especiais de *S. cerevisiae* têm sido obtidas usando-se técnicas de isolamento, seleção, hibridização, fusão de esferoplasto, ou métodos de clonagem, de modo a terem características como: fermentações de alto desempenho; boa dispersão em água; baixo nível de autólise; alta viabilidade; baixa produção de glicerol, tolerância a pH ácido, altas temperatura, altos teores de açúcares e álcool, e pouca formação de espuma (INGLEDEW; AUSTIN; KRAUS, 2009; BASSO et al., 2008).

2.4 Fermentação etanólica

Fermentação é um termo geral para a degradação anaeróbia da glicose por organismos, para obtenção de energia em forma de ATP (NELSON; COX, 2011). Na levedura, o piruvato obtido da quebra da glicose sofre a ação da enzima piruvato-decarboxilase e, na segunda fase, o acetaldeído é reduzido pela álcool-desidrogenase, e convertido em etanol e gás carbônico (Figura 1).

Figura 1 - Rota bioquímica simplificada do metabolismo da glicose a etanol em levedura.



Fonte: Adaptado de Nelson; Cox (2011).

Em condições anaeróbias, o rendimento da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de glicose metabolizada. Os dois ATP's produzidos na glicólise são utilizados na biossíntese de células de levedura. Portanto, a fermentação etanólica é um processo microbiano no qual o produto é sintetizado durante a fase primária de crescimento do microrganismo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Adicionalmente ao etanol, outros subprodutos, como glicerol, ácidos orgânicos, e álcoois superiores também são produzidos durante a fermentação alcoólica. Esses produtos secundários, bem como o crescimento das células desviam alguns intermediários glicólicos para as vias metabólicas correspondentes, diminuindo o rendimento de etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2006).

2.5 Processos industriais para produção de etanol

Basicamente, um processo fermentativo consiste em preparar um meio de cultura adequado, levá-lo a um biorreator e adicionar um microrganismo específico para conduzir o processo biológico e, ao final, obtém-se o produto desejado, o qual normalmente deve ser recuperado e purificado (SCHIMIDELL, 2001).

As fermentações podem ser operadas por três processos distintos: em bateladas, contínuo e batelada alimentada. No processo em bateladas, o substrato é adicionado no fermentador e, então, as leveduras são inoculadas. Após o consumo dos açúcares, ao final do processo, o meio é removido do fermentador. Na fermentação contínua, o substrato é adicionado continuamente no tanque, com remoção simultânea de porção do fermentado. No processo batelada alimentada o substrato é adicionado gradativamente no fermentador, que recebeu previamente o inóculo, até atingir o volume útil do tanque (ZHANG, 2009).

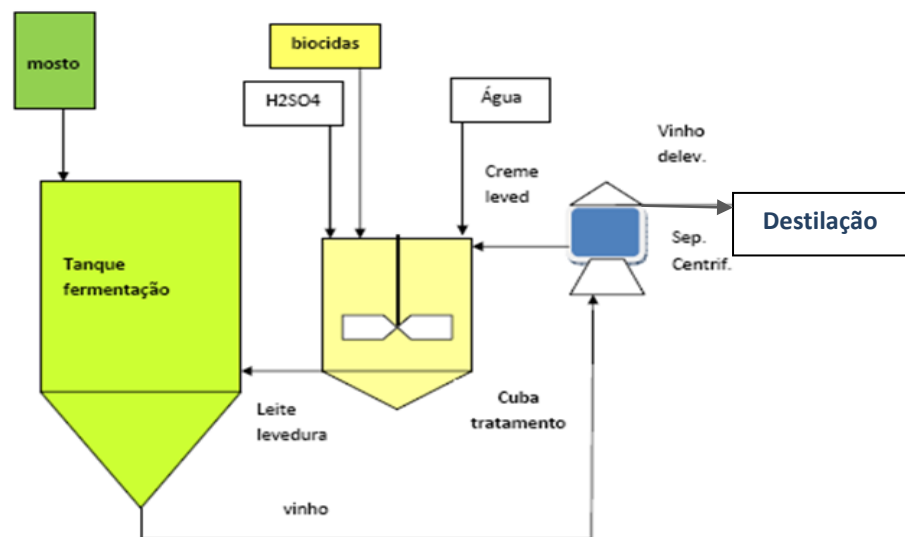
Produtos microbiológicos, principalmente produtos de preços relativamente baixos, como o etanol, só são economicamente viáveis se forem obtidos em grande escala (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Embora a produção de álcool via fermentação seja um processo relativamente simples, conduzi-lo em larga escala e com alta eficiência exige uma notável combinação de microbiologia e engenharia, de modo a corrigir prontamente os problemas recorrentes nas destilarias e garantir altos rendimentos (LYONS, 2003; INGLEDEW et al., 2009).

2.5.1. Processo de fermentação Melle-Boinot

No Brasil, as destilarias de etanol empregam o processo fermentativo Melle-Boinot (Figura 2), em bateladas ou contínuos multiestágios, no qual as células de levedura são recuperadas ao final de cada fermentação (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994). Isso torna desnecessário gastar açúcar para propagação de levedura a cada novo ciclo fermentativo, possibilitando rendimentos de até 93% (WHEALS et al., 1999; AMORIM et al., 2011).

Figura 2 - Esquema do processo de fermentação etanólica Melle-Boinot.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Atualmente as destilarias brasileiras são projetadas com fermentadores de grande porte (400 a 2.000 m³), a maioria operando no sistema batelada alimentada (70%), ou contínuo multiestágios (30%), ambos com recuperação de células com taxas superiores a 90% (AMORIM et al., 2011). Outra importante vantagem desse sistema é que opera com alta densidade celular (10-15% v/v), o que permite menor tempo de fermentação.

Contudo, no período da safra da cana, de 250 dias em média, as leveduras são recicladas em torno de 500 vezes sucessivamente, submetendo as células a constantes condições de estresse, como temperatura, acidez, etanol, entre outras substâncias inibitórias (AMORIM et al., 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.6 Extração de levedura de fermentação para nutrição animal

Nos processos com reciclo de levedura se consegue trabalhar com alta densidade celular (AMORIN et al., 2011), e o excedente de levedura das fermentações pode ser extraído na forma de creme e secado até se obter o farelo de levedura (FERNANDES et al., 1998; YAMADA et al., 2003).

A produção de levedura destinada à nutrição animal vem ganhando atenção nas destilarias brasileiras, especialmente a partir dos problemas relacionados à "doença da vaca louca", ocorridos na Europa. Assim, a busca por novas fontes de proteína, livre de contaminantes, abriu oportunidade para o setor sucroalcooleiro explorar esse subproduto (AMORIM; LOPES, 2009).

Produtos de alto valor agregado, como levedura viva, inativa, parede celular, hidrolisados, e levedura enriquecida com minerais têm sido introduzidos na criação de ruminantes, aves e suínos. Os principais benefícios estão relacionados à maior produtividade, além da regulação da microbiota intestinal (GRAHAM et al., 2009).

Embora as características nutricionais da levedura sejam de grande interesse na nutrição animal, possíveis contaminantes, como toxinas, metais pesados, e residual de antibióticos têm despertado a atenção sobre a qualidade desse subproduto da indústria alcooleira (FERNANDES et al., 1998; VENTURA, 2009).

2.7 Contaminação bacteriana na fermentação etanólica

As contaminações que ocorrem na fermentação etanólica podem ter origem em leveduras selvagens (BASÍLIO et al., 2008) e, principalmente, bactérias lácticas (GALLO, 1992; INGLEDEW, 2009b; NARENDRANATH; 2003). Esses problemas são especialmente sentidos nas fermentações contínuas, onde a dificuldade de assepsia torna a contaminação mais severa do que nos sistemas em bateladas (AMORIM et al., 2011; ZHANG, 2009).

O fenômeno da contaminação nas fermentações é estudado desde o século XIX, por Pasteur, que associou a formação de ácidos orgânicos nos vinhos à presença de bactérias nos mostos. Ele concluiu que o açúcar servia de alimento para os microrganismos e cada substância formada era devida a uma espécie que se desenvolvia naquelas condições (KETCHUM, 1988).

Do mesmo modo, a agroindústria da cana-de-açúcar enfrenta sérios problemas de contaminantes, pois a matéria-prima carrega consigo uma grande

quantidade de microrganismos que fazem parte da sua microbiota (DUNCAN; COLMER, 1964). Uma vez dentro do ambiente industrial, essas bactérias se desenvolvem em tanques, tubulações e trocadores de calor, e podem entrar nos reatores de fermentação de várias maneiras, dependendo do processo e padrão de cada indústria (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

Nas destilarias de etanol anexas a fábricas de açúcar as bactérias chegam à fermentação principalmente por meio do mosto, mas também pelas águas de diluição do melaço e levedura (CAMOLEZ; MUTTON, 2005). Uma vez que as fermentações industriais, pela sua dimensão, não são conduzidas em condições de completa assepsia, a contaminação bacteriana está sempre presente e, dependendo da intensidade, compromete o rendimento industrial (LIMA et al., 2001). Além disso, a fermentação de uma destilaria de etanol combustível geralmente é operada com menos cuidado do que seria devido a um sistema biológico, causando distúrbios e alterações no meio afetam a levedura e, conseqüentemente, as demais etapas do processo (INGLEDEW, 2009b).

As interferências que as bactérias provocam nas fermentações ocorrem em função da vasta diversidade da microbiota bacteriana que incide nas destilarias de etanol, composta principalmente por lactobacilos Gram positivos, homo ou heterofermentativos (GALLO, 1992; SKINNER; LEATHERS, 2004; LEJA; BRODA, 2009; LUCENA et al., 2010).

Experimentos conduzidos por Oliva-Neto e Yokoya (1994) com fermentações contaminadas por bactérias durante 15 ciclos fermentativos mostraram aumento de 2,7 vezes na acidez produzida, decréscimo 26 pontos percentuais no rendimento em álcool e diminuição de 64% na viabilidade da levedura. Narendranath et al. (1997) inocularam cinco espécies de lactobacilos comuns em fermentação etanólica em mosto com 10^6 UFC de levedura/mL e registram perdas entre 3,8 a 7,6% do etanol produzido, dependendo da espécie contaminante, além do desvio de 1% do açúcar (p/v) para o crescimento das bactérias. Em fermentações inoculadas com *S. cerevisiae*, *Lactobacillus paracasei* e *L. plantarum*, Hynes et al. (1997) registraram perdas superiores a 6%, calculadas com base na relação estequiométrica entre o etanol e o ácido láctico. Kelsall e Lyons (2003) relacionaram a população de bactérias contaminantes em fermentações industriais de milho com perdas de etanol, as quais atingiram 1,5% da produção anual em destilaria contaminada com 10^9 bactérias/mL,

enquanto que Amorim et al. (2011) relatam perdas de etanol de até 3% em relação à produção diária quando a fermentação está contaminada com 10^8 bactérias/mL.

As bactérias láticas são acidófilas, micro aerófilas ou aero tolerantes, desprovidas de movimento, possuem exigência nutricional complexa, excretam ácido láctico como principal produto do metabolismo, além de ácido acético, entre outras substâncias (KANDLER; WEISS, 1986). Além de desviar parte do açúcar que deveria ser convertido em álcool, os subprodutos dessas bactérias afetam o metabolismo e o crescimento da levedura. Assim sendo, a contaminação bacteriana constitui a maior causa de queda no rendimento das fermentações para produção de etanol. (NARENDRANATH, 2003).

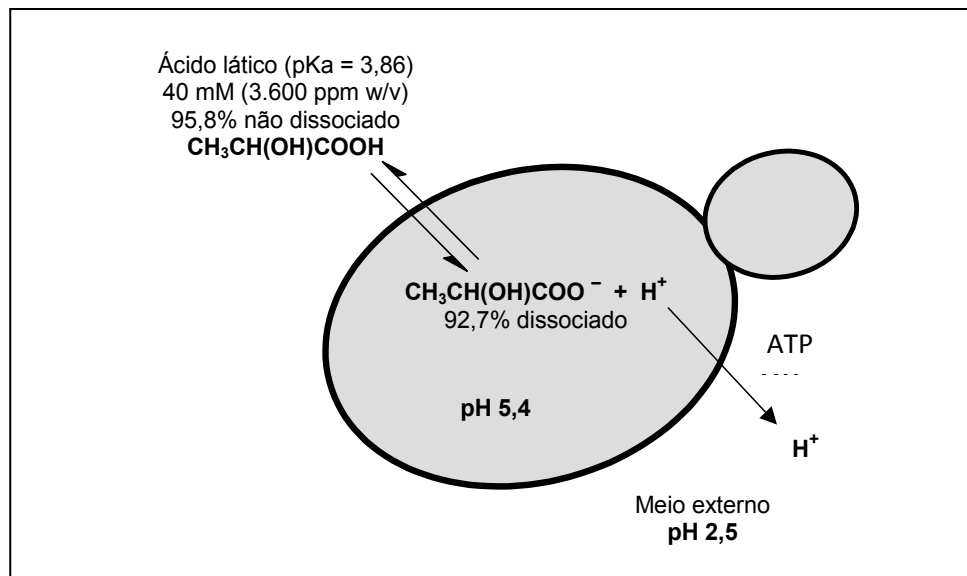
Portanto, em qualquer tipo de fermentação a contaminação é indesejável, uma vez que variações na quantidade e na viabilidade da levedura, ou na diminuição da velocidade de fermentação, resultarão em perdas consideráveis com queda na eficiência e na produtividade e aumento dos gastos com insumos (AQUARONE; SATO, 2001; OLIVA-NETO et al., 2012).

O ácido láctico inibe a levedura de diversas maneiras (ESSIA-NGANG; LETOURNEAU; VILLA, 1989), dependendo o pH e outras substâncias presentes no meio. Em condições de anaerobiose, a forma aniônica do ácido láctico pode ser transportada para o interior das células pelo sistema simporte de transporte de prótons com estequiometria ácido:próton 1:1. A forma não dissociada do ácido láctico é capaz de atravessar a membrana plasmática por difusão passiva, em meio contendo glicose (Figura 3), mesmo em ausência de um transportador (NARENDRANATH; THOMAS; INGLDEW, 2001).

Uma vez no interior da levedura, onde o valor do pH encontra-se acima do valor do pKa do ácido láctico (3,86), esse se dissocia, liberando H^+ que acidifica o citosol da célula, afetando a viabilidade das leveduras de modo diretamente proporcional à acidez intracelular (IMAI; OHNO, 1995).

Para manter a homeostase intracelular (pH interno), o excesso de prótons deve ser transportado para fora da membrana plasmática através da ação da ATPase, que consome de 10% a 15% da energia de manutenção em forma de ATP (HOLYOAK et al., 1996; CARMELO; SANTOS; SÁ-CORREIA, 1997).

Figura 3 - Esquema de difusão passiva do ácido lático em meio ácido e excreção de H^+ dissociado do íon lactato em *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de Narendranath; Thomas; Ingledew (2001).

O consumo excessivo da energia de manutenção pode levar a perdas em crescimento celular e outras atividades metabólicas essenciais. Em situação de estresse ácido prolongado, a célula perde a sua capacidade de manter seu pH interno e suas atividades fisiológicas, e isto leva à inibição do crescimento e finalmente à morte celular (BRUL; COOTE, 1999).

A concentração inibitória mínima (MIC) do ácido lático para *S. cerevisiae* é de 2,5% (m/v) ou 278 mM, contudo concentrações mais baixas, entre 0,2 a 0,8% (m/v) já provocam estresse na levedura, afetando a taxa de crescimento e o consumo de glicose (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001), especialmente na presença de outras substâncias encontradas nas fermentações industriais, como etanol, ácido acético, ácido sulfúrico e sulfito (DORTA et al., 2006).

Maiorella et al. (1983) registraram a diminuição de 80% de biomassa de levedura em meio com 38 g/L de ácido lático. Mesmo em meios suplementados com extrato de levedura ou mistura de aminoácidos foi verificada inibição completa do crescimento da levedura na presença do equivalente a 49 g/L de ácido lático (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2002).

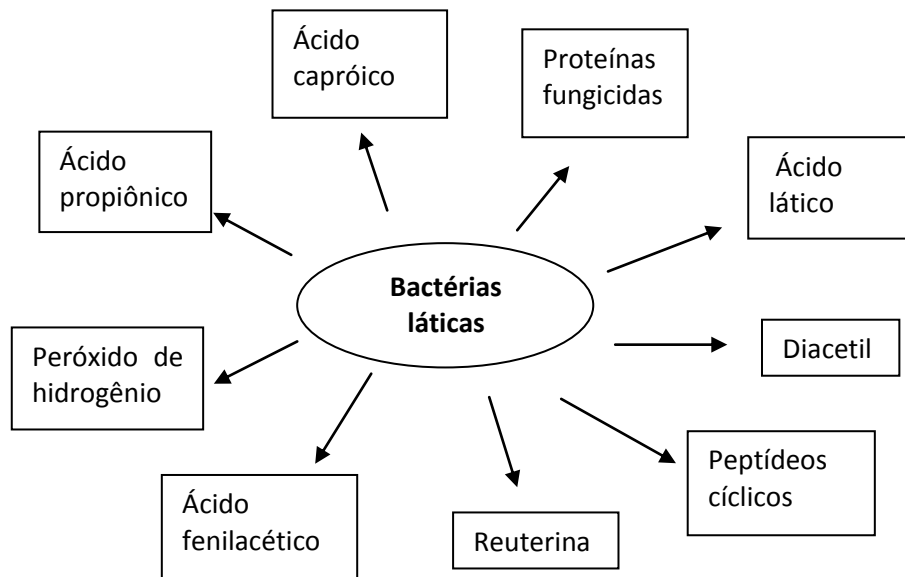
Graves et al. (2006) verificaram que o efeito sinérgico de diferentes concentrações dos ácidos lático e acético na inibição da levedura é mais

pronunciado à medida em que a temperatura da fermentação se eleva de 30°C para 37°C. Como a maioria das destilarias brasileiras está situada na região tropical, onde se registram altas temperaturas ao longo do ano, as fermentações enfrentam mais esse desafio durante grande parte do período de safra (SOUZA et al., 2007).

A interferência do ácido láctico no pH fisiológico intracelular da levedura também pode afetar a atividade de várias enzimas e a condutividade dos canais iônicos, bem como a divisão celular na proliferação das células (MADSHUS, 1988).

Além dos ácidos láctico e acético, outros produtos do metabolismo das diversas espécies de bactérias lácticas exercem poder antifúngico sobre leveduras, especialmente os compostos de baixa massa molecular, ilustrados na Figura 4 (SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Figura 4 - Compostos metabólicos de efeito fungicida produzidos por bactérias lácticas.



Fonte: Adaptado de Schnürer e Magnusson (2005).

2.8 Floculação entre leveduras e bactérias

Outro problema relacionado à contaminação bacteriana nas fermentações refere-se à floculação da levedura, principalmente nos processos com recirculação de células (AMORIM et al., 2011). Esse fenômeno é verificado em diversos graus e

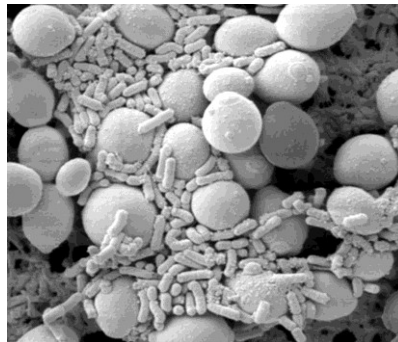
em diferentes meios (PENG, X. et al., 2001) e pode ocorrer entre linhagens de levedura ou entre estas e bactérias lácticas (OLIVA-NETO et al., 2012).

Floculação de leveduras é definida como a agregação reversível, dependente de cálcio, contendo grande número de células para formar flocos que rapidamente sedimentam-se no fundo de um meio líquido com substrato (STRATFORD, 1989, BAUER; GOVENDER; BESTER, 2010).

Segundo Furukawa et al. (2013), os agregados de leveduras e bactérias lácticas constituem interações simbióticas remanescentes de outros nichos ecológicos, onde estes microrganismos evoluíram juntos por muitas gerações, sendo o estado de agregação mais eficaz para a cooperação mútua.

No ambiente da fermentação alcoólica, a co-floculação entre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* foi verificada por Yokoya e Oliva-Neto (1991). Segundo Bromberg e Yokoya (1995), resíduos de aminoácidos da superfície da bactéria, juntamente com resíduos de carboidratos na superfície da levedura são responsáveis pela floculação entre essas espécies (Figura 5).

Figura 5 - Co-floculação entre leveduras e lactobacilos em fermentação etanólica, registrada por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Fermentec.

Substâncias presentes no meio fermentativo, como sais inorgânicos, polieletrólitos, e gomas excretadas por bactérias, contribuem para adesão de células (STRAVER; KIJNE; SMIT, 1993). Contudo, a presença de íons cálcio, abundante no mosto de melação, é fundamental para induzir a floculação, uma vez que esse íon permite que as lectinas (proteínas de parede celular) atinjam a conformação requerida para a agregação (OLIVA-NETO et al., 2012; MILL, 1964).

Nas fermentações industriais, a floculação provoca a decantação das células no fundo dos reatores, afetando a eficiência das separadoras centrífugas. No vinho ocorre arraste de biomassa, levando ao maior consumo de açúcar para repor as células na fermentação seguinte, diminuindo o rendimento; por outro lado, o creme de levedura fica pouco concentrado, devido o retorno de vinho ao processo (AMORIM et al., 2011).

Além disso, a estrutura complexa da floculação, de modo análogo à formação de biofilmes em comunidades bacterianas patogênicas, favorece os mecanismos de defesa contra os agentes antibacterianos, os quais agem por contato (FUX et al., 2009; TABER, 2008).

2.9 Controle da contaminação em fermentação etanólica

No processo de fermentação etanólica é necessário diminuir o número de microrganismos indesejados presentes no meio de tal modo que o nível dos metabólitos seja mantido suficientemente baixo para não afetar a produção e o rendimento. Assim, o uso de agentes antibacterianos é crucial, uma vez que a destilaria de etanol combustível não opera em condições estéreis, e a levedura é um microrganismo de crescimento relativamente lento em relação às bactérias (OLIVANETO et al., 2012; LYONS, 2003; NARENDRANATH, 2003).

Além disso, aumentos de rendimento na fermentação podem ser obtidos com a desinfecção do meio com uso de antimicrobianos, controle microbiológico e monitoramento dos níveis bacterianos e o produto do seu metabolismo (EARNEST; SNYDER; WESTRA, 2009).

Entre as substâncias químicas utilizadas em desinfecção industrial encontram-se os álcoois, compostos fenólicos, derivados de metais pesados, detergentes, halogênios (cloro, iodo), e óxidos (PELCZAR et al., 1996). Contudo, Aquarone e Sato (2001) enfatizam que para o controle de fermentações, as substâncias que agem sobre as bactérias de modo efetivo, sem afetar a levedura, são as mais indicadas.

Atualmente o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica é feito com uso de ácido sulfúrico, antibióticos, derivados de lúpulo, e biocidas químicos (AMORIM et al., 2011).

2.9.1 Ácido sulfúrico

Segundo Kandler e Weiss (1986), o crescimento de bactérias láticas é reduzido significativamente em meios de pH inferiores a 5,0. Desse modo, a maioria das destilarias de etanol tenta controlar a contaminação bacteriana diminuindo o pH da fermentação com o uso de ácido sulfúrico (NARENDRANATH; BREY, 2009).

No processo fermentativo Melle-Boinot as leveduras em suspensão são sistematicamente submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico após cada fermentação até pH 2,5 (+/- 0,5) por 1 a 3 horas, antes de retornar aos reatores para iniciar um novo ciclo fermentativo (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994).

O efeito biocida do ácido sulfúrico foi verificado pela diminuição da microbiota bacteriana presente no leite de levedura acidificado a pH 2,0 por duas horas (GALLO; CANHOS, 1991), enquanto que Nunes et al. (1991), citado por Oliva-Neto et al. (2012), afirmam que ácido sulfúrico não age como descontaminante.

Segundo Stratford (1996), a floculação é revertida quando o pH é ajustado a valores inferiores a 4,5. Contudo, Guerra e Angelis (1998) atestam que o efeito do tratamento ácido é passageiro e a floculação retorna na fermentação seguinte, quando a adição de substrato eleva o pH do meio.

Simpson e Hammond (1989) observaram alterações na superfície das leveduras, vazamento de ATP, além de baixa tolerância ao tratamento de 16 cepas à lavagem com H_2SO_4 até pH 2,0 vindas de longos períodos de fermentação e armazenamento. Outro efeito negativo da acidificação do meio é o incremento do poder biocida dos derivados de enxofre, como o sulfito, sobre a levedura. Em pH ácido o SO_2 , predominante no meio, é 500 vezes mais ativa sobre a levedura do que outras formas, como HSO_3^- e SO_3^{2-} (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998).

No processo Melle-Boinot, o ácido láctico (pKa 3,86) que retorna junto do creme de levedura e contido no melão (VENTURA, 2007), volta à sua forma protonada por conta da adição do ácido sulfúrico ao leite de levedura (pH 2,5) e, dessa forma, é absorvido passivamente pelas células (NARENDRANATH; THOMAS; INGLDEW, 2001).

Desse modo, Narendranath e Power (2005) atestam que a diminuição do pH não é uma prática adequada para o controle da contaminação bacteriana na fermentação, e o aumento do pH no meio fermentativo contribui para o incremento da produção de etanol.

2.9.2 Antibióticos

Desde a década de 1950 diversos trabalhos relatam o uso de antibióticos para controle de bactérias e aumento de rendimento em fermentação alcoólica, entre os quais: penicilina, tetraciclina, bacitracina, estreptomicina, e polimixina (DAY et al., 1954; AQUARONE, 1960).

KHAN et al. (2008), relaciona vários antibióticos de uso veterinário, como por exemplo, a monensina, virginiamicina, oxitetraciclina, os quais têm sido empregados, isoladamente ou combinados, no controle de bactérias em fermentação etanólica (MUTHAIYAN et al., 2011). Levantamento feito por Narendranath (2003) compila algumas das substâncias disponíveis no mercado de etanol, e algumas de suas características (Tabela 2).

Tabela 2 - Antibióticos utilizados em fermentação alcoólica e seus respectivos mecanismos, efeitos e espectro de ação.

Antibiótico	Mecanismo	Efeito	Espectro
Penicilina	Inibe síntese de parede	Bactericida	Bactérias Gram (+)
Bacitracina	Afeta parede celular	Bactericida	Bactérias Gram (+)
Tetraciclina	Inibe síntese de proteína	Bacteriostático	Bactérias Gram (+) e Gram (-)
Estreptomicina	Inibe síntese de proteína	Bactericida	Bactérias Gram (+) e Gram (-)
Eritromicina	Inibe síntese de proteína	Bacteriostático	Bactérias Gram (+) e Gram (-)
Polimixina	Afeta membrana celular	Bactericida	Bactérias Gram (-)
Virginiamicina	Inibe síntese de proteína	Bactericida	Bactérias Gram (+)
Monensina	Afeta membrana celular	Bactericida	Bactérias Gram (+)
Cloranfenicol	Inibe síntese de proteína	Ambos	Bactérias Gram (+) e Gram (-)

Fonte: Adaptado de Narendranath (2003)

A concentração inibitória mínima de antibióticos comerciais sobre bactérias isoladas de fermentação etanólica, cultivados em meio sintético, foi determinada por Andrietta; Oliveira e Stuppiello (1995). O produto Fermacol inibiu duas das oito bactérias com 0,25 ppm e quatro com 2 ppm; virginiamicina controlou cinco bactérias na dose de 0,25 ppm; penicilina controlou outras cinco com 0,5 ppm e uma com 2 ppm, e cloranfenicol inibiu quatro com 4 ppm e uma com 8 ppm.

Hynes et al. (1997) verificaram a ação da virginiamicina sobre o crescimento e produção de ácido láctico de várias linhagens de lactobacilos contaminantes de fermentação de milho. Na dose de 2 ppm, o produto mostrou efeito diverso sobre as

diferentes espécies, sendo que no geral preveniu perda de rendimento em álcool superior a 11% em relação ao controle. Contudo, experimentos conduzidos por Narendranath (2003) mostraram que o uso repetido desse antibiótico induz a resistência em bactérias mutantes.

Do mesmo modo, ficou evidente a resistência adquirida à virginiamicina, ampicilina, penicilina e tetraciclina em lactobacilos isolados de fermentação de milho com uso regular desses antibióticos, uma vez que a concentração inibitória mínima de todos os produtos foi maior em relação às bactérias isoladas de outra fermentação sem histórico de uso dessas substâncias (BISCHOFF; SKINNER-NEMEC; LEATHERS, 2007).

Stroppa et al. (2000) comparam a ação da penicilina e da monensina sobre bactérias contaminantes isoladas de fermentações em destilarias brasileiras. A monensina provocou expressiva diminuição das populações de bactérias, sem exibir a formação de células resistentes, enquanto que a penicilina, embora tenha agido em menos tempo, mostrou tendência à resistência bacteriana.

A salinomicina é um poliéter ionóforo transportador de K^+ , obtido do metabolismo secundário de *Streptomyces albus* em escala industrial, e originalmente empregada como promotor de crescimento e medicamento veterinário (TAMEHIRO et al., 2003; CÂMARA et al., 2013). Recentemente foi introduzida no controle de bactérias em fermentação etanólica, mostrando alto potencial de descontaminação (VENTURA, 2007).

Apesar dos antibióticos serem uma ferramenta poderosa no combate as bactérias da fermentação etanólica, questões relativas à resistência bacteriana devido ao uso sistemático, resíduos em levedura destinada à alimentação animal, e contaminação de solos e águas, têm preocupado o setor de etanol e agências regulatórias (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; NARENDRANATH e BREY, 2009).

Desse modo, a adição de antibióticos em fermentação deve ser planejada e executada com base em dados minuciosos, de modo a determinar qual a composição do produto, a quantidade e o local a ser aplicado (EARNEST; SNYDER; WESTRA, 2009).

2.9.3 Peróxidos

Os peróxidos são geralmente empregados quando se quer eliminar microrganismos anaeróbios, ou seja, aqueles que não crescem em presença de oxigênio. O efeito tóxico do oxigênio para anaeróbios estritos deve-se a moléculas produzidas durante as reações do gás, formando o radical superóxido, que danifica quase todo tipo de molécula encontrada em uma célula viva, incluindo o material genético do DNA (PELCZAR et al., 1996).

O peróxido de hidrogênio tem como alvos diversos componentes celulares, como proteínas e ácidos nucleicos, estando relacionado com estresse oxidativo, o qual causa a ruptura de rotas metabólicas, mutação, efeito bactericida e bacteriostático (FRIDOVICH, 1998).

Na preservação de alimentos, o peróxido de hidrogênio é adicionado de modo a gerar oxigênio molecular, o qual é extremamente biocida para espécies Gram negativas e Gram positivas (BRULL; COOTE, 1999).

A combinação de peróxido de hidrogênio e ácido peracético (PAHP) diminuiu a população de três espécies de bactérias em mais de 5 log UFC/mL na dose de 0,1% (v/v) e tempo de exposição de 10 minutos (BRÍÑEZ et al., 2006).

Chang, Kim e Shin (1997) avaliaram o efeito de sulfito e peróxido de hidrogênio sobre bactérias em fermentação etanólica contínua, com meio sintético, corrida em laboratório. O sulfito agiu sobre *L. casei* somente em presença do peróxido, enquanto que *L. fermentum* foi menos susceptível ao sulfito do que ao peróxido.

No controle de contaminantes de fermentação etanólica de mosto de milho por *S. cerevisiae*, foi aplicado 30 mM/L de composto a base de peróxido de hidrogênio-ureia. As populações de cinco espécies de lactobacilos inoculados diminuíram de 10^7 UFC/mL para 10^2 UFC/mL após 36 horas de fermentação (NARENDRANATH; THOMAS; INGLDEW, 2000).

Recentes pesquisas revelaram que antibióticos induzem alterações no metabolismo, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais desempenham um papel na morte celular. A relação entre o estresse oxidativo induzido por drogas pode ser explorada a fim de melhorar as terapias antibacterianas (DWYER; KOHANSKY; COLLINS, 2009).

2.9.4. Antibacterianos diversos

Diversos agentes químicos e produtos naturais, alternativos aos antibióticos, têm sido investigados para o controle da contaminação bacteriana na fermentação etanólica.

Andrietta et al. (1995) determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) de quaternário de amônia sobre bactérias isoladas de fermentação etanólica, cultivadas em meio sintético e verificaram que, nas condições do ensaio, o produto inibiu todas as bactérias isoladas com 10 ppm do produto.

Oliva-Neto e Yokoya (2001) avaliaram o efeito bactericida de diversos componentes químicos, entre as quais carbamatos, fenóis, formaldeídos, quaternário de amônio, sulfitos, nitritos e sulfato de cobre, tendo como referência os antibióticos penicilina V ácida e clindamicina. Os autores constataram que os três últimos foram mais efetivos, sendo que a maioria inibiu a levedura nas mesmas concentrações que inibiram as bactérias.

Os efeitos da triclorocarbanilida sobre o crescimento de bactérias lácticas isoladas de fermentação foram verificados por Oliva-Neto e Yokoya (1998) e, posteriormente, Oliva-Neto et al. (2014) testaram diversos compostos químicos, puros e associados, em meio definido com pH 4, sendo que a formulação contendo 3,4,4' triclorocarbanilida (TCC) e cloreto de benzalcônio (CBa) 1:1 (m/m) teve a maior eficácia na inibição de *L. fermentum*.

Meneghin et al. (2008) determinaram a concentração inibitória mínima do dióxido de cloro sobre bactérias isoladas de fermentação etanólica, como segue: *Bacillus subtilis* - 10 ppm; e *Leuconostoc mesenteroides* - 50 ppm; *Lactobacillus fermentum* - 75 ppm; *L. plantarum* - 125 ppm. Contudo, foi observado que em concentração de 50 ppm o produto também afetou a viabilidade de linhagens industriais de *S. cerevisiae* e a 100ppm a levedura foi totalmente inibida. Zhu; Chen e Yu (2013) investigaram o efeito fungicida do dióxido de cloro sobre *S. cerevisiae* em suspensão de 1×10^8 cel./mL expostas por 20 minutos ao produto, observando a inativação de 99,9% das células a partir de 10 mg/L e danos no DNA em concentração de 100 mg/L.

Além disso, o dióxido de cloro, por ser uma molécula pequena, volátil e altamente energética (estado de oxidação +IV), explode sob pressão, conferindo riscos no transporte e armazenamento (NARENDRANATH; BREY, 2009).

Barth et al. (2014) aplicaram o produto Desifix TM 135, a base de ácido per fórmico, em concentrações de 20 a 60 mg/L de creme de levedura e observaram diminuição de 6 logs na contagem de bactérias lácticas inoculadas em meio sintético. Porém, observaram perda de atividade do produto em meios ricos em matéria orgânica e cor, como os mostos de melão, comumente utilizados na indústria.

Rückle e Senn (2006) testaram alfa e beta ácidos de lúpulo contra *L. fermentum* e *L. brevis* em comparação com antibióticos convencionais e observaram concentração inibitória mínima (CIM) entre 20 e 48 ppm para os respectivos produtos, bem como inibição média de 60% na produção de ácido láctico nos fermentados tratados. Leite et al. (2013) utilizaram 46 mg/L de extrato de lúpulo em fermentações com 35 g/L de levedura contaminada com $7,7 \times 10^8$ bactérias/mL, obtendo uma discreta diminuição da contaminação para $3,7 \times 10^8$ UFC/mL, e rendimento de 81,4% em comparação com $5,2 \times 10^8$ UFC/mL e 83,7% obtidos com monensina sódica.

Viegas (2011) avaliou o extrato de própolis verde no combate aos contaminantes da fermentação alcoólica *L. fermentum* e *Bacillus subtilis*, obtendo diminuição de 54,24% e 67,02% respectivamente.

Bacteriocinas também têm sido investigadas para o controle de bactérias em fermentação. Perdas de rendimento de etanol devido ao crescimento e metabolismo de *Lactobacillus plantarum* e *L. brevis* diminuíram em 11% e 7-8%, respectivamente com 5 IU mL^{-1} do peptídeo nisina. O produto controlou a contaminação de meio com 10^6 UFC mL^{-1} de lactobacilos, com diminuição da formação de ácido láctico de 5 para 2 g.L^{-1} (PENG, J. et al., 2012).

Em fermentações de laboratório para produção de vinho, deliberadamente contaminadas, o uso de lisozima nas concentrações 125 e 250 mg/L inibiu o crescimento de quatro espécies de bactérias lácticas e a produção de ácido acético no meio, sem nenhum efeito adverso sobre o crescimento de *S. cerevisiae* ou produção de álcool (GAO et al.; 2002).

Embora não tenham sido encontrados artigos científicos sobre o uso da clorexidina no controle de bactérias em fermentação alcoólica, essa substância tem sido usada comercialmente com esse fim, baseada na ampla aplicação de formulações para assepsia bucal e desinfecção de pele (RAMOS; LEITE; MENEZES, 2012; LOWBURY; LILLY, 1973).

2.9.5 Agentes quelantes

Agentes quelantes, também chamados de amino policarboxilatos, são ligantes sintéticos de várias bases químicas com alta afinidade para formar complexos organometálicos. São utilizados para sequestrar íons, tais com os alcalinos terrosos bivalentes Ca, Mg e Ba, originários da água, de matérias-primas, ou adicionados (OVIEDO; RODRIGUEZ, 2003, NOWAK; VANBRIESEN, 2003).

Morgan e Burstall (1936) apud Albert e Gledhill (1947) atestam que a remoção de parcial ou total de determinado metal que participa ativamente de um sistema biológico pode ser desejável e agentes quelantes têm se mostrado importante ferramenta para tal propósito.

O uso combinado de EDTA em formulações de quaternário de amônia reverteu a resistência adquirida por *Pseudomonas aeruginosa* ao biocida. (KABARA; ORTH, 1997). Leive (1965) constatou que cultura de *E. coli* tratada com EDTA aumentou a permeabilidade da parede celular ao antibiótico actinomicina, e outras substâncias. Xu et al. (2013) também relatam os benefícios e o efeito sinérgico de agentes quelantes em soluções biocidas, usadas na remoção de biofilmes. E ainda, trabalhos na área odontológica, onde a diversidade bacteriana também é vasta, a associação de peróxido de hidrogênio e agente quelante tem sido proposta para o controle de infecções microbianas (MAEKAWA *et al.*, 2009).

ERGUN, MUTLU e GÜREL (1997) utilizaram agentes complexantes de metais em fermentação de melaço por *S. cerevisiae* e conseguiram aumentos da concentração de etanol com a adição de EDTA, ferrocianato de sódio e zeólita nas fermentações.

Contudo, a maior contribuição de um agente quelante para a fermentação etanólica estaria na remoção do cálcio, uma vez que esse cátion mantém as lectinas responsáveis pela floculação de leveduras e bactérias em conformação ativa (STRATFORD, 1996).

Objetivos

3 Objetivos

O presente projeto se propõe avaliar biocidas químicos alternativos para o controle das bactérias contaminantes da fermentação etanólica, que atendam aos requisitos da indústria e sejam inócuos à levedura, especialmente com vistas a diminuir o uso de ácido sulfúrico. Especificamente, foram avaliados diferentes tratamentos em processo de fermentação miniaturizado em escala de laboratório, como segue:

- 1) Agente oxidante (Huwa-San) e cloro oxigenado em substituição o ácido sulfúrico, para evitar os efeitos negativos da lavagem ácida da levedura;
- 2) Produto natural derivado da planta *Maytenus ilicifolia* no controle das bactérias contaminantes;
- 3) Antibiótico ionóforo alternativo aos de uso regular na indústria;
- 4) Agentes quelantes (EDTA e HEDTA) para complexar o cálcio no melaço de modo a minimizar os efeitos desse metal e desflocular o levedo.

Material e Métodos

4 Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de leveduras industriais do departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química da UNESP (Araraquara - SP), com exceção do teste de concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro* do Huwa-San, realizado em laboratório da Supera - USP (Ribeirão Preto - SP).

4.1 Microrganismos e manutenção

4.1.1 Levedura

Foi utilizada *Saccharomyces cerevisiae* linhagem industrial PE-2 de (BASSO et al., 2008), originalmente isolada de fermentação industrial, obtida na coleção do Laboratório de Leveduras Industriais do Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

4.1.2 Bactérias

Foram utilizadas duas cepas: uma bactéria isolada de fermentação industrial da usina Ipê (Nova Independência - SP), caracterizada parcialmente como *Lactobacillus ssp.* Gram positivo, heterofermentativo (DOETSCH, 1981; KANDLER; WEISS, 1986), e cepa de *Lactobacillus fermentum* (CCT 0559), originalmente também isolada de fermentação industrial, e mantida na Coleção de Culturas Tropicais (Fundação André Tosello, Campinas), cedida pelo Laboratório de Microbiologia da UFSCar (Araras - SP).

4.2 Meios de cultivo e manutenção

4.2.1 Meio YPD

Utilizado para crescimento e manutenção das culturas de levedura (SHERMAN; HICKCS, 1991). Composição e preparo do meio:

- Extrato de levedura.....1%
- Peptona.....2%
- Glicose.....2%
- Ágar.....2%

Os três primeiros componentes foram pesados e dissolvidos na quantidade de água para o volume desejado e, em seguida, adicionou-se o ágar. O meio foi esterilizado em autoclave (Fabe Primar, São Paulo) a 121° C por 20 minutos. Ainda quente, o meio foi vertido em placas de Petri descartáveis, e resfriado até solidificar.

4.2.2 Meio MRS

Para cultivo e contagem de bactérias lácticas das amostras de fermentação foi utilizado o meio definido descrito por De Man; Rogosa e Sharpe (1960), acrescido de actidiona para inibição de levedura. O meio foi preparado seguindo-se as instruções do fabricante (Himidia, Índia) e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Foram adicionados 1 mL da solução de actidiona para cada 100 mL de meio ainda fundido, instantes antes de ser vertido nas placas.

Preparo da solução de actidiona: dilui-se 0,1 g de actidiona (Fluka, China) em 100 mL de água destilada esterilizada. A solução estoque ficava mantida em refrigerador a 5° C por um mês e foi adicionada ao meio MRS-Ágar ainda fundido, no momento que era vertido nas placas (CHERUBIN, 2003).

4.2.3 Caldo MRS

Na propagação de bactérias lácticas foram preparados 250 mL do meio, seguindo-se as instruções do fabricante (Himidia, Índia). Esse volume de meio solubilizado foi fracionado equitativamente em 25 tubos de cultura, os quais foram vedados com algodão e esterilizados em autoclave a 121° C por 20 minutos.

4.2.4 Mosto de melão 10° Bx

Este substrato, utilizado na propagação das leveduras foi preparado como descrito a seguir: dissolveu-se 120 g de melão industrial (Usina Batatais - SP; Usina Guarani - SP) em 900 mL de água destilada e ajustou-se a concentração em 10° Brix, com uso de refratômetro óptico K52-032 (Kasvi, China). O meio foi enriquecido com 0,8% de sulfato de amônio granular $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mallinckrodt, México) e 0,1% de extrato de levedura (Himidia, Índia), transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, vedados com espuma de silicone, recoberto com papel celofane hidrófobo e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.2.5 Mosto de melaço 22° Bx

O substrato submetido às fermentações foi preparado com melaço industrial (83° Bx; 58% pureza, 3.000 ppm Ca) proveniente da Usina Guaíra (Guaíra - SP), fracionado em frascos plásticos de 200 mL com tampa, e mantido a -15° C, sendo utilizada apenas a quantidade para cada lote de mosto, como segue: dissolveu-se cerca de 240 g melaço em 800 mL de água destilada, e a concentração foi ajustada em 22°Bx. Durante a homogeneização, adicionou-se 3 a 5 gotas de surfactante Pluronic PE-6100 (BASF, Alemanha) para conter a formação de espuma tanto no preparo, quanto durante as fermentações. O mosto foi transferido para três frascos Erlenmeyer de 500 mL, vedados com espuma de silicone, recoberto com papel celofane hidrófobo e esterilizado em autoclave a 121° C por 20 minutos.

4.3 Antibacterianos e agentes químicos

- Ácido sulfúrico 98% P. A. (AS) (Êxodo Científica, Hortolândia) - Utilizado na acidificação dos e tratamentos complementares dos inóculos.

- Huwa-San TR-50 (HS) (Roam Chemie, Bélgica) - Produto a base de peróxido de hidrogênio (50%) aditivado com nano partículas de prata coloidal.

- Cloro oxigenado solúvel (COS) (Multiclor, Valinhos) - Produto originalmente patenteado para uso em tratamento de águas (MULTICLOR... 2011).

- Triclorocarbanilida (TCC) (Bayer, Alemanha).

- Cloreto de benzalcônio 50% (CBA) (Quimatec, Araraquara).

- Neobiodine 20% (GC) (Neobrax, Barretos) - Digluconato de clorexidina aplicado na sua forma tal qual, com doses calculadas em base 100% ativo.

- Betabio 45% (BB) (Wallerstein, São Paulo) - Extrato de beta-ácidos de lúpulo a 45% em solução aquosa e polipropileno glicol, utilizado como referência nos tratamentos com produto natural maitenina.

- Maitenina (MT): Metabólito secundário da planta *Maytenus ilicifolia*, extraído, purificado e caracterizado no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química - UNESP (Araraquara-SP).

- Salinomicina 40% (SL) (Phibro Saúde Animal, Guarulhos) - Antibiótico poliéter ionóforo, produto do metabolismo secundário de *Streptomyces albus*, parcialmente purificado.

- Kamoran (MN) (Química Real, Belo Horizonte) - Antibiótico poliéter ionóforo tendo como princípio ativo monensina sódica cristalina.
- EDTA - Etileno diamino tetracético sal sódico 99% (Merck, Rio de Janeiro).
- Trilon D 40% (TD) (BASF, Alemanha) - Agente quelante orgânico, base ácido hidroxí etileno diamino tetracético (HEDTA), estável em meio ácido.

4.4 Preparo das soluções de trabalho

- Preparo da solução TCC + CBA 2%: foram pesados 0,25 g de triclorocarbanilida (TCC) e dissolvidos em aproximadamente 15 mL de acetona P. A. e adicionou-se 0,51 mL de cloreto de benzalcônio 50% (CBA). A solução contendo os biocidas na proporção 1:1 (m/v) foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com acetona.

- Preparo da solução de maitenina: Pesou-se 0,1 g do produto tal qual, e dissolveu-se em algumas gotas de metanol, e completou-se o volume com 100 mL de água destilada estéril.

- Preparo da solução de salinomicina: Pesou-se 0,1 g do produto tal qual, e dissolveu-se em algumas gotas de etanol, e completou-se o volume com 100 mL de água destilada estéril.

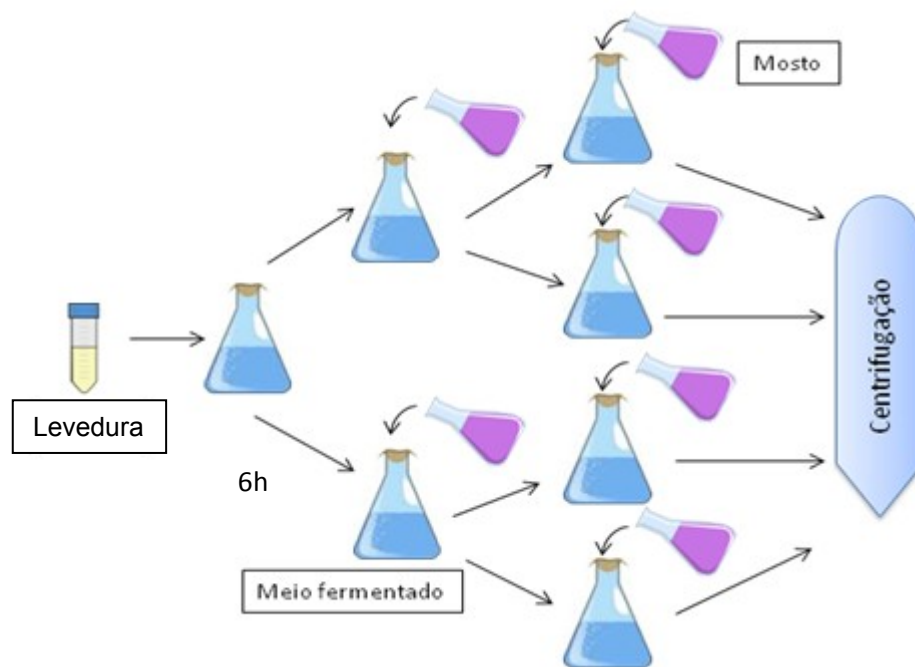
- Preparo da solução de monensina: Pesou-se 0,1 g do produto tal qual, e dissolveu-se em algumas gotas de etanol, e completou-se o volume com 100 mL de água destilada estéril.

4.5 Propagação e manutenção da levedura

Colônias puras de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, mantidas a - 80° C foram transferidas com alça de platina, em condições estéreis, para meio YPD solidificado em placas de Petri, e incubadas em estufa bacteriológica (Fanem 002 CB, São Paulo) a (KIRSOP, 1991). As colônias uniformes crescidas no meio foram transferidas para dois tubos de cultura contendo 10 mL de mosto 10° Bx (item 4.2.4) e levadas à estufa a 33° C por 24 horas. A biomassa crescida foi recuperada do meio por centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos a 5° C (Centrífuga Sorvall – Legend March 1.6R, Alemanha). A sequência de propagação, é descrita a seguir e ilustrada na Figura 6.

As células recuperadas foram transferidas para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do mosto 10° Bx, que foi levado à incubadora agitadora (MA-830/A - Marconi, Piracicaba) para crescimento a 33° C a 120 rpm. A cada duas horas adicionou-se 50 mL de mosto até completar 200 mL. Esse volume de meio, ainda em fermentação, foi dividido equitativamente em outros dois frascos e iniciada novamente a alimentação com 50 mL de meio em cada frasco, e assim sucessivamente, até se obter quatro frascos com 200 mL de meio fermentado. As células foram recuperadas por centrifugação a 3.000 rpm, 5° C, por 3 minutos. A biomassa obtida foi lavada com água destilada estéril, centrifugada novamente em tubos Falcon, removida a água e os pellets de células (cerca de 5 mL de massa úmida) cobertos com glicerol 50% e estocados em freezer a -15° C (KIRSOP, 1991).

Figura 6 - Esquema de propagação de levedura pelo sistema de cortes em batelada alimentada com mosto de melação 10° Bx.



Fonte: Adaptado de Coradello (2012).

Esse procedimento foi repetido por quatro semanas consecutivas de modo a se obter quantidade de inóculo, fracionado nos tubos Falcon, suficiente para os experimentos realizados ao longo de seis meses.

4.6 Propagação das bactérias

Cada uma das culturas puras de bactérias crescidas nas placas de Petri foi transferida com alça de platina, para um tubo contendo caldo MRS (Item 4.2.3), o qual foi colocado em estufa bacteriológica a 37° C. Após 24 horas de incubação, o volume desse caldo contendo bactéria foi dividido para outros dois tubos contendo 10 mL de meio e colocados em estufa, nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido sucessivamente ao longo de 5 dias, e ao final, o conteúdo dos 16 tubos foi centrifugado a 8.000 rpm, 4° C por 10 minutos para separação da biomassa bacteriana. Aproximadamente 0,5 mL de biomassa obtida em cada tubo foi coberta com glicerol 50% esterilizado e estocada em congelador a – 15° C.

4.7 Preparo do inóculo misto

A biomassa de leveduras contida em 10 tubos estocados (aproximadamente 50 mL), como descrito no item 4.5, foi separada do glicerol e suspensa em 80 mL de água destilada esterilizada, de modo se obter uma concentração celular de aproximadamente 2×10^9 células/mL, determinada em câmara de Neubauer.

O inóculo bacteriano foi preparado baseado em Souza e Mutton (2004), como segue: a biomassa de bactérias contida em cinco frascos estocados (Item 4.6) foi suspensa em 20 mL de água destilada estéril, e ajustada a contagem em câmara de Helber (Hawksley, Inglaterra), de modo a se obter uma concentração celular de aproximadamente de 3×10^7 células/mL.

Para obtenção de 150 mL do inóculo misto misturou-se as suspensões de leveduras e bactérias em um mesmo frasco, agitou-se vigorosamente, e transferiu-se 30 mL para cada um de 5 frascos Erlenmeyer de 250 mL, onde foram aplicados os respectivos tratamentos.

4.8 Tratamentos antibacterianos

Nos inóculos mistos foram adicionados 600 mg/L de ácido sulfúrico para se obter pH ao redor de 2,5, e submetidos à agitação (150 rpm por 5 minutos) antes de se efetuarem os tratamentos específicos. Os produtos utilizados nesse trabalho foram escolhidos com base em dados de desempenho em outras áreas de aplicação e as dosagens dos diversos biocidas avaliados, os de referência, bem como o ácido

sulfúrico adicionado complementarmente, foram feitas de acordo com a literatura disponível e ensaios prévios em laboratório (Item 4.9), conforme Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Produtos utilizados nos tratamentos dos inóculos mistos e no mosto de melação, submetidos a fermentação.

Produto	Quantidade (ppm)	Material tratado	Bactéria inoculada	Referências
Ácido sulfúrico	600 1200, 1800	Inóculo	Ambas*	Gallo e Canhos (1991)
Huwa-San	100; 200; 1000	Inóculo	Ambas	Autor (2015)
Cloro oxigenado	50; 100	Inóculo	<i>Lactobacillus</i> ssp	Multiclor (2011)
Triclorocarbanilida	40 e 80	Inóculo	<i>L. fermentum</i>	Oliva-Neto et al., 2014
Cloreto benzalcônio	40	Mosto	<i>L. fermentum</i>	Oliva-Neto et al. (2014)
Clorexidina	50	Inóculo	<i>L. fermentum</i>	Cleghorn; Bowden (1989)
Betabio	30	Inóculo	<i>L. fermentum</i>	Rückle e Senn (2006)
Maitenina	30; 50	Inóculo	<i>L. fermentum</i>	Gullo et al. (2012)
Salinomicina	6; 10	Inóculo	Ambas	Ventura (2007)
Monensina	3; 5	Inóculo	Ambas	Stroppa et al. (2000)
EDTA	500; 1000	Mosto	<i>Lactobacillus</i> ssp	Ergun et al. (1997)
HEDTA	200; 1000	Mosto	<i>L. fermentum</i>	BASF, 1995

**L. fermentum* e *Lactobacillus* ssp.

As doses de ácido sulfúrico (600; 1200; 1800) correspondem a 1; 2 e 3 kg/m³ de leite de levedura industrial e consideradas respectivamente as concentrações mínima, média e máxima com relação ao efeito sobre a viabilidade da levedura.

Os inóculos tratados com o ácido e os biocidas, foram mantidos sob agitação a 150 rpm a 25° C por 1 hora, antes de inocularem o mosto, dando início as fermentações.

4.9 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San pelo método de microdiluição em placas

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do produto Huwa-San sobre a levedura PE-2 e bactéria láctica isolada de fermentação industrial foram obtidas utilizando-se o método de micro diluição em meio de cultura, adaptado do Clinical Laboratory Standard Institute (2012). Para *L. fermentum* foram realizadas fermentações em caldo MRS com crescentes concentrações do biocida.

4.9.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre *S. cerevisiae* e bactéria láctica

A solução padrão do antimicrobiano foi preparada na concentração de 1.000 µg/mL, e incorporada ao meio de cultura Agar Müller-Hinton (Difco, EUA), preparado conforme instruções do fabricante, acrescido de 0,1% de resazurina (azul

em pH>6,5 e rosa em pH<3,8), autoclavado e resfriado a 45° C. Alíquotas de 0,1 mL do meio foram distribuídas em cada um dos poços da placa de microcultivo (Biofil, China). Uma alíquota de 0,005 mL de cada suspensão de microrganismos contendo aproximadamente 5×10^5 UFC/mL foi inoculada no meio contido em cada um dos poços das placas as quais foram encubadas por 48 horas, em temperatura de 33° C para a levedura e 35° C para as bactérias. A análise do crescimento dos microrganismos foi feita visualmente, sendo que para levedura observou-se turvação do meio nas diferentes concentrações do biocida e, para as bactérias, foi observada a mudança de cor do corante resazurina de azul para rosa, onde havia liberação de ácido e diminuição do pH devido ao crescimento bacteriano.

4.9.2 Determinação da concentração inibitória mínimas do Huwa-San sobre *L. fermentum* pelo método de macrodiluição em tubos

Sete tubos de cultura contendo cada um 10 mL de meio MRS líquido, preparado conforme item 4.2.3, foram inoculados com suspensão de *L. fermentum*, preparada conforme item 4.6, contendo cerca de $3,5 \times 10^7$ cel/mL. Em três pares de tubos foram aplicados respectivamente 50; 100 e 200 ppm do biocida Huwa-San. Ao final de 8 horas de fermentação em estufa a 37°C foi dosado o ácido lático nos meios fermentados e comparado com a concentração no tubo controle.

4.10 Fermentações em bateladas com reciclo de células

As fermentações foram conduzidas pelo sistema de batelada simples em frascos agitados com reciclo de células, em condições operacionais padrão, de modo a reproduzir, tanto quanto possível, os processos industriais (CALAM, 1986; BISCHOFF et al., 2009; PEREIRA et al., 2012).

Em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL foi transferido 30 mL de inóculo misto tratado (Item 4.9) e, em seguida, adicionado 70 mL do mosto 22° Brix (Item 4.3.4). Os frascos foram vedados com espuma de silicone e transferidos para incubadora agitadora (MA-830/A - Marconi, Piracicaba) a 120 rpm e temperatura de 35° C, que é a média das temperaturas ótimas de fermentação da levedura (33° C) (ALDIGUIER et al., 2004) e das bactérias lácticas (37° C) (GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004), durante 6 horas.

Ao final de cada ciclo fermentativo, foram retiradas amostras das fermentações para contagens de leveduras e bactérias, e os meios foram

transferidos para frascos com tampa e centrifugados a 2.000 rpm a 15° C por 2 minutos. As biomassas microbianas separadas foram guardadas em refrigerador a 5° C para serem tratadas e iniciarem novo ciclo fermentativo no dia seguinte. Via de regra, cada experimento foi realizado em cinco ciclos fermentativos ao longo da semana, porém, devido a particularidades, alguns experimentos correram em ciclos mais curtos e outros, em ciclos de dez dias.

4.11 Viabilidade de *S. cerevisiae* em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico

Três bateladas de fermentações com mosto 22° Bx foram realizadas com inóculo de cultura pura de *S. cerevisiae*, tratados com ácido sulfúrico nas doses 0,6; 1,2 e 1,8% (m/v) durante cinco ciclos fermentativos. A partir do sexto ciclo, adicionou-se 800 mg/L de ácido láctico PA 90% (Acros Organics, USA) no mosto 22° Bx, 5 minutos antes de ser submetido às fermentações. E assim foram realizados mais cinco ciclos fermentativos, sendo analisada a viabilidade da levedura pelo método de microscopia com azul de metileno (Item 4.14.1) ao final de cada ciclo.

4.12 Teste de desfloculação celular

Uma amostra de creme de levedura coletado em fermentação industrial, contendo 34% (v/v) de biomassa úmida, $2,3 \times 10^8$ bact./mL, exibindo forte floculação, foi diluída em água destilada 1:1. Um volume de 300 mL dessa suspensão de células foi transferido equitativamente em três frascos Erlenmeyer. Uma das suspensões foi tratada com 200 ppm e outra com 1.000 ppm (v/v) de solução de EDTA 20% (m/v). Após 1 hora em agitação a temperatura ambiente, transferiu-se as suspensões para uma proveta graduada de 100 mL e deixou-se em repouso por 15 minutos, quando foi anotado o nível de decantação das células em relação ao volume total da proveta, para determinar o índice de floculação, dado pela diferença do volume decantado do volume total da suspensão na proveta. (Ex: 30 mL decantado – 100 mL total = floculação de 70%).

Em outro experimento, inóculos mistos recuperados de fermentação realizada conforme item 4.10, contendo $3,2 \times 10^8$ cel./mL de *L. fermentum* e $5,6 \times 10^8$ cel./mL de *S. cerevisiae* foram tratados com o produto Trilon D, a base de HEDTA 40%

(BASF, Alemanha) nas doses 200 e 1.000 ppm (v/v), conforme item 4.9. Ao final de 6 horas de fermentação foi determinado o índice de floculação nos meios.

4.13 Ensaios analíticos

4.13.1 Determinação do ART do mosto e melaços - As concentrações dos açúcares redutores totais (ART) do mosto 20°Brx e melaços foram determinadas pelo o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), cuja composição do reagente principal é dada a seguir:

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico1,0 g
- Tartarato de potássio 30,0 g
- Hidróxido de sódio 1,6 g
- Água destilada qsp 100 mL

As misturas de reação foram preparadas adicionando-se de 0,8 mL de amostra do mosto de melaço diluído em água destilada (25 vezes) e 0,2 mL de solução de ácido clorídrico 6 M, em tubos de cultura, os quais foram submersos parcialmente em banho-maria a 60°C durante 7 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de hidróxido de sódio 2,4 M. A reação colorimétrica ocorreu com a adição de 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico, seguido por aquecimento a 100 °C durante 5 minutos em banho de água fervente. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro visível Bioespectro SP-22 (Equipar, Curitiba) em comprimento de onda de 546 nm. Uma curva padrão foi obtida, a partir de solução padrão de sacarose 0,1% (m/v), de modo a correlacionar a concentração de açúcares e a absorbância dos hidrolisados, na faixa de 0,55% a 0,1% de ART. Os resultados foram expressos em % (m/v) de ART.

4.13.2 Dosagem de ácido láctico - Para a determinação da concentração de ácido láctico nos meios fermentados e mosto foi empregado aparelho biosensor de tecnologia enzimática Accutrend Plus (Roche, Alemanha) e respectivas tiras com enzima lactato-oxidase imobilizada (VENTURA, 2007). Amostras de 30 µL do sobrenadante do meio fermentado centrifugado (2.000 rpm por 2 min.) foram colocadas com micropipeta sobre a área da tira com a enzima. Após 60 fez-se a leitura da concentração em mM/L no aparelho. O cálculo da concentração de ácido

lático produzido foi feito pelo balanço de massa nos volumes das fermentações, descontando-se o ácido já contido no mosto pela fórmula:

$$QAL = QV_1 - QV_2, \text{ onde:}$$

QV_1 = teor ácido lático no vinho no tempo zero (t_0) de fermentação (mg/L)

QV_2 = teor ácido lático no vinho no tempo seis (t_6) de fermentação (mg/L)

4.13.3 Medidas de pH – O pH dos meios fermentados tratados foi determinado com o pHmetro digital modelo K 39 (Kasvi, China).

4.13.4 Dosagem de etanol - concentração do etanol nos meios fermentados foi determinada em cromatógrafo a gás CG mod. 37 (CG Instrumentos Científicos, São Paulo), operando com detector de ionização de chama e processador acoplado. (MORAIS, 2013). Procedimento: o equipamento foi ligado conforme instruções do fabricante e calibrado com soluções padrão de etanol 0,2% e 1% (v/v). Amostras do sobrenadante obtido nos meios centrifugados (item 4.10) foram centrifugadas novamente a 5.000 rpm por 3 minutos e diluídas 10 vezes em água destilada. Utilizando-se micro seringa foram injetados 4 μ L dessa solução no cromatógrafo. A concentração de etanol expressa em % (v/v). Nos ensaios nos quais foram calculados o rendimento fermentativo (η), o resultado foi multiplicado pela densidade do etanol (0,789).

4.14 Ensaio microbiológicos

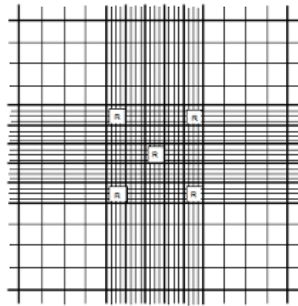
4.14.1 Viabilidade celular e contagem de leveduras - Retirou-se uma amostra de 10 μ L dos meios fermentados, a qual foi diluída em 90 μ L de água destilada e corada com solução azul de metileno, na proporção 1:1 (v/v), segundo Lee et al. (1981). Preparo da solução de azul de metileno:

- Glicose	5,0 g
- KCl	0,21 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,24 g
- NaHCO_3	0,10 g
- NaCl	4,50 g
- Azul de metileno	0,125 g
- Água destilada qsp	500 mL

Da suspensão de células corada foi retirada uma alíquota suficiente para preencher a câmara de Neubauer recoberta com lamínula e contados os campos anotados na Figura 7, ao microscópio ótico (Carl Zeiss, Alemanha) em objetiva 40 X. As células coradas em azul são consideradas mortas, enquanto que as incolores, vivas. A viabilidade é dada pela relação:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células totais}} \times 100$$

Figura 7 - Esquema dos quadrados de uma câmara de Neubauer, com destaque par os quadrículos utilizados nas contagens.



A população de leveduras foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ Células/mL} = \frac{\text{Total de células vivas} \times 4}{\text{Total de retículos contados}} \times \text{dil.} \times 10^4$$

4.14.2 Cultivo de leveduras - Amostras dos meios fermentados foram cultivadas em superfície de meio YPD em placas de Petri para promover o crescimento e verificar o aspecto das colônias e o estado morfológico das células após os respectivos tratamentos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

4.14.3 Contagem de bactérias em câmara de Helber - O ajuste da população de bactérias nos inóculos mistos foi feito com câmara de Helber (Figura 8), a qual consiste em uma lâmina de vidro dotada de 400 quadrados com 0,0025 mm² de área e profundidade 0,02 mm, e volume 5 x 10⁻⁸ mL em cada quadrado. Procedimento de contagem: Uma amostra da suspensão de células é corada com azul de metileno e introduzida na câmara de modo a preencher uniformemente o

poço. São contadas as células de 50 quadrados aleatórios. O cálculo da quantidade de bactérias por mililitro é dado pelo número total de célula contadas, dividido pelo número de quadrados contados e multiplicado por 2×10^7 .

Figura 8 - Câmara para contagem de bactérias de Helber.

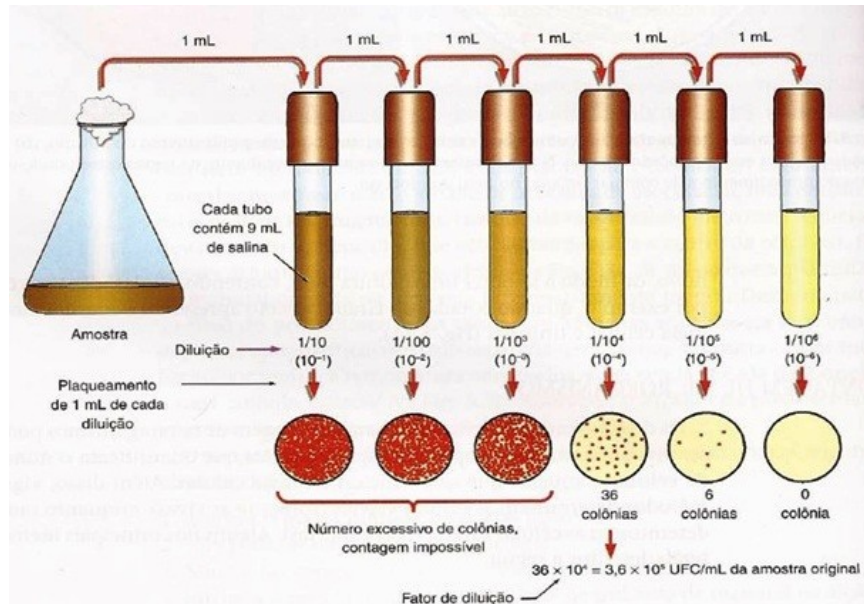


Fonte: Hawksley Co.

4.14.4 Contagem de bactérias viáveis - A quantificação de bactérias nas fermentações foi feita pelo método de diluição em série e plaqueamento em profundidade, cujos princípios são descritos por Seeley Jr; Van-Demark e Lee (1984), e executado em condições estéreis, em câmara de fluxo laminar, conforme procedimento a seguir.

De cada meio fermentado foi coletada uma alíquota de 0,1 mL de amostra e diluída em 0,9 mL de água destilada estéril contida em frasco Ependorf, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Após agitação vigorosa em vortex, foi retirada uma amostra de 0,1 mL desse frasco e transferido para outro contendo 0,9 mL de água, e assim sucessivamente até se obter a diluição desejada (Figura 8). De cada diluição foram transferidas duas alíquotas de 0,1 mL para duas placas de Petri descartáveis, nas quais foi vertido cerca de 20 mL do meio MRS-Ágar com actidiona, preparado conforme item 4.2.2, ainda fundido. As placas foram cuidadosamente agitadas sobre a bancada de modo a promover a homogeneização das bactérias até a solidificação dos meios.

Figura 9 - Esquema do procedimento de diluições em série e cultivo de bactérias

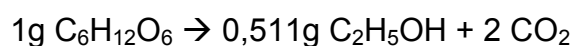


Fonte: Madigan; Martinko; Parker, 2004

As placas foram incubadas a 37° C por 48 horas e, após esse período, foram contadas as colônias crescidas em cada placa. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi dado pelo número médio de colônias de duas placas de mesma diluição, multiplicado pelo inverso da respectiva diluição.

4.14.5 Determinação de biomassa úmida - Após a centrifugação dos meios fermentados e o sobrenadante recolhido (Item 4.9), os frascos de centrífugas, previamente tarados, foram pesados em balança de precisão (Shimadzu, Japão). A massa celular crescida em cada ciclo foi calculada pela diferença de massa da fermentação anterior (g).

4.15 Cálculo do rendimento - O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria teórica da fermentação alcoólica:



E dado pela relação:

$$\eta = \frac{\text{Etanol produzido (g)}}{\text{ART no meio (g)}} \times 100 \text{ (expresso em \%)}$$

4.16 Análises estatísticas - Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se teste t-Student e ANOVA seguido do teste pos-hoc HSD Tukey considerando um nível de significância de 5%. Quando o valor p ou p-valor foi inferior a 0,05, o teste foi considerado estatisticamente significativo. O software utilizado foi o Microsoft Excel© (DEVORE, 2014).

Resultados e Discussão

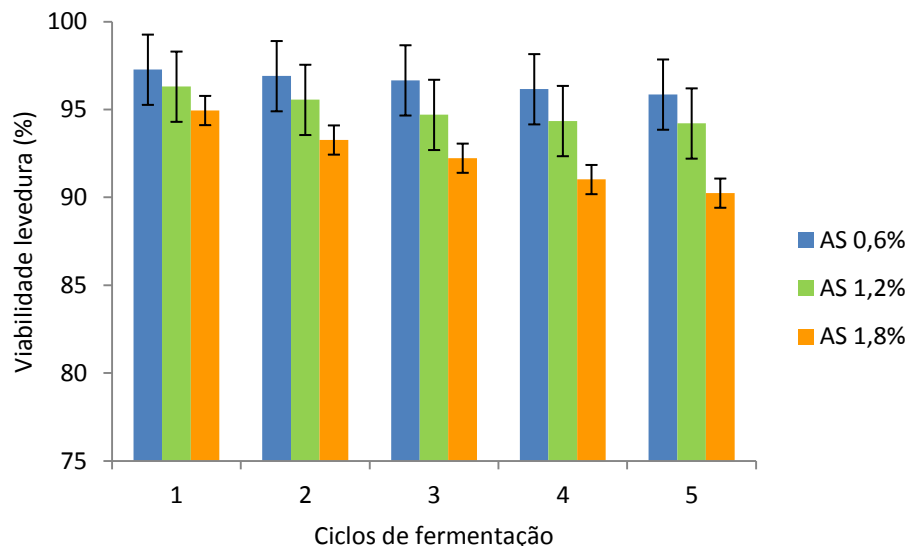
5 Resultados e discussão

Os dados obtidos nos experimentos realizados ao longo desse trabalho são apresentados e discutidos a seguir.

5.1 Variação na viabilidade de *S. cerevisiae* em fermentação na presença dos ácidos sulfúrico e láctico em diferentes concentrações

Vários trabalhos apresentam resultados divergentes sobre os efeitos do ácido láctico e do ácido sulfúrico sobre a levedura em fermentação alcoólica (OLIVEIRA, 2008; DORTA et al., 2006; BAYROCK; INGLEDEW, 2004; ESSIA-NGANG; LETOURNEAU; VILLA, 1989). Assim, nesse ensaio foi verificada a viabilidade da levedura após fermentações de mosto de melação diluído com diferentes concentrações de ácido sulfúrico e ácido láctico. Os resultados podem ser comparados nas Figuras 10 e 11, a seguir:

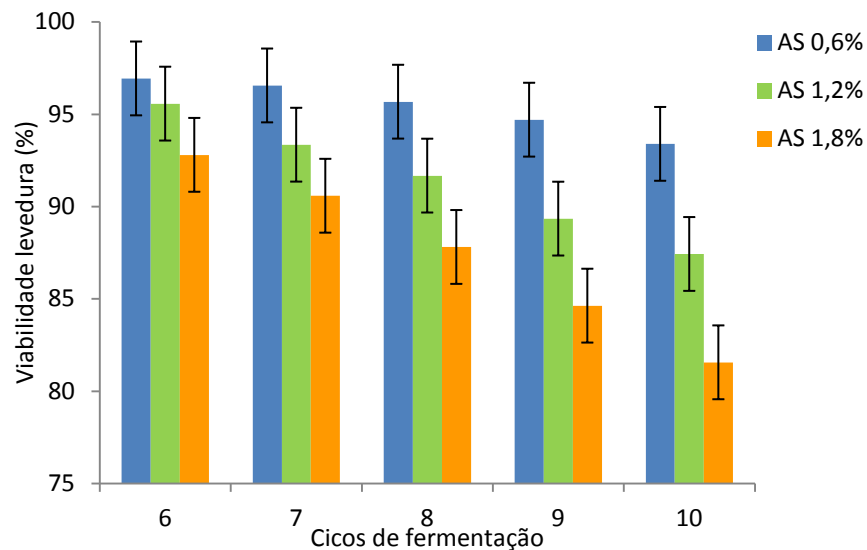
Figura 10 – Efeito do tratamento da levedura com 0,6%; 1,2% e 1,8% (m/v) de ácido sulfúrico (AS) sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melação (22° Bx; 405 mg/L de ácido láctico) a 35° C, por 5 ciclos.



A viabilidade inicial, ao redor de 97%, manteve-se ao longo dos cinco ciclos de fermentação nas fermentações cujos inóculos foram tratados com 0,6% de ácido sulfúrico, mesmo com a concentração de ácido láctico do mosto (405 mg/L), proveniente do melação industrial. Uma queda um pouco mais acentuada na

viabilidade foi verificada nas fermentações tratadas com a dose mais elevada do ácido sulfúrico (1,8%). Nos ciclos fermentativos seguintes, adicionou-se 800 mg/L de ácido láctico no mosto e os resultados encontram-se na Figura 11.

Figura 11 – Efeito do tratamento com ácido sulfúrico nas doses 0,6%, 1,2% e 1,8% (m/v) sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* PE-2 após 6 horas de fermentação em mosto de melão (22° Bx; 1.205 mg/L de ácido láctico) a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos.



Nas fermentações nas quais foram adicionados 800 mg/L de ácido láctico ao mosto, promovendo concentração final de 1.205 mg/L, nota-se uma expressiva queda na viabilidade ao longo dos ciclos fermentativos. Esse resultado mostra coerência com os dados obtidos por Narendranath; Thomas; Ingledew, (2001) em meios sintéticos, embora a queda na viabilidade da levedura aqui verificada tenha ocorrido em concentrações mais baixas de ácido láctico. Isso provavelmente se deve à substâncias tóxicas presentes no melão industrial, conforme descrito e Liu et al. (2008), as quais atuam de modo sinérgico sobre a inibição levedura em fermentação.

Portanto, os resultados reforçam que uso do ácido sulfúrico no processo de fermentação alcoólica não deve ser indiscriminado, mas baseado em um rigoroso acompanhamento de parâmetros do processo (OLIVA-NETO et al., 2012).

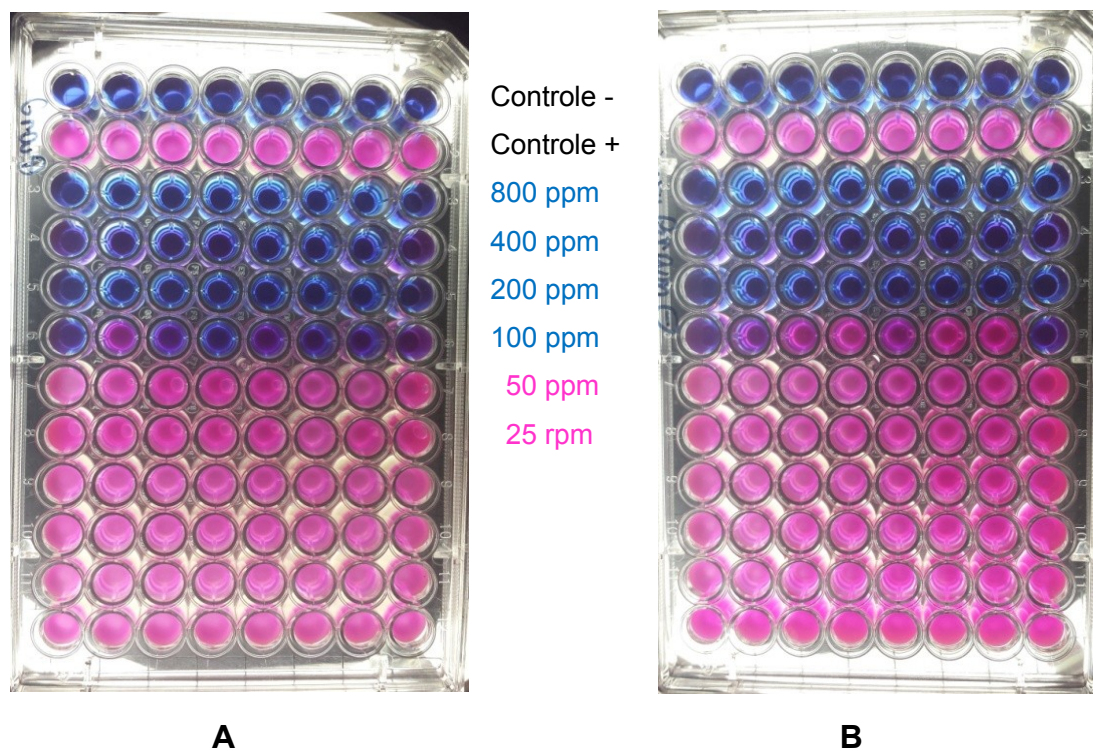
5.2 Avaliação da atividade biocida do Huwa-San sobre microbiota de fermentação etanólica

A formulação peróxido de hidrogênio-ureia mostrou eficácia no controle de bactérias lácticas isoladas de fermentação de mosto de milho (NARENDRANATH; THOMAS; INGLDEW, 2000). Desse modo, o biocida Huwa-San, formulado com peróxido de hidrogênio e prata coloidal, teve seu potencial avaliado na descontaminação de fermentação etanólica nesse estudo.

5.2.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas do Huwa-San sobre levedura PE-2 e bactérias lácticas

Devido à falta de informações específicas do Huwa-San para aplicação em fermentação, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) sobre bactérias lácticas e levedura foram previamente determinadas *in vitro*, a fim de se estabelecer doses referenciais a serem aplicadas nos ensaios posteriores. Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima para bactérias lácticas são exibidos na Figura 12, e o teste para *S. cerevisiae* PE-2 estão ilustrados na Figura 13.

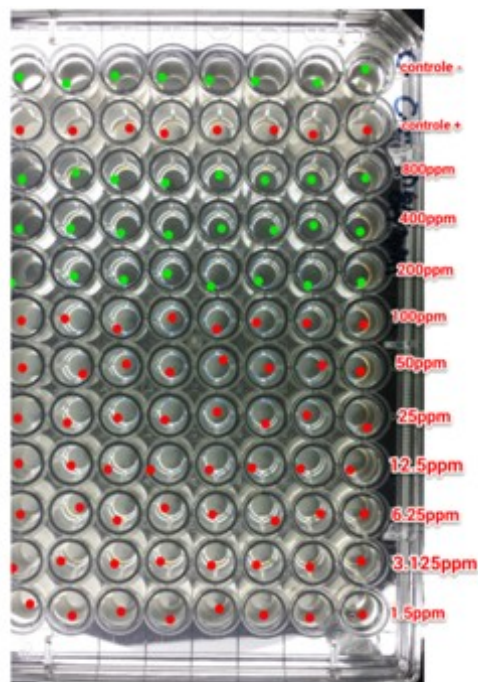
Figura 12 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton inoculado com *L. fermentum* (A) e bactéria láctica isoladas de fermentação alcoólica industrial (B) contendo corante resazurina.



Nos poços em azul, não houve liberação de ácido, indicando inibição das bactérias. Nos poços onde houve crescimento bacteriano, e liberação de ácido, ocorreu a mudança de cor para rosa. Assim, pode-se verificar inibição do crescimento das bactérias a partir dos poços nos quais foram aplicados **100 ppm** do Huwa-San (de coloração azul), sendo esta dosagem determinada como a concentração mínima para a inibição desses microrganismos.

A Figura 13 mostra a placa após 24 horas com turvação nos poços onde houve crescimento da levedura e, portanto, não houve inibição pelo Huwa-San. Para facilitar a visualização, os poços com crescimento da levedura foram marcados com tinta vermelha e os poços sem turvação, onde a levedura não cresceu, foram marcados em verde.

Figura 13 - Placas com diluições em série do produto Huwa-San em caldo Mueller Hinton, inoculado com levedura *S. cerevisiae* PE-2.



Nos poços contendo até 100 ppm do Huwa-San (marcados em vermelho) houve turvação do meio, indicando crescimento da levedura, enquanto que nos poços contendo de 200 a 800 ppm não foi percebida turvação, portanto, o microrganismo foi inibido. Portanto, nesse ensaio, o biocida Huwa-San mostrou ação fungicida sobre a levedura PE-2 na concentração mínima de **200 ppm**.

Em complemento aos ensaios do item 5.2.1, foi verificada a concentração inibitória mínima do Huwa-San frente à bactéria *L. fermentum*, nas fermentações em meio em meio MRS, com diversas concentrações do produto (Tabela 4).

Tabela 4 - Produção de ácido láctico em caldo MRS inoculado com *L. fermentum* ($3,5 \times 10^7$ bact./mL) com diferentes concentrações do biocida Huwa-San.após 6 horas de fermentação a 37°C.

Tratamentos	Prod. ac. láctico (mg/L)*	Diminuição do ácido láctico (%)
Controle t ₀	192	-
Controle t ₆	774 ± 3	0
HS 100 ppm	450 ± 7	41,86
HS 200 ppm	405 ± 9	47,67
HS 300 ppm	378 ± 12	51,16

*Médias de duplicatas

Após 6 horas de fermentação a produção de ácido láctico aumentou 31,74% na fermentação sem qualquer tratamento (Controle). Comparando-se a produção do ácido láctico nos meios tratados com Huwa-San em relação ao controle, pode-se concluir que o biocida teve efeito bactericida moderado sobre *L. fermentum*.

5.2.2 Efeito de tratamentos com Huwa-San sobre viabilidade de levedura PE-2 em fermentação

Com base nas concentrações inibitórias mínimas obtidas no ensaio anterior, o biocida Huwa-San (200; 500; 1.000 ppm) foi aplicado nos inóculos submentidos a fermentações a 33°C, considerada a temperatura ideal (ALDIGUIER et al., 2004), bem como a 37°C, temperatura normalmente encontrada na indústria (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Ao final das fermentações, foi verificada a viabilidade da levedura, comparativamente ao tratamento com ácido sulfúrico (600 ppm).

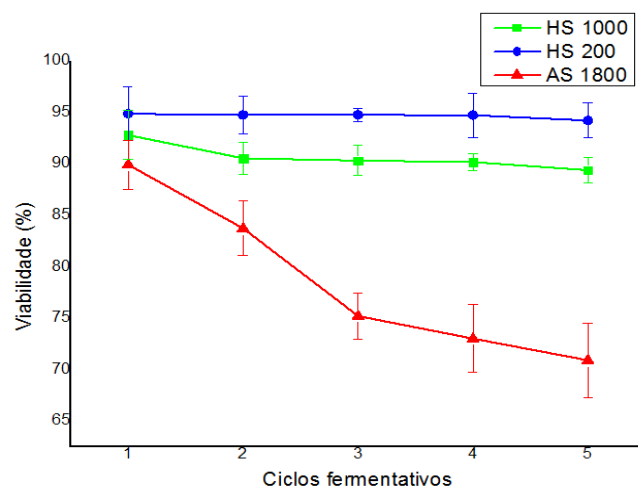
Tabela 5: Viabilidade (%) de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 tratada com produto Huwa-San e ácido sulfúrico após 6 horas de fermentação em diferentes temperaturas.

Tratamento	Dose (ppm)	Viabilidade (%)	
		33° C	37° C
Huwa-San	200	96,82	93,31
Huwa-San	500	95,28	91,21
Huwa-San	1.000	93,14	90,27
H ₂ SO ₄	600	92,73	89,30
Controle	0	97,72	94,35

O tratamento com produto Huwa-San, desde a concentração inibitória mínima (200 ppm) até a dose 5 vezes maior (1.000 ppm), teve pouca interferência na viabilidade da levedura ao longo dos cinco ciclos fermentativos. Por outro lado, o ácido sulfúrico, aplicado na dose mínima (600 ppm), teve efeito um pouco mais pronunciado na viabilidade que o Huwa-San, embora ainda acima da viabilidade mínima recomendada de 85% (LALUCE et al., 2009).

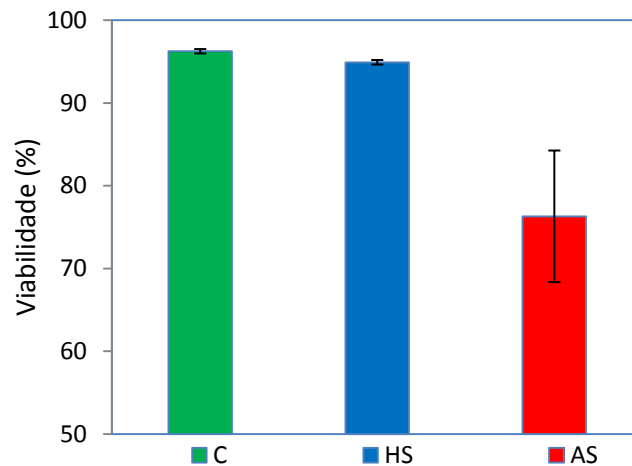
A partir desses dados, foram realizadas fermentações em ciclos, utilizando-se as dosagens extremas do Huwa-San, comparativamente com à concentração máxima de ácido sulfúrico.

Figura 14 - Viabilidade de levedura PE-2 após 6 horas de fermentações em mosto de melão 22° Brix a 35° C, ao longo de 5 ciclos fermentativos, tratadas com: Huwa-San (HS) 200 e 1000 ppm; e ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm.



Nas condições estabelecidas nesse experimento, a viabilidade da levedura PE-2 foi pouco afetada pelos tratamentos com Huwa-San, tanto na concentração inibitória mínima (200 ppm) como na dose de 1.000 ppm. A resistência da levedura ao estresse oxidativo se deve à indução de proteínas antioxidantes, como a catalase e a superóxido desmutase (Ng et al., 2008). Por outro lado, nas fermentações tratadas com 1.800 ppm de ácido sulfúrico, a viabilidade caiu abaixo de 85%, considerado o mínimo recomendável (LALUCE et al., 2009), a partir do segundo ciclo. As viabilidades médias da levedura ao longo dos cinco ciclos fermentativos são mostradas na Figura 15.

Figura 15 - Viabilidades médias de levedura PE-2 em 5 ciclos fermentativos de 6 horas em mosto de melaço 22° Brix a 35° C, submetida aos tratamentos: Huwa-San (HS) 200 ppm; ácido sulfúrico (AS) 1.800 ppm, e controle (C) sem tratamento.

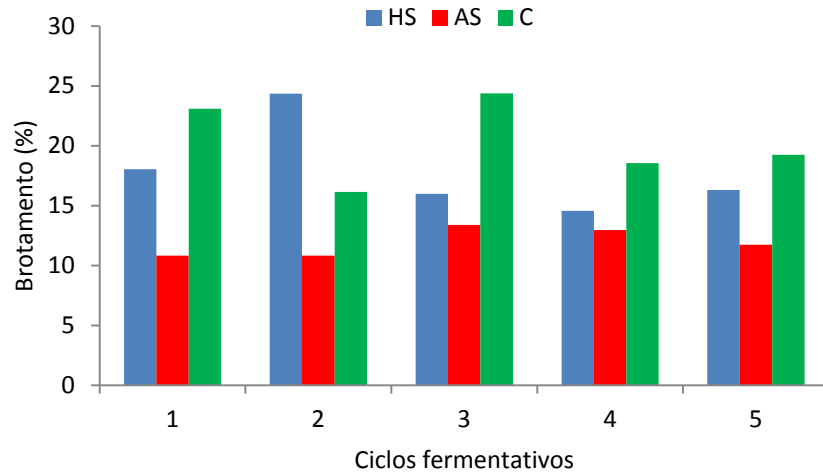


Com base nos resultados obtidos nesse experimento, pode-se estimar o efeito da recomposição da viabilidade da levedura sobre o rendimento e processo industrial, como segue: escalonando-se o volume da fermentação para 1.000m³, teríamos 100 mil L de levedo (massa úmida - 10% - v/v), ou, aproximadamente 33.000 kg de massa seca (33% m/v). Sendo 20 pontos percentuais a diferença de viabilidade do levedo tratado com ácido sulfúrico e o nível ideal (90%), a quantidade de células mortas seria 6.600 kg (massa seca). Considerando-se que são necessários 3 kg de ART para produzir 1 kg massa seca de levedura (MORAIS, 2013), durante três ciclos de brotamento à taxa média aproximada de 10% (Figura 15), a quantidade de açúcares para recompor as células de levedura ao nível do controle seria de quase 20 mil kg, a qual poderia ainda ser convertida em aproximadamente 11.500 litros de etanol anidro, somente em um reator, ou mais de 57 mil litros ao longo de cinco ciclos fermentativos.

5.2.3 Efeito do produto Huwa-San sobre brotamento de levedura PE-2

Com dados colhidos nas mesmas fermentações em ciclos exibidos na Figura 14, foi verificado o efeito dos respectivos tratamentos sobre o brotamento da levedura PE-2, mostrados na Figura 16, a seguir:

Figura 16 - Brotamento de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo de 5 ciclos sucessivos de fermentação tratadas com 1000 ppm de Huwa-San (HS) e 1.800 ppm de ácido sulfúrico (AS), e controle, sem tratamento (C).

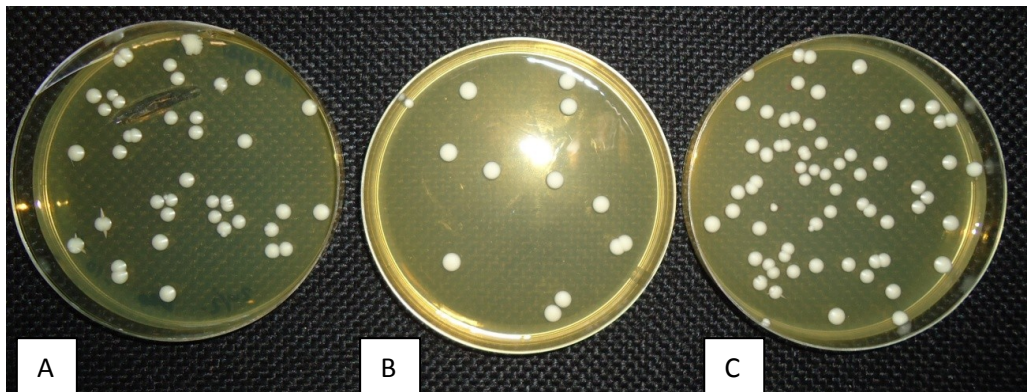


O brotamento da levedura tratada com Huwa-San, ficou, na média, em torno de 5 pontos percentuais abaixo do controle, indicando inibição parcial do produto. Mesmo assim, o brotamento nas fermentações tratadas com o biocida foi superior em mais de 6 pontos percentuais ao verificado nos meios com 1.800 ppm de ácido sulfúrico, onde o brotamento não foi suficiente para repor as células mortas. A manutenção da viabilidade nas fermentações com Huwa-San provavelmente foi devida à reação do peróxido de hidrogênio com a matéria orgânica do meio, liberando O_2 , o qual favoreceu o metabolismo aeróbio da levedura.

5.2.4 Efeito do produto Huwa-San sobre cultivo de levedura PE-2

Diversos estados fisiológicos de levedura têm sido descritos durante períodos de privação de nutrientes ou exposição a condições de estresses ambientais (SALMA et al., 2013), os quais podem interferir no crescimento do microrganismo. No intuito de verificar possíveis alterações no crescimento das células de leveduras tratadas com o biocida Huwa-San (item 5.4.1.), foi realizado cultivo das células em meio YPD, ao final do quinto ciclo de fermentação (Figura 17).

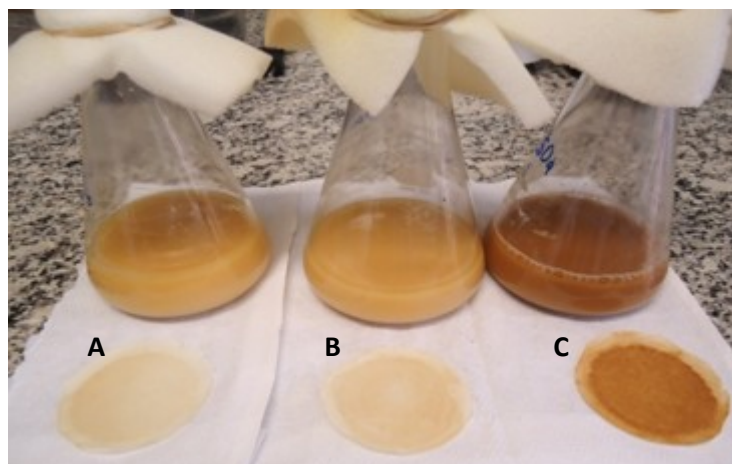
Figura 17 - Crescimento de levedura PE-2 em meio YPD, após 48 horas a 33° C. Placa A inoculada com amostra de fermentação tratada com 1.000 ppm de Huwa-San; a placa B tratada com 1.800 ppm de ácido sulfúrico; e a placa C sem tratamento.



Pelos crescimentos apresentados pelas leveduras após os diferentes tratamentos (A= $6,4 \times 10^7$ cel./mL; B= $1,3 \times 10^7$ cel./mL; C= $4,2 \times 10^8$ cel./mL), observa-se que a técnica de cultivo corrobora os resultados obtidos nos ensaios feitos por microscopia, mostrando a maior inibição do ácido sulfúrico. Contudo, o crescimento nas placas foi inferior ao registrado nas contagens feitas em câmara de Neubauer (A= contendo $4,2 \times 10^8$ cel./mL; B= $8,3 \times 10^7$ cel./mL; C= contendo $7,6 \times 10^8$ cel./mL).

Outro fator que pode ser observado nesses experimentos foi a coloração dos meios ao longo dos tratamentos, que se apresentou mais clara nos meios tratados com Huwa-San, em comparação com os tratados com ácido sulfúrico, como pode se observar pela Figura 18, a seguir.

Figura 18 - Coloração de vinhos de melão após cinco ciclos de fermentação, cujos inóculos foram tratados com H_2SO_4 600 ppm (C); Huwa-San 200 ppm (B) e controle (A).



O efeito de clareamento do inóculo tratado com Huwa-San se deve à ação branqueadora do peróxido de hidrogênio, utilizado em vários processos industriais para esse fim (SANDERSON, 2000). Esse clareamento obtido nos meios pode ser interessante nas destilarias que extraem o excedente de levedura para produção de ração animal, pois o produto final mais claro tem maior valor agregado. Além disso, a reação do peróxido com a matéria orgânica do meio pode anular o efeito inibidor dessas substâncias sobre outros biocidas, como verificado por Barth et al. (2014).

5.2.5 Efeito do tratamento dos inóculos mistos com Huwa-San sobre levedura PE-2 e *L. fermentum* em fermentação

Com base na concentração inibitória mínima (CIM) do Huwa-San sobre as bactérias lácticas, foi feito teste preliminar com 200 ppm do produto em condições de fermentação contaminada, cujos resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx a 35°C, inoculadas com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* após 6 h, com inóculos tratados com Huwa-San 200 ppm e ácido sulfúrico 600 ppm.

Tratamento	Dose (ppm)	pH final	Ácido láctico* (mg/L)	Viabilidade levedura (%)	Brotamento levedura (%)
Huwa-San	200	4,5	1.148 ± 6	90,54	7,76
H ₂ SO ₄	1.200	3,8	1.008 ± 4	89,32	5,96
Controle	–	4,7	1.224	93,03	6,75

*Médias de duplicatas

Mesmo com os ácidos orgânicos liberados no meio pelas bactérias, a viabilidade e o brotamento da levedura foram preservados pelo tratamento com Huwa-San, enquanto que nas fermentações tratadas com a menor dose do ácido sulfúrico observou-se uma diminuição mais acentuada na viabilidade da levedura, embora ainda acima do nível mínimo recomendado de 85% (LALUCE et al., 2009).

O produto Huwa-San causou pouco efeito sobre a atividade da bactéria mesmo com o dobro da concentração inibitória mínima, determinada pelo teste de micro diluição, como pode ser verificado pelas produções de ácido láctico nas fermentações, ao contrário do que foi reportado por Chang, Kim e Shin (1997) sobre o efeito do peróxido de hidrogênio sobre *L. fermentum*. Efeito similar foi observado na fermentação tratada com ácido sulfúrico, onde a produção de ácido láctico ficou

aproximadamente 12% abaixo, mas ainda em valores muito próximos ao controle, evidenciando fraco efeito biocida.

Baseado nesses resultados, foi corrido mais um ciclo fermentativo (Tabela 7) com 500 ppm do produto Huwa-San e 1.200 ppm ácido sulfúrico no tratamento do inóculo misto recuperado.

Tabela 7 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx a 35°C, inoculadas com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (500 ppm) e ácido sulfúrico (1.200 ppm).

Tratam.	pH	Ác. láctico (mg/L)	Etanol (% m/v)	Rendimento (%)	Viabilidade levedura (%)
Huwa San	4,3	1.012 ± 8	7,45	90,45	98,72
H ₂ SO ₄	3,2	1.765 ± 5	7,37	89,47	64,56
Controle	4,9	1.737	5,82	82,80	98,16

*Médias de duplicatas

No segundo ciclo de fermentação a produção de ácido láctico aumentou significativamente no controle, devido à atividade das bactérias. O aumento da dose do Huwa-San evitou o aumento da produção de ácido láctico e promoveu maior rendimento em relação ao controle e ao tratamento com ácido sulfúrico. Contudo, a concentração de ácido láctico não diminuiu de modo significativo em relação ao ciclo anterior, mostrando atividade apenas bacteriostática do produto.

A viabilidade da levedura aumentou nas fermentações tratadas com Huwa-San, ao contrário do verificado com o tratamento ácido, que levou à queda de rendimento. Mesmo com maior concentração de ácido láctico, a viabilidade no Controle, também aumentou, comprovando os dados do experimento 5.1.

Foi realizado um terceiro ciclo fermentativo, aumentando-se a dose do Huwa-San para 1.000 ppm e do ácido sulfúrico para 1.800 ppm (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx a 35°C, inoculadas com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* após 6 h, com inóculos mistos tratados com Huwa-San (1.000 ppm) e ácido sulfúrico (1.800 ppm).

Tratamentos	pH	Ácido láctico (mg/L)*	Etanol % (m/v)	Rendimento (%)	Viabilidade levedura (%)
Huwa San	4,2	989 ± 11	6,27	76,12	97,30
H ₂ SO ₄	3,2	1674 ± 6	6,12	73,11	61,14
Controle	4,8	1503	6,05	73,45	97,12

*Médias de duplicatas

Na dose de 1.000 ppm, o tratamento com Huwa-San manteve a produção de ácido no mesmo nível ao observado na dose 500 ppm, comprovando seu efeito bacteriostático. Contudo, o Huwa-San exibiu eficácia muito inferior a produto similar peróxido de hidrogênio-ureia, testado por Narendranath; Thomas e Igledeu (2000), o qual conseguiu interromper completamente a produção de ácido láctico em 48 horas de fermentação. Uma observação feita pelos autores é a perda de eficiência do peróxido de hidrogênio em mostos de milho com alta concentração de sólidos, o que de modo semelhante, pode ter ocorrido com o produto aqui avaliado, frente aos componentes secundários do melaço. Por outro lado, nessa concentração observou-se inibição da atividade da levedura, que, mesmo mantendo a alta viabilidade, teve o metabolismo do etanol reprimido, com queda acentuada no rendimento fermentativo, o que também verificado com a alta dose do ácido sulfúrico.

Outra hipótese para a baixa eficiência bactericida do Huwa-San pode estar na eliminação de O_2^- por manganês, que atuou como substituto funcional da superóxido dismutase em *Lactobacillus plantarum* cultivado em meios ricos nesse metal (FRIDOVICH, 1998), como é o caso de melaço.

Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a ação bactericida do produto Huwa-San foi limitada pelas características do substrato utilizado. Sendo assim, sua aplicação seria mais indicada à clarificação dos mostos de melaço, uma vez que sua ação oxidante promove a descoloração e aumenta a viabilidade da levedura, bem como atuar como coadjuvante de outros tratamentos de fermentação em destilarias de etanol com aproveitamento de levedura para alimentação animal.

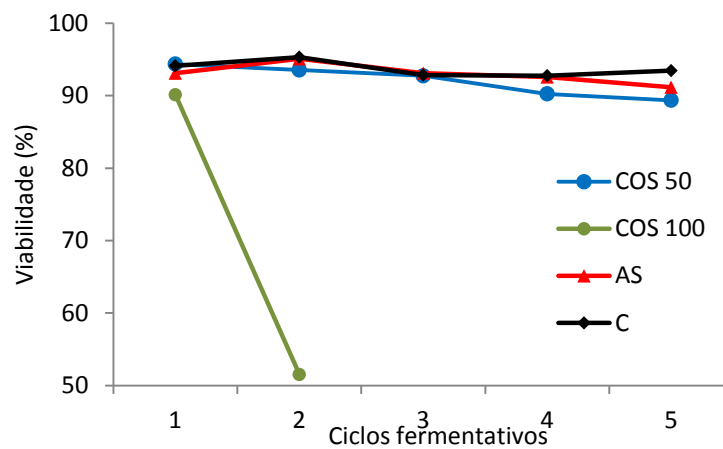
5.3 Efeito do cloro oxigenado (COS) sobre levedura e bactéria láctica em fermentação

O dióxido de cloro tem sido empregado em fermentações de etanol que destinam excedente de levedura para ração animal, onde os antibióticos sofrem restrições (NARENDRANATH; BREY, 2009; OLIVA-NETO et al., 2013).

O cloro oxigenado reúne características de desinfecção e oxidação de efeito sinérgico, uma vez que o poder de oxidação do O_2 é quarenta vezes maior e mais rápido que o ácido hipocloroso - HOCl (MULTICLOR, 2011).

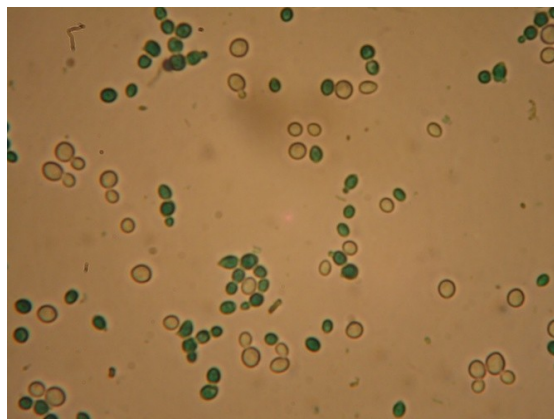
Tendo como base as concentrações do dióxido de cloro avaliado por Meneghin et al. (2008), foram feitos tratamentos nos inóculos mistos com o produto comercial cloro oxigenado solúvel (COS) (MULTICLOR, 2011), em comparação ao ácido sulfúrico. Os resultados obtidos após as fermentações durante cinco ciclos fermentativos consecutivos são mostrados a seguir.

Figura 19 - Viabilidade da levedura PE-2 em fermentações contaminadas, tratadas com cloro oxigenado (COS 50 e 100 ppm) e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos.



A concentração 100 ppm de cloro oxigenado solúvel teve efeito drástico sobre a viabilidade da levedura (Figura 20), que atingiu níveis críticos, ao redor de 50%, já no segundo ciclo fermentativo, interrompendo a fermentação.

Figura 20 - Leveduras PE-2 (400 x) após fermentação contaminada com bactéria láctica, com inóculo tratado com 100 ppm de cloro oxigenado. As células claras são viáveis e as coradas em azul estão mortas.

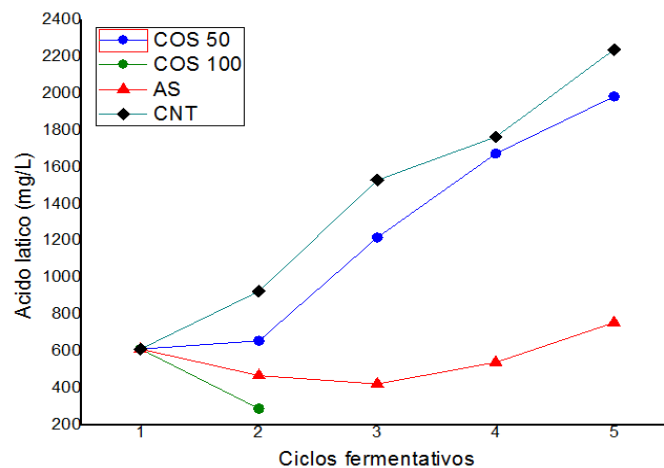


Os resultados obtidos no presente ensaio mostram coerência com os obtidos no trabalho de Meneghin et al. (2008), no qual o dióxido de cloro, na concentração de 100 ppm, inibiu totalmente a viabilidade de linhagens industriais de *S. cerevisiae*.

Além da alta taxa de mortalidade das leveduras na fermentação tratada com 100 ppm do cloro oxigenado, durante as análises microscópicas foram observadas alterações na morfologia das células ainda vivas, as quais apresentavam o material intracelular mais granuloso do que o normal. Efeitos similares foram verificados por Zhu; Chen e Yu (2013), que registraram detalhadamente os sérios danos causados nas organelas citoplasmáticas de *S. cerevisiae*, ao avaliar os efeitos fungicidas do dióxido de cloro sobre a levedura.

O efeito dos tratamentos com o cloro oxigenado sobre a microbiota bacteriana pode ser analisado pela formação de ácido lático ao longo dos cinco ciclos fermentativos (Figura 21).

Figura 21 - Produção de ácido lático relativo à atividade bacteriana em fermentações tratadas com cloro oxigenado (COS) nas concentrações 50 e 100 ppm, e ácido sulfúrico (1.200 ppm) ao longo de 5 ciclos.



Na fermentação tratada com 50 ppm do cloro oxigenado solúvel houve uma produção de ácido lático similar à tratada com ácido sulfúrico até o segundo ciclo, mas, a partir do ciclo seguinte, ficou próxima ao controle, o que indica pouca inibição das bactérias. A fermentação tratada com 100 ppm do COS foi interrompida no segundo ciclo devido morte das leveduras (Figura 19).

Desse modo, foram feitos tratamentos combinando-se o cloro oxigenado e o ácido sulfúrico, a fim de se verificar o efeito sinérgico entre os produtos. Os resultados de vários parâmetros das fermentações são exibidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentações de mosto de melaço 22º Bx, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico 1.800 ppm.

Tratamentos	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Células/mL ($\times 10^8$)	Ac. láctico (mg/L)	Etanol (g/L)
T1	91,64	13,78	1,52	648	6,74
T2	91,11	13,25	1,28	819	5,54
H ₂ SO ₄	87,52	27,95	1,14	918	6,53
Controle	90,38	17,24	1,21	2565	5,60

T1: Inóculo: 300 ppm H₂SO₄ + 50 ppm COS no mosto:

T2: Inóculo: 70 ppm COS e mosto: 200 ppm HS

A combinação de tratamentos T1 mostrou-se superior ao T2 e ao ácido sulfúrico, tanto quanto à inibição da produção de ácido láctico, quanto à produção de etanol. A viabilidade, brotamento e população de leveduras ficaram nos mesmos níveis do tratamento T1 e superiores ao tratamento com ácido sulfúrico. Assim, foi dada sequência a mais um ciclo fermentativo (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros do 2º ciclo de fermentações de mosto de melaço industrial, tratadas com diferentes antimicrobianos e ácido sulfúrico (1.800 ppm).

Tratamentos	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Células/mL ($\times 10^8$)	Ac. láctico (mg/L)	Etanol (g/L)
T1	87,89	11,52	1,75	414	6,79
T2	88,30	15,98	1,80	477	6,04
H ₂ SO ₄	85,29	13,51	1,41	450	6,55
Controle	88,13	14,18	1,58	2520	5,25

T1: 50 ppm de COS + 1000 ppm de H₂SO₄ no inóculo e 200 ppm de HS no mosto

T2: 70 ppm COS no inóculo e 200 ppm de HS no mosto

Os tratamentos com as combinações T1, T2 e com ácido sulfúrico, ficaram praticamente no mesmo nível de produção de ácido láctico, e cerca de 80% abaixo do controle, mostrando eficácia na inibição bacteriana, sem comprometer a viabilidade da levedura. Contudo, nas análises ao microscópio foram novamente observadas alterações na morfologia das leveduras tratadas com as combinações do COS. As células apresentavam-se menores, com citoplasma mais granulado e a parede mais fina, conforme relatado por Zhu; Chen; Yu (2013).

Além disso, a estocagem e o manuseio do cloro oxigenado, ao longo dos experimentos, provocou corrosão em objetos e peças metálicas de uso no laboratório. No ambiente industrial isso se tornaria um problema complexo, uma vez que poderia causar a corrosão generalizada das estruturas, tanques e tubulações de uma destilaria. Esse fator, aliado aos efeitos sobre a viabilidade da levedura, levaram à decisão de interromper os testes com esse produto, uma vez que o mesmo não traria benefícios ao tratamento com ácido sulfúrico.

5.4 Efeito de tratamentos com triclorocarbanilida em associação com cloreto de benzalcônio sobre *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em fermentação

O biocida 3,4,4' triclorocarbanilida, largamente utilizado em produtos de higiene pessoal (SCHEBB et al., 2011) foi testado em diferentes formulações e concentrações contra bactérias contaminantes de fermentação alcoólica (OLIVANETO; YOKOYA, 1998). No presente trabalho foi reavaliado efeito da formulação contendo triclorocarbanilida (TCC) associada ao cloreto de benzalcônio (CBA) (1:1) em condições de fermentação industrial simuladas, a partir do trabalho de Oliveira Neto et al. (2014), no qual a formulação teve eficácia sobre *L. fermentum* a 1,5 ppm.

A primeira batelada de fermentação foi realizada sem adição de qualquer biocida para ambientação dos microrganismos ao meio, e deixar a contaminação na fermentação em nível passível de tratamento (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* sem tratamento, nos tempos zero e após 6 horas a 35°C.

Fermentação	pH	<i>S. cerevisiae</i> (x 10 ⁸ UFC/mL)	<i>L. fermentum</i> (x 10 ⁶ UFC/mL)	Ácido láctico (mg/L)
T ₀	4,7	1,86	0,58	421
T ₆	4,5	3,67	4,30	784

No ciclo fermentativo subsequente foram feitos tratamentos nos inóculos mistos com a formulação biocida na concentração inibitória mínima 1,5 ppm (OLIVANETO et al. (2014) e 8 ppm, sem ácido sulfúrico, uma vez que no trabalho citado a formulação TCC + CBA 2% foi aplicada em meios com pH 4 e pH 6 (Tabela 12).

Tabela 12 - Parâmetros do 1º ciclo de fermentações com inóculos mistos (*S. cerevisiae* e *L. fermentum*) tratados com biocida TCC + CBA 2% após 6 horas.

Fermentações	TCC+CBA (ppm)	pH	Ácido láctico (mg/L)*	Viab. Leved. (%)
1	1,5	4,6	2144 ± 17	88,65
2	8	4,6	1830 ± 20	89,76
Controle	0	4,5	2317	90,34

* Médias de duplicatas

A viabilidade da levedura não foi afetada significativamente, contudo, também não se observou efeito bactericida da formulação TCC + CBA no presente ensaio, uma vez a produção de ácido láctico nas fermentações tratadas ficaram próximas às registradas no controle, evidenciado atividade bacteriana.

Devido à baixa eficiência bactericida da formulação TCC + CBA nas condições estabelecidas nesse experimento, foram realizadas novas fermentações com inóculos mistos tratados com doses mais elevadas do biocida, sem ácido sulfúrico e com 600 ppm de ácido sulfúrico no inóculo (pH 2,5 ± 0,2). Os resultados dos tratamentos encontram-se na Tabela 13, a seguir.

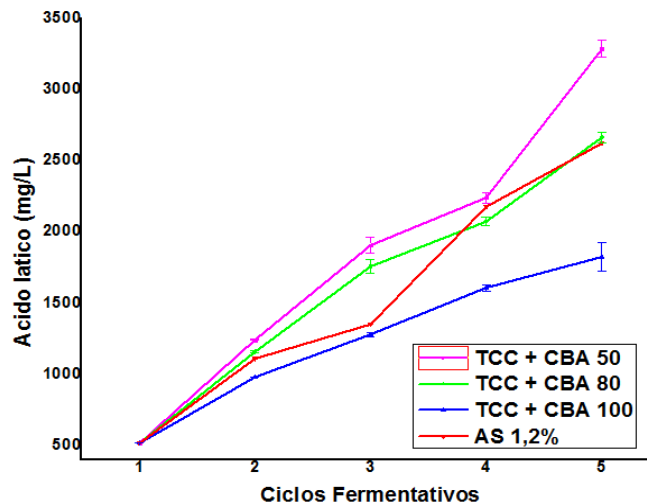
Tabela 13 - Parâmetros de fermentações tratadas com concentrações crescentes do biocida TCC+CBA 2% em ausência e presença de ácido sulfúrico (600 ppm) após 6 horas.

Fermentações	TCC+CBA (ppm)	H ₂ SO ₄ (ppm)	pH	Ác. láctico (mg/L)	Viab. Leved. (%)
1A	16	0	4,7	834	-
1B	16	600	4,3	957	90,65
2A	30	0	4,8	702	-
2B	30	600	4,4	728	90,24
3A	50	0	4,5	520	-
3B	50	600	4,4	586	88,12
4A	80	0	4,6	218	-
4B	80	600	4,5	131	89,52
5	0	1.200	4,0	480	85,46
Controle	0	0	4,1	962	88,29

De modo geral, a produção de ácido láctico nessas fermentações não foi tão elevada como no experimento anterior e a fermentação tratada com 80 ppm da formulação biocida TCC + CBA 2% associada com 600 ppm de ácido sulfúrico apresentou a maior inibição sobre a atividade das bactérias. Foram então realizadas

fermentações em ciclos tratadas com TCC + CBA, tendo a dose 80 ppm como referência (Figura 22).

Figura 22 - Ácido láctico produzido ao longo de cinco ciclos de fermentações, com inóculos tratados com concentrações 50; 80; 100 ppm do biocida triclorocarbanilida associada com cloreto de benzalcônio (TCC + CBA) e 1,2% ácido sulfúrico (AS).



A produção de ácido láctico aumentou significativamente ao longo dos ciclos, especialmente nas fermentações tratadas com 50 ppm do TCC + CBA, seguida das tratadas com 80 ppm do biocida e 1,2% de ácido sulfúrico. Na fermentação tratada com 100 ppm do TCC + CBA houve menor produção do ácido láctico em relação as demais, porém, a partir do segundo ciclo, atingiu o nível considerado elevado de perda e inibição da levedura (VENTURA, 2007; NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001). Pela análise estatística (p valor $< 0,05$) existe diferença entre os tratamentos.

A seguir são apresentados os testes estatísticos referentes aos tratamentos mostrados na Figura 22.

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	283641,9	3	94547,31167	372,6810212	2,38005E-05	6,591382
Dentro dos grupos	1014,78	4	253,695			
Total	284656,7	7				

Segundo o teste Anova (p valor $< 0,05$), existem diferenças entre os tratamos.

Teste de Tukey

Comparação A	b	Xa - Xb	n A	nB	EP(Tukey)	q cal	q _{0,05;3;5}	Conclusão
50	100	526	2	2	11,263	46,703	5,760	difere
50	80	282,7	2	2	11,263	25,100	5,760	difere
50	1,2	204	2	2	11,263	18,112	5,760	difere
80	100	322	2	2	11,263	28,589	5,760	difere
80	1,2	78,7	2	2	11,263	6,987	5,760	difere
100	1,2	243,3	2	2	11,263	21,602	5,760	difere

De acordo com os resultados obtidos com o teste de Tukey as medias, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si.

Um das razões para a baixa eficácia da formulação TCC + CBA nas condições aqui ensaiadas deve-se, muito provavelmente, à inativação de compostos quaternários de amônia, como o CBA, em pH ácido ou em presença de íons Ca⁺ (ROBERGE, 1999), como é o caso dos meios de fermentação.

Segundo Oliva-Neto e Yokoya (1998) o uso do TCC não é permitido em alimentos, o que o tornaria inadequado para tratamento de fermentações que secam levedura para ração animal. Além disso, o uso em larga escala do TCC como antibacteriano em higiene pessoal tem se mostrado controverso em relação aos riscos biológicos e ambientais, frente aos benefícios de seu uso (HALDEN; PAULL, 2005; SCHEBB et al., 2011).

5.5 Efeito do digluconato de clorexidina sobre *S. cerevisiae* e bactérias lácticas em fermentação

Embora se faça uso de derivados de clorexidina na indústria do etanol, não foi encontrada informação na literatura científica abordando essa aplicação.

Assim, foram feitos tratamentos em fermentações contaminadas com o produto comercial Neobiodine 20% (digluconato de clorexidina), a partir de referência de aplicação na área odontológica (CLEGHORN; BOWDEN, 1989) (Tabela 14).

Tabela 14 - Efeito do Neobiodine sobre a produção de ácido láctico e viabilidade da levedura em fermentações de mosto 22° Bx inoculadas com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*.

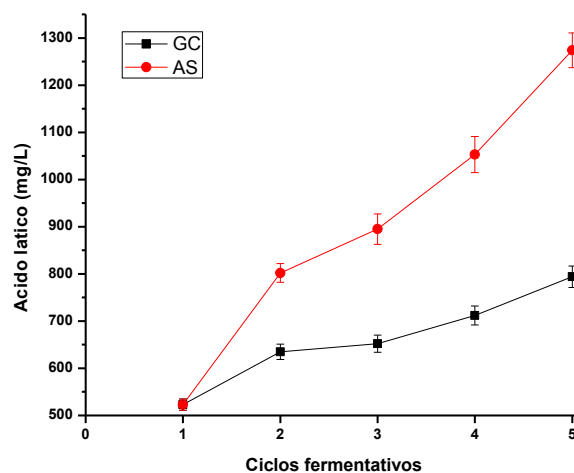
Ciclos fermentação	Neobiodine (ppm ativo)	Viabilidade levedura (%)	Ácido láctico prod. (mg/L)*
2	10	91,97	1360 ± 18
3	20	92,06	1310 ± 12
4	30	91,85	1280 ± 16
5	50	91,23	1220 ± 14
Controle	0	92,31	1370 ± 15

*Média de duplicatas

Tanto a viabilidade da levedura, quanto na produção de ácido láctico pelas bactérias, não sofreram alteração nas fermentações tratadas com as diferentes doses do Neobiodine em relação ao controle. A baixa eficácia do biocida pode estar no caráter catiônico do produto, que pode ter reagido com substâncias aniônicas presentes no meio. Além disso, Cleghorn e Bowden (1989) testando enxaguantes sobre lactobacilos da microbiota bucal verificaram que *L. fermentum* foi sensível à clorexidina entre 2 a 20 µg/mL em pH 6,7, contudo, o produto teve perda de 50% na atividade em pH 5. Assim, pode-se inferir que em pH's mais ácidos encontrados na fermentação etanólica, o produto teria uma maior perda de atividade.

Foi feito outro tratamento dos inóculos mistos com o Neobiodine a 50 ppm, em combinação com 40 ppm de cloreto de benzalcônio, aplicado no mosto. A produção de ácido láctico nas fermentações tratadas encontra-se na Figura 23.

Figura 23 - Produção de ácido láctico em 5 ciclos de fermentação com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* tratadas com 50 ppm de digluconato de clorexidina (GC) no inóculo e 40 ppm de cloreto de benzalcônio no mosto, comparado com 600 ppm de ácido sulfúrico (AS).



O tratamento com digluconato de clorexidina (GC) aplicado no inóculo, em associação com cloreto de benzalcônio (CBA) aplicado no mosto, uma vez que esse composto é inativado em baixo pH (ROBERGE, 1999), não conteve a produção de ácido láctico ao longo dos ciclos, mantendo-se apenas em níveis inferiores à fermentação tratada com 600 ppm de ácido sulfúrico. Novamente o CBA se mostrou inócuo em condições que simulam o processo industrial, ao contrário do que foi constatado por Andrietta et al. (1995) em meios sintéticos.

5.6 Efeito da maitenina e extrato de lúpulo sobre microbiota de fermentação etanólica

Produtos naturais têm sido empregados no controle bacteriano em fermentações nas quais há restrições aos antibióticos convencionais, devido ao aproveitamento da levedura para ração animal. Ácidos de lúpulo são os bactericidas naturais mais comumente utilizados para esse fim, mas apresentaram baixa eficácia no controle das bactérias contaminantes (LEITE et al., 2013).

A maitenina é um composto natural que age sobre organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (GULLO et al., 2012). Desse modo, essa substância foi aplicada preliminarmente em dose 50 mg/L, inferior à mais alta concentração inibitória encontrada no trabalho de referência (60mg/L), com objetivo de se verificar a ação da substância sobre a levedura e a bactéria contaminante em fermentação etanólica, comparativamente a derivado de lúpulo.

O primeiro ciclo fermentativo foi realizado sem qualquer tratamento para a ambientação dos microrganismos ao substrato e adequar às condições de fermentação a um típico processo industrial contaminado (Tabela 15).

Tabela 15 - Parâmetros de fermentação de mosto de melão 22° Bx, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, após 6 horas a 35° C.

Tempo de ferment. (h)	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	<i>S. cerevisiae</i> (cel./mL)	<i>L. fermentum</i> (UFC/mL)	Ac. láctico (mg/L)
0	90,34	6,42	$3,8 \times 10^8$	$8,5 \times 10^6$	666
6	92,65	9,03	$5,2 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	1476

Ao final da fermentação a população de bactérias aumentou uma potência e a produção de ácido láctico mais que dobrou.

No segundo ciclo, após os respectivos tratamentos, foram obtidos os seguintes dados, descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx, inoculados com *S. cerevisiae* e de *L. fermentum*, após 6 horas de fermentação a 35° C, com inóculos tratados com antibacterianos naturais maitenina e extrato de lúpulo; e ácido sulfúrico.

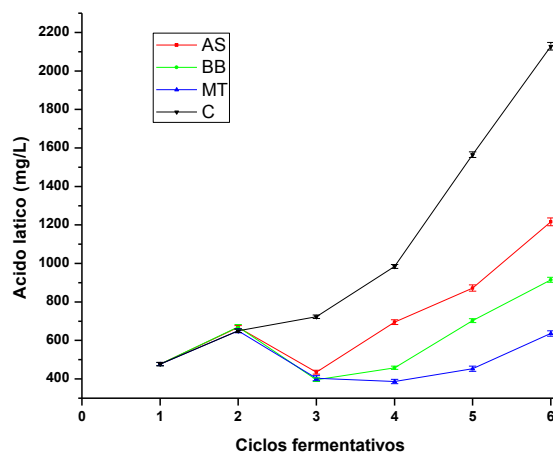
Tratamento	Dose (ppm)	Viabilidade levedura (%)	Brotamento levedura (%)	Bactérias (10^6 UFC/mL)*	Ácido láctico (mg/L)
Maitenina	50	91,37	12,60	6,2 ± 6	1404
Extrato lúpulo	30	92,86	16,15	4,3 ± 8	1296
H ₂ SO ₄	600	86,21	10,23	2,8 ± 10	1431
Controle	-	88,03	9,46	68,0 ± 14	1945

*Médias de duplicatas

Os tratamentos surtiram efeito bacteriostático, como mostra a contagem de bactérias, que permaneceu na mesma potência do controle, como também pela produção de ácido láctico, que não caiu abaixo de 400 ppm, como seria esperado para um tratamento convencional (VENTURA, 2007). O resultado obtido pelo biocida a base de extrato de lúpulo ficou próximo ao observado por Rückle e Senn (2006).

A viabilidade da levedura não foi afetada pela maitenina na dose aplicada e, assim, realizou-se novos ciclos fermentativos, aplicando o produto na mesma dose do derivado de lúpulo (30 ppm), para melhor comparação (Figura 24).

Figura 24 - Concentração de ácido láctico após 6 horas de fermentação de mosto de melaço 22° Bx a 35° C, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, tratados com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB) e 600 ppm de ácido sulfúrico.



Todos os tratamentos diminuíram a produção do ácido láctico no ciclo seguinte à aplicação e mantiveram menor produção em relação ao controle nos ciclos seguintes. A maitenina teve a melhor eficácia entre os biocidas, seguida do extrato de lúpulo e, finalmente, o ácido sulfúrico. Contudo, os tratamentos não foram suficientes para evitar a retomada da atividade bacteriana, como se constata pelo aumento da produção de ácido láctico nos tratamentos com ácido sulfúrico e o extrato de lúpulo a partir do terceiro ciclo fermentativo, bem como nos tratamentos com a maitenina, a partir do terceiro ciclo.

Os resultados desse experimento, obtidos pela dosagem de ácido láctico, indicam que os produtos naturais aqui avaliados têm efeito apenas bacteriostático, e mostram correlação com os dados obtidos por Leite et al. (2013), nos quais o mesmo extrato de lúpulo não conseguiu baixar a população bacteriana do nível 10^8 CFU /mL, enquanto que a monensina diminui contaminação em quatro potências. Abaixo é mostrado o teste t para as médias dos tratamentos acima.

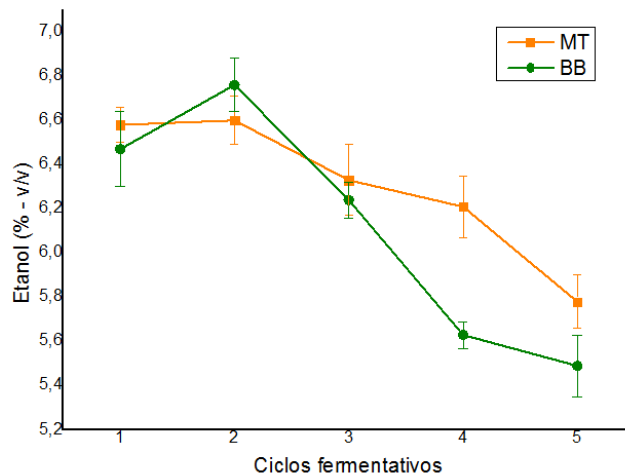
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável</i>	
	<i>1</i>	<i>2</i>
Média	644	922,5
Variância	128	112,5
Observações	2	2
Variância agrupada	120,25	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	2	
Stat t	-25,397	
P(T<=t) uni-caudal	0,000773	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,001547	
t crítico bi-caudal	4,302653	

Pela análise estatística ($P < 0,05$) pode-se constatar que houve diferença entre os tratamentos no que se refere à produção de ácido láctico.

Como consequência do aumento da carga bacteriana, ocorreu a diminuição da produção de etanol a partir do segundo ciclo, como pode ser observado na Figura 25, a seguir.

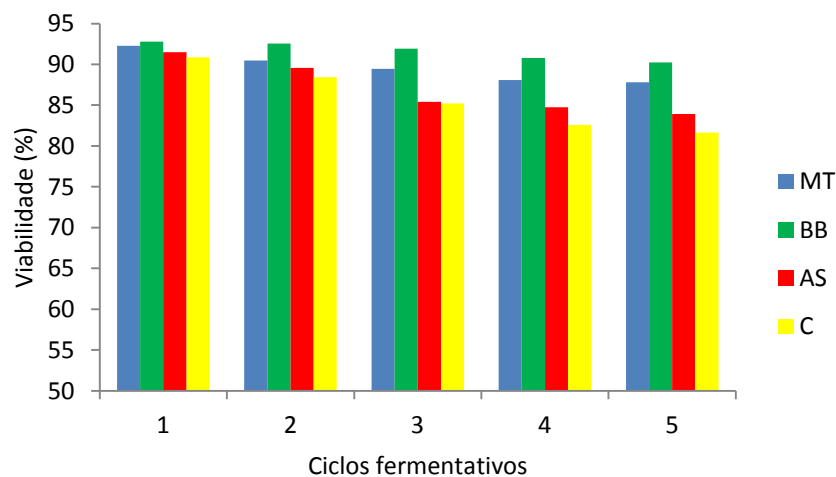
Figura 25 - Etanol produzido nos ciclos sucessivos de fermentações inoculadas com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*, após tratamentos com ácido sulfúrico, maitenina (MT) e extrato de lúpulo (BB).



Embora a produção de etanol tenha registrado um pequeno aumento após os tratamentos, os produtos naturais não contiveram a atividade das bactérias, o que refletiu na queda do teor alcoólico a partir do segundo ciclo. De qualquer modo, a maitenina, na média proporcionou um teor de álcool quase 3% superior ao registrado com o extrato de lúpulo.

As viabilidades das leveduras tratada com os antibacterianos naturais e o ácido sulfúrico são mostradas na Figura 26.

Figura 26 - Viabilidade de *S. cerevisiae* após fermentações tratadas com 30 ppm de maitenina (MT); 30 ppm de extrato de lúpulo (BB); 600 ppm de ácido sulfúrico; e controle.



Ao longo dos ciclos, a maitenina não afetou a viabilidade de levedura *S. cerevisiae* PE-2 nas condições de fermentação, ficando em níveis próximos ao extrato de lúpulo e superiores aos registrados no tratamento com ácido sulfúrico e o controle. Embora o trabalho de Gullo et al. (2012) tenha registrado atividade antifúngica da maitenina a partir de 0,12 mg/L, a alta concentração de células nas fermentações corridas no presente experimento, bem como a robustez da levedura PE-2 foi determinante para a manutenção viabilidade.

Os resultados promissores com a maitenina não puderam ser aprofundados devido a escassez de amostra do produto.

5.7 Efeito de antibióticos ionóforos sobre bactérias lácticas e levedura PE-2 em fermentação etanólica

A salinomicina é um poliéter ionóforo, sendo, portanto, uma alternativa para tratamento de fermentações contaminadas com bactérias pouco sensíveis à monensina, principalmente quando não existe restrição a antibióticos. Assim, o efeito desse antibacteriano, em comparação com o outro ionóforo sobre a microbiota de fermentação alcoólica foi aqui avaliado.

5.7.1 Efeito de salinomicina e monensina sobre *L. fermentum* e levedura PE-2 em fermentação etanólica

O primeiro ciclo fermentativo foi realizado sem tratamento para a ambientação dos microrganismos às condições de fermentação (Tabela 17).

Tabela 17 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, após 6 horas a 35° C.

Tempo de ferment. (h)	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	<i>S. cerevisiae</i> (cel./mL)	<i>L. fermentum</i> (UFC/mL)	Ac. láctico (mg/L)
0	90,87	8,23	$4,2 \times 10^8$	$6,7 \times 10^6$	586
6	91,52	9,48	$5,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	783

Ao final das 6 horas de fermentação pode-se verificar a atividade das bactérias e da levedura. Os inóculos foram então tratados os antibacterianos e

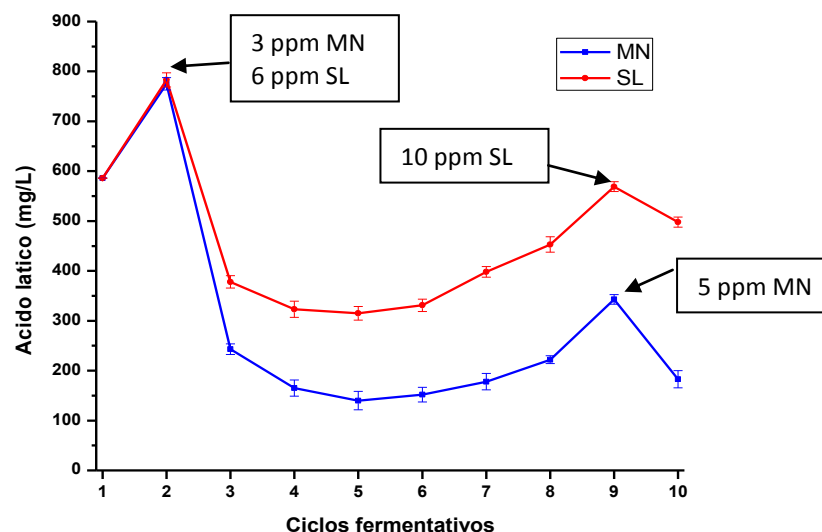
verificados os parâmetros da fermentação ao longo de dez ciclos fermentativos. A contagem de bactérias antes e após os tratamentos encontra-se na Tabela 18.

Tabela 18 – População de bactérias em fermentações de mosto de melaço 22° Bx, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, antes e após tratamento com antibióticos ionóforos salinomicina e monensina.

Antibacteriano aplicado	pH final	<i>L. fermentum</i> (UFC/mL)	
		Antes	Após
Salinomicina	4,6	$5,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$
Monensina	4,7	$6,3 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$

A diminuição de uma potência na população de *L. fermentum* após o tratamento com a salinomicina, e de duas potências após o tratamento com a monensina ficou em níveis inferiores aos verificados por Leite et al. (2013) ao tratar fermentação contaminada com bactérias crescidas em caldo de cana exposto ao ambiente com 3 ppm de Kamoran (monensina sódica), na qual a população de bactérias diminuiu de 10^8 para 10^4 UFC/mL, provavelmente devido à maior sensibilidade da microbiota presente naquela experimento, bem como pelas condições de ensaio. Contudo, os dados aqui obtidos mostram coerência com a produção de ácido láctico, como consta na Figura 27:

Figura 27 - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melaço 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).



Ambos antibióticos mostraram eficácia frente à *L. fermentum* nas doses utilizadas, diminuindo a concentração de ácido láctico nos ciclos seguintes à dosagem, porém, com intensidade menor que a registrada por Ventura (2007) ao aplicar esses produtos em indústria. Isso provavelmente se deve ao fato da microbiota presente na fermentação industrial, naquele momento, ser mais susceptível aos antibióticos, o mesmo ocorrendo com o experimento conduzido por Leite et al. (2013) que trataram bactérias vindas do ambiente.

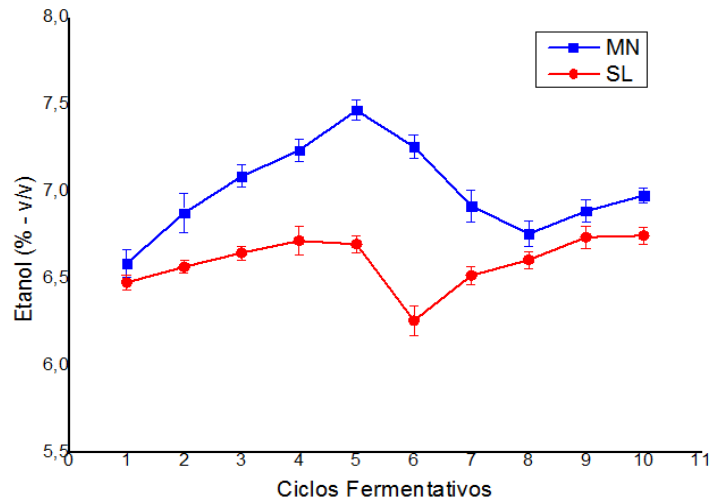
Segue a análise estatística da produção de ácido láctico nos tratamentos.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Variável	
	1	2
Média	465,1	303,45
Variância	5,78	45,125
Observações	2	2
Variância agrupada	25,4525	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	32,04133	
P(T<=t) uni-caudal	0,000486	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,000973	
t crítico bi-caudal	4,302653	

Pelo Teste-t ($P < 0,05$) houve diferença entre os tratamentos quanto a inibição do ácido láctico. A monensina teve um efeito bactericida mais pronunciado, diminuindo a concentração de ácido láctico em 68,65%, frente à diminuição de 51,72% obtida pela salinomicina. O efeito bacteriostático dos antibióticos pode ser verificado nos cinco ciclos seguintes, nos quais a produção de ácido láctico foi mantida abaixo de 200 ppm nas fermentações tratadas com a monensina, 45% inferior às tratadas com salinomicina, com níveis de ácido láctico inferiores a 400 ppm. A fase *lag* de atividade bacteriana pode ser observada no ciclo 9, quando efetuou-se uma segunda aplicação dos biocidas. Mesmo com doses mais altas, a inclinação da curva de morte não foi a mesma observada na primeira dosagem, o que leva a inferir que as bactérias remanescentes do tratamento eram menos sensíveis aos produtos, de acordo com Bischoff et al. (2009).

Figura 28 - Produção de etanol ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melaço 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).



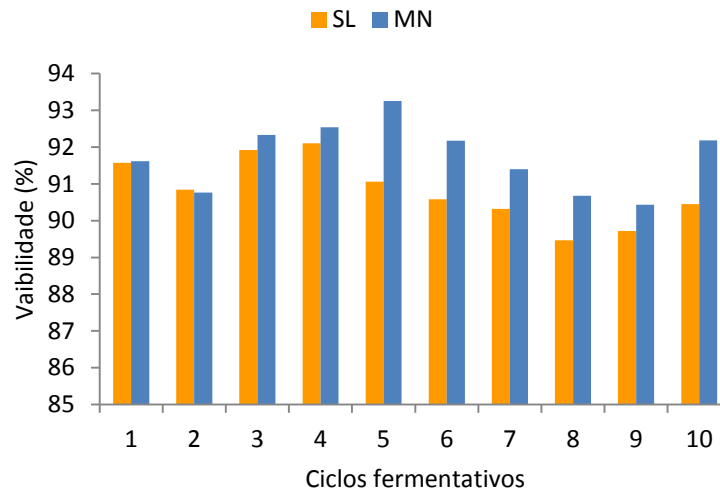
Pode-se verificar que a produção de etanol se recupera de modo inversamente proporcional ao declínio da população de bactérias, como também observaram Thomas; Hynes e Ingledew (2001), ficando na média 6,58° GL nas fermentações tratadas com salinomicina, e 6,96° GL nas fermentações tratadas com monensina.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	Variável 1	Variável 2
Média	6,596	7,006
Variância	5E-05	0,0002
Observações	2	2
Variância agrupada	0,000125	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-36,6715	
P(T<=t) uni-caudal	0,000371	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,000743	
t crítico bi-caudal	4,302653	

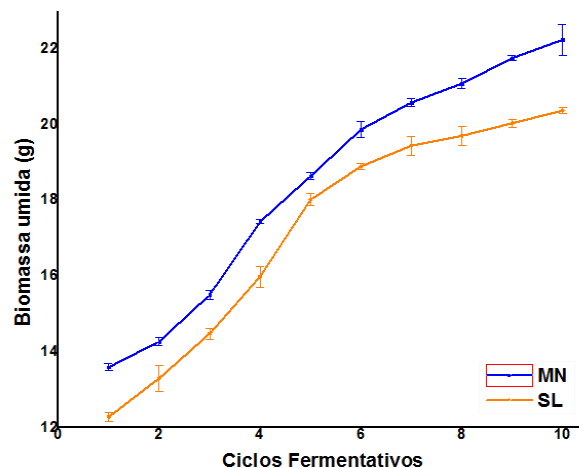
Pelos testes estatísticos ($P < 0,05$), houve diferença entre os tratamentos quanto a produção de etanol com os respectivos tratamentos.

Figura 29 - Viabilidade de *S. cerevisiae* ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).



A viabilidade média da levedura PE-2 nos meios tratados com salinomicina foi de $91,74 \pm 0,88\%$ e nas fermentações tratadas com monensina a média foi de $92,10 \pm 0,91\%$ ao longo dos dez ciclos fermentativos. Resultados semelhantes foram obtidos por Nobre; Horii e Alcarde (2007), que observaram queda na viabilidade celular de *S. cerevisiae* somente em meio acidificados por *L. fermentum*.

Figura 30 - Produção de biomassa de levedura ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melão 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Os inóculos foram tratados no segundo e nono ciclos, respectivamente com 3 e 5 ppm de monensina (MN) e 6 e 10 ppm salinomicina (SL).



A produção de biomassa ao longo dos ciclos fermentativos mostra que a partir do quinto ciclo há a possibilidade de extração do excedente de levedura para alimentação animal, sem prejuízos à fermentação, pois a densidade celular ficou dentro do parâmetro ideal (AMORIM et al, 2011). Contudo, o residual de antibiótico no creme de levedura deve atender aos requisitos sanitários (VENTURA, 2009).

5.7.2 Efeito da salinomicina e monensina sobre *Lactobacillus ssp.* e levedura PE-2 em fermentação etanólica

Os experimentos com ambos os antibacterianos foram repetidos, inoculando-se agora, a bactéria láctica isolada de fermentação industrial, como segue.

Tabela 19 - Parâmetros de fermentação de mosto de melaço 22° Bx, inoculado com *S. cerevisiae* e *L. ssp.*, após 6 horas a 35° C.

Tempo de ferment. (h)	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	<i>S. cerevisiae</i> (cel./mL)	<i>L. ssp.</i> (UFC/mL)	Ac. láctico (mg/L)
0	92,16	9,07	$4,7 \times 10^8$	$5,8 \times 10^6$	495
6	92,51	9,85	$6,1 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	684

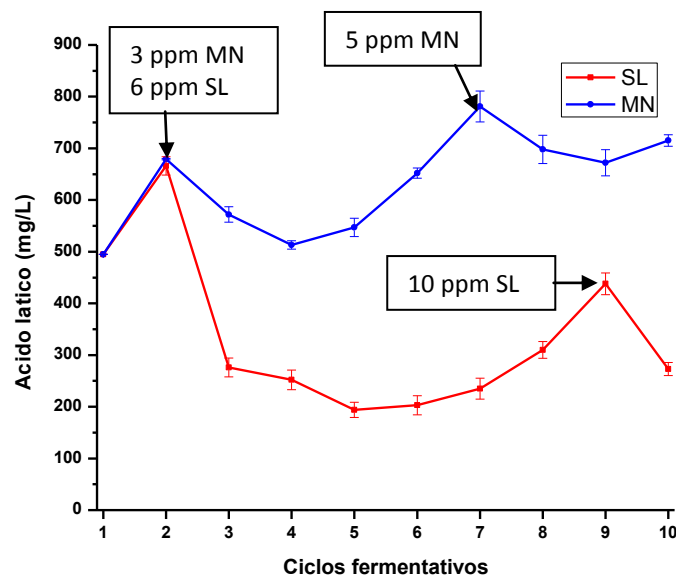
Ao final das 6 horas de fermentação pode-se verificar a atividade das bactérias e da levedura. Foram então feitos os tratamentos com os produtos em teste e analisadas a produção de ácido láctico, etanol, biomassa e viabilidade da levedura ao longo de dez ciclos fermentativos. A Tabela 20 mostra a população de bactérias antes e depois do tratamento e a Figura 31 a produção de ácido láctico.

Tabela 20 - pH e população de bactérias em fermentações de mosto de melaço 22° Bx, inoculado com *S. cerevisiae* e bactéria láctica isolada de fermentação industrial (BAL), antes e após tratamento com antibióticos ionóforos.

Antibacteriano aplicado	pH final	BAL (UFC/mL)	
		Antes	Após
Salinomicina	4,6	$5,3 \times 10^7$	$8,0 \times 10^5$
Monensina	4,3	$4,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

O *Lactobacillus ssp.*, exibiu baixa sensibilidade à monensina, confirmando ocorrência na destilaria na qual a espécie foi isolada (dado não publicado). Isso é verificado pela inexpressiva diminuição da população de bactérias após o tratamento, bem como pela produção de ácido láctico (Figura 31).

Figura 31 - Produção de ácido láctico ao longo de 10 ciclos fermentativos com mosto de melação 22° Bx inoculado com *S. cerevisiae* e *Lactobacillus ssp.*, tratadas com 3 ppm de monensina (MN) e 6 ppm de salinomicina (SL) no segundo ciclo, e 5 ppm de monensina no sétimo ciclo e 10 ppm de salinomicina no nono ciclo.



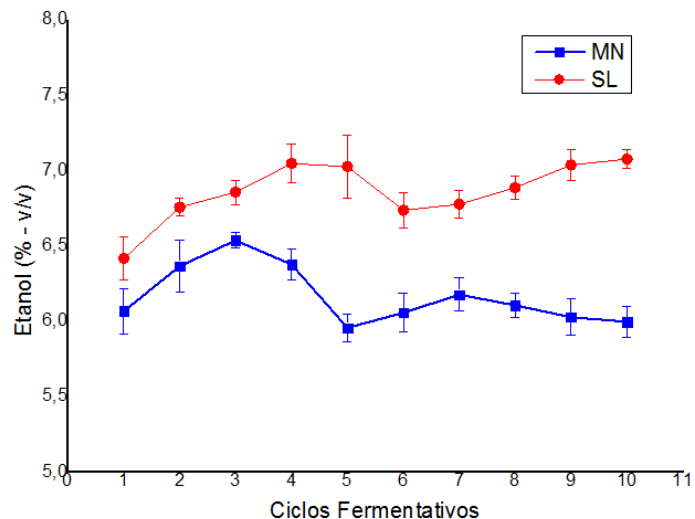
Nota-se também a retomada de atividade metabólica dos indivíduos remanescentes, que atingiu a fase *log* no segundo ciclo subsequente ao tratamento com a monensina. Por outro lado, a salinomicina mostrou-se mais eficaz frente a essa espécie, como pode se observar pela queda acentuada na produção de ácido láctico e população de bactérias, após o tratamento, e o efeito bacteriostático ao longo dos quatro ciclos subsequentes.

Segue a análise estatística da produção de ácido láctico nos tratamentos.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	333,95	643,35
Variância	5,445	18,605
Observações	2	2
Variância agrupada	12,025	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-89,223194	
P(T<=t) uni-caudal	6,2796E-05	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,00012559	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Pela teste-t ($P < 0,05$) pode-se constatar que houve diferença entre os tratamentos no que se refere à produção de ácido láctico.

Figura 32 - Produção de etanol em fermentações de mosto de melão inoculadas com *S. cerevisiae* e *L. ssp.*, tratadas com monensina e salinomicina ao longo de 10 ciclos fermentativos.



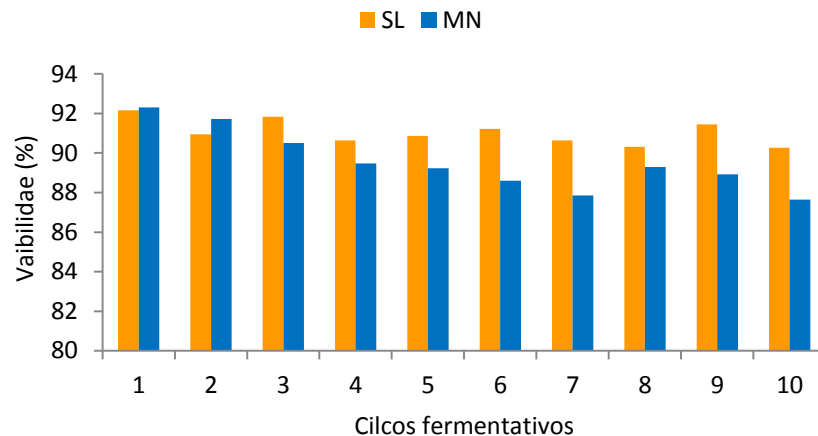
A produção de etanol nas fermentações tratadas com salinomicina ficou, na média dos dez ciclos, $6,86 \pm 0,29\%$, enquanto que os tratamentos com monensina resultaram em $6,17 \pm 0,20\%$.

A seguir a análise estatística das médias de etanol nos tratamentos.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	6,862	6,167444
Variância	0,006962	0,0018537
Observações	2	2
Variância agrupada	0,004408	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	10,46151	
P(T<=t) uni-caudal	0,004507	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,009014	
t crítico bi-caudal	4,302653	

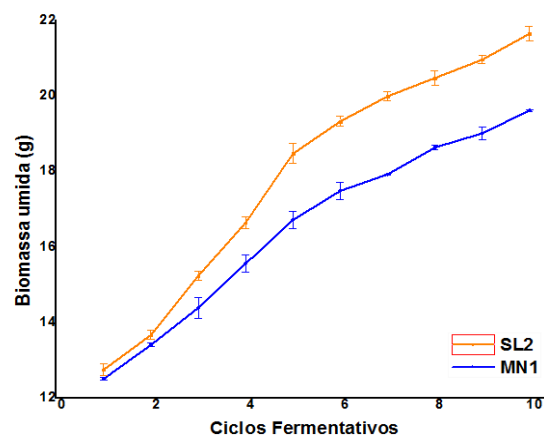
Pela análise estatística ($P < 0,05$) pode-se constatar que houve diferença entre os tratamentos no que se refere à produção de etanol.

Figura 33 - Viabilidade de *S. cerevisiae* em fermentações tratadas com salinomicina e monensina ao longo de 10 ciclos fermentativos.



A viabilidade média da levedura PE-2 nos meios tratados com salinomicina ficou em $91,03 \pm 0,88\%$, mantendo-se dentro dos padrões ideais. A viabilidade nas fermentações tratadas com monensina manteve média de $89,56 \pm 1,54\%$ ao longo dos dez ciclos fermentativos, uma queda pouco expressiva, mesmo com uma contaminação mais acentuada, o que pode ser explicado pela alta concentração celular, como mostra a Figura 34.

Figura 34 - Produção de biomassa ao longo de dez ciclos fermentativos tratados com salinomicina (SL) e monensina (MN).



A evolução da produção de biomassa nas fermentações contaminada com a bactéria industrial exibiu o mesmo perfil das fermentações inoculadas com o *L.*

fermentum, permitindo, da mesma maneira o aproveitamento do excedente de levedura para ração animal.

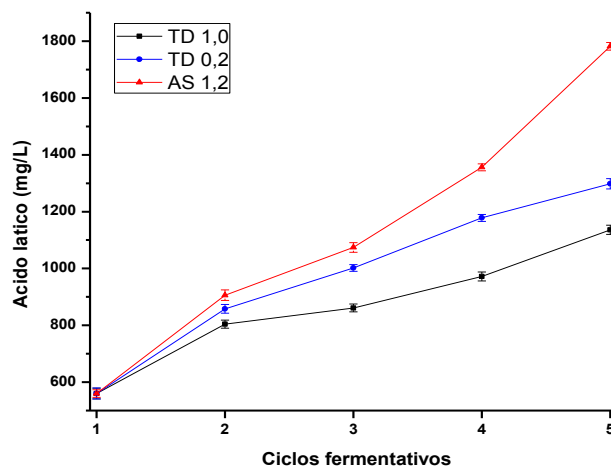
A diversidade de bactérias que incidem sobre as fermentações industriais é muito vasta e varia a cada ciclo, de acordo com as condições da matéria-prima (DUNCAN; COLMER, 1964; GALLO, 1992). De qualquer modo, a micro fermentação em frascos agitados, mostrou-se uma ferramenta bastante precisa na avaliação de antibacterianos, conforme proposto por Bischoff et al. (2009).

Os experimentos corroboram a necessidade de se valer de antibacterianos de princípios ativos diferentes, ao longo da safra, de modo a inibir eficazmente a microbiota predominante no momento da contaminação (EARNEST; SNYDER; WESTRA, 2009).

5.8 Efeito do HEDTA em fermentação alcoólica contaminada

Embora bactérias gram-positivas não exibam sensibilidade ao EDTA, estes microrganismos requerem íons metálicos para o crescimento; e como o agente quelante tem a capacidade de deslocar íons, como Ca^{+2} , sua remoção pode interferir em reações vitais e abrir portas para a ação de outros compostos biocidas (KABARA, ORTH, 1997).

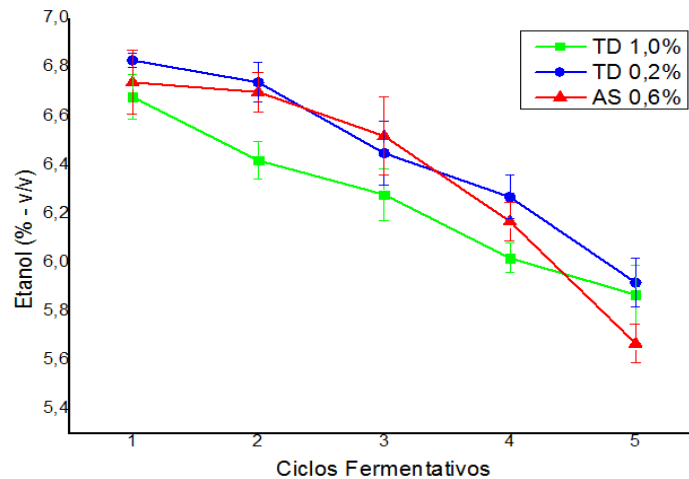
Figura 35 - Ácido láctico produzido em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA em comparação com 1.200 ppm de ácido sulfúrico.



A produção de ácido láctico não foi contida por nenhum dos três tratamentos. Contudo, o tratamento com HEDTA 1% associado ao ácido sulfúrico 0,6 % manteve

uma taxa menor ao longo dos ciclos, tanto em relação ao HEDTA 0,2% + ácido sulfúrico 0,6%, quanto em relação ao ácido sulfúrico 0,6% somente (Figura 36).

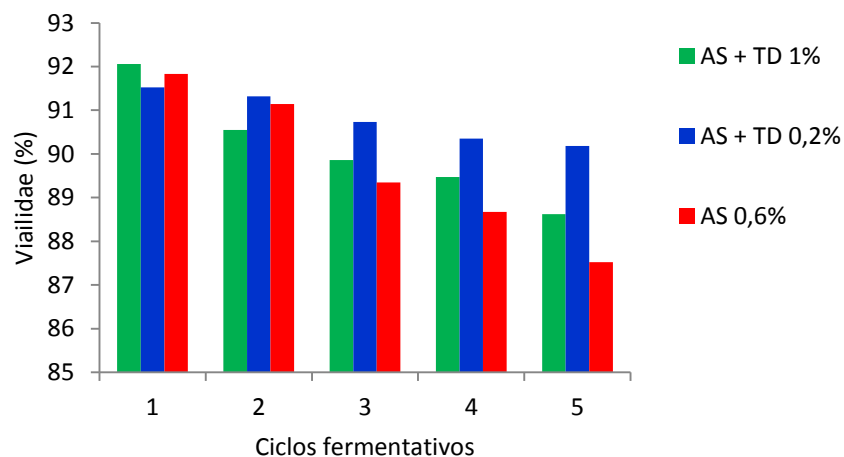
Figura 36 - Produção de etanol em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de HEDTA, e 600 ppm de ácido sulfúrico.



As médias da produção de etanol foram 5,30 g para o HEDTA 1%, 5,13 g para o HEDTA 0,2% e 5,25 g para o controle, somente com ácido sulfúrico.

Comparando-se as produções dos metabólitos microbianos ao longo dos ciclos nota-se que os tratamentos foram pouco efetivos na inibição bacteriana e também não incrementaram a produção de etanol.

Figura 37 - Viabilidade de *S. cerevisiae* tratadas com ácido sulfúrico (0,6%) e HEDTA 0,2 e 1% ao longo de cinco ciclos fermentativos.

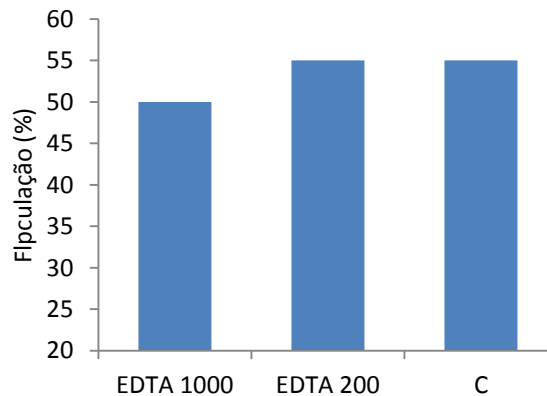


Brull e Coote (1999) reportam o uso de quelantes como agente potencializador de ácidos orgânicos na preservação de alimentos. Isso pode ser devido ao aumento da permeabilidade da parede da levedura (NOBEL et al., 1989), o que explica a maior queda de viabilidade da levedura nas fermentações tratadas com a maior concentração do HEDTA.

5.8.2 Desfloculação de células com EDTA

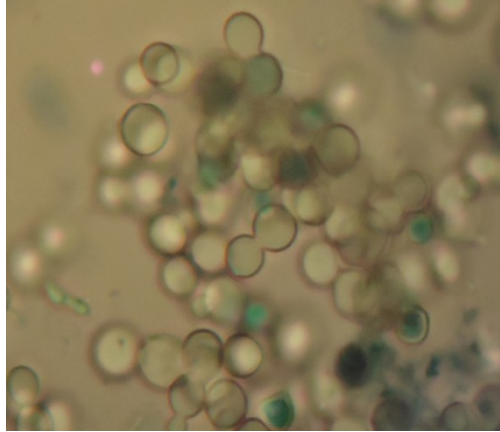
Nos processos de produção de álcool combustível é essencial que as células se mantenham em suspensão homogênea de modo a atingir rendimento e produtividade adequados (SANTOS; YOKOYA, 1993). Segundo Walker (1998) a floculação de leveduras pode ser revertida por EDTA. Assim, foi verificada a ação desse agente quelante sobre floculação de leveduras associada a bactérias lácticas em fermentação.

Figura 38 - Índice de floculação de suspensões de levedura PE-2 em fermentações tratadas com 200 e 1.000 ppm de EDTA e sem tratamento (C).



A suspensão de levedura tratada com 200 ppm da solução EDTA não apresentou qualquer diminuição no índice de floculação durante o tempo de tratamento típico da indústria. O tratamento com 1.000 ppm da solução quelante promoveu a diminuição de 5 pontos percentuais no índice de floculação, permanecendo 50% de floculação remanescente. Esse índice ainda está muito acima do aceitável para as condições industriais (máx. 10%), bem como o que normalmente se conseguiria com a lavagem ácida em pH 2,0, feita com ácido sulfúrico.

Figura 39 - Flocculação de leveduras em fermentação etanólica contaminada com bactéria láctica, tratada com 1.000 ppm de EDTA, vista ao microscópio ótico (1.000 X).



Fonte: Próprio autor

A observação da suspensão de células ao microscópio ratifica os resultados obtidos nos ensaios de decantação em proveta, os quais mostram que solução de EDTA 20%, tanto na a 200 ppm quanto a 1.000 ppm não foi suficiente para reverter a flocculação das leveduras no meio fermentado. Pode-se inferir, portanto, que as ligações entre as proteínas das paredes da levedura e das bactérias presentes no meio são mais resistentes a ação do EDTA do que as ligações proteicas entre leveduras, como constatado por Stratford (1996), ao verificar que a remoção do cálcio por quelação com EDTA causou a perda de atividades da lectina, proteína responsável pela flocculação.

A baixa eficiência do EDTA nas condições do presente ensaio também pode ser devido à alta concentração de íons Ca^{+2} no mosto (aproximadamente 800 ppm), originário do melaço, ou pelo baixo pH do meio, que inibiu a ação do produto, mais estável em pHs alcalinos (BASF, 1995).

Conclusões

6 Conclusões

O controle da contaminação bacteriana na fermentação etanólica representa um grande desafio na gestão do processo industrial.

Os testes laboratoriais para determinar a sensibilidade de bactérias aos biocidas devem reproduzir as condições do ambiente no qual serão aplicados, como pH, temperatura e composição do meio de cultura, caso contrário fornecerão resultados imprecisos.

O produto Huwa-San, a base de peróxido de hidrogênio, exibiu baixa ação bactericida, mesmo na dose de 1.000 ppm, mas pode ser usado como coadjuvante de outros tratamentos biocidas, em destilarias de etanol com aproveitamento de levedura para ração animal.

Derivados de cloro afetam indiscriminadamente bactérias e levedura em fermentação etanólica, além de serem produtos com alto potencial corrosivo.

A associação dos biocidas triclorocarbanilida e cloreto de benzalcônio mostrou efeito apenas bacteriostático em dose de 80 ppm, o que poderia inviabilizar economicamente os tratamentos.

O gluconato de clorexidina, dosado a 50 ppm, não mostrou eficácia no controle de *L. fermentum* nas condições de fermentação.

O produto natural maitenina, na dose 30 ppm, teve efeito bacteriostático sobre *L. fermentum*, e poder ser uma alternativa para tratamento de fermentações que produzem levedura para ração animal. Contudo, sua utilização depende de disponibilidade em escala comercial.

A salinomicina, nas doses 6 e 10 ppm, se mostrou eficaz no controle de bactérias lácticas, com reflexos positivos nos diversos parâmetros da fermentação.

Agentes quelantes, em doses de até 1.000 ppm, não revertem a floculação microbiana, nem controla as bactérias em fermentação etanólica.

O ácido sulfúrico deve ser utilizado em concentração máxima de 2% (m/v) sobre o volume do inóculo para não afetar a levedura.

Recomendações

7 Recomendações para próximos trabalhos

Associações de biocidas necessitam de estudos mais aprofundados, nas condições de processo, para que seus efeitos (sinérgicos ou antagônicos) sobre a microbiota da fermentação etanólica sejam elucidados.

A maitenina poderia ser objeto de testes mais extensos e aprofundados no controle de bactérias em fermentação etanólica.

O dióxido de cloro, citado no presente trabalho, deveria ser alvo de estudos mais aprofundados em laboratório, com objetivo de elucidar efeitos inibitórios sobre a levedura, percebidos nas fermentações industriais.

Associações entre agentes quelantes e antibióticos poderiam ser experimentadas em formulações específicas para contaminações com floculação elevada.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALBERT, A.; GLEDHILL, W. S. The choice of a chelating agent for inactivating trace metals. **Biochemical Journal**, v. 41, n. 4, p. 529-533, 1947.
- ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GIULLOUET, S. E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 217-222, 2004.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 20-27, 1998.
- ALVES, L. M. C.; SCHUCH, V.; SOUZA, J. A. M.; LEMOS, E. G. M. Metagenoma e a desconstrução da biomassa. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 4, p. 83-111.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Tecnologia sobre processamento de leveduras vivas, inativas e seus derivados: conceitos básicos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 5-21.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 5, p. 39-56.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVERIA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação da concentração inibitória mínima para cinco antimicrobianos sobre bactérias G (+) isoladas na indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 13, p. 42-43, 1995.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugarcane molasses. **Applied Microbiology**, v. 8, p. 263-268, 1960.
- AQUARONE, E.; SATO, S. Controle de contaminações microbianas em processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 25, p. 583-593. (Biotecnologia industrial, v. 3).
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2006.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273- 2282, 2009.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SOCIAL - Centro de gestão de assuntos estratégicos. (Org.). **Bioetanol de cana de açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org/pt/download/bioetanol.pdf>>. Acesso em: 21/10/2013.

BARTH, D.; MONTEIRO, A. R. S.; COSTA, M. M. da; VIRKAJÄRVI, I.; SACON, V.; WILHEMSOM, A. DesinFix TM 135 in fermentation process for bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 323-325, 2014.

BASF. **Trilon**: chelating agents. Ludwigshafen, 1995.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L. de; MORAIS, J. O. F.; SILVA FILHO, E. A. da; MORAIS JUNIOR, M. A. de; SIMÕES, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production**: recent development and prospects. Rijeka: Intech, 2011. Chap. 5, p. 85-100.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BAUER, F. F.; GOVENDER, P.; BESTER, M. C. Yeast flocculation and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by acid lactic bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362-368, 2004.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4 p. 387-394, 2011.

BISCHOFF, K. M.; SKINNER-NEMEC, K. A.; LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 739-744, 2007.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination in fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

BRIÑEZ, W. J.; ROIG-SAGUÉZ, A. X.; HERRERO, M. M. H.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; GUAMIS, B. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., and *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 17, p. 516-521, 2006.

BROMBERG, R.; YOKOYA, F. Chemical modifications of the cell-surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 and their effect on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 508-511, 1995.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservatives agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1/2, p. 1-17, 1999.

BURNQUIST, H. L. Porque o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol? **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, p. 22-23, jan./mar. 2007. Edição especial.

CALAM, C. T. Shake-flask fermentation. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1986. Chap. 6, p. 59-65.

CÂMARA, A.; AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L.; VIEIRA, A. C. S. Efeito da salinomicina na prevenção da acidose láctica ruminal experimental em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 65-73, 2013.

CAMOLEZ, M. A.; MUTON, M. R. J. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 3, n. 5, p. 42-47, 2005.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1325, n. 1, p. 63-70, 1997.

CAVALHEIRO, A. J.; COUTINHO, I. D.; LEME, G. M.; SILVA, A. A.; SILVA, A. P. D. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia. In: LEMOS, E. G. M; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 1, p. 15-34.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-6, 1997.

CHERUBIN, R. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHOTINEERANAT, S.; WANSUKSRI, R.; PIYACHOMKWAN, K.; CHATAKANONDA, P.; WEERATHAWORN, P.; SRIROTH, K. Effect of calcium ions on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p. 120-124. 2010.

CLEGHORN, B.; BOWDEN, G. H. The effect of pH on the sensitivity of species of *Lactobacillus* to chlorhexidine and the antibiotics minocycline and spiramycin. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 7, p. 1146-1150, 1989.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Document M07-A9**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Wayne, 2012. v. 32, n. 2, 88 p.

CORADELLO, L. F. C. **Condições de propagação e revitalização para produção de etanol pela linhagem iqar/45-2 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações sucessivas**. 2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

DAY, W. H.; SERJAK, W. D.; STRATTON, J. R.; STONE, L. Contamination inhibition, antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations.

Agricultural and Food Chemistry, v. 2, p. 252-258, 1954.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 1, n. 23, p. 130-135, 1960.

DEVORE, J. L. **Probabilidade e estatística para a engenharia e ciências**. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

DOETSCH, R. N. Determinative methods of light microscopy. In: GERHARDT, P. (Ed.). **Manual of methods for general bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. Chap. 3, p. 21-33.

DORTA, C.; OLIVA NETO, P.; ABREU NETO, M. S.; NICOLAU JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.

DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugar cane plants and juices. **Applied Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 173-177, 1964.

DWYER, D. J.; KOHANSKY, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482-489, 2009.

EARNEST, C.; SNYDER, C.; WESTRA, S. Fermentation management. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 19, p. 275-287.

ERGUN, M.; MUTLU, S. F.; GÜREL, O. Improved ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, ferrocyanide and zeolite X addition to sugar beet molasses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 147-150, 1997.

ESSIA-NGANG, J. J.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

FERNANDES, E. A. N.; NEPOMUCENO, N.; TREVIZAM, A. B.; AMORIM, H. V. From potential do reality: yeasts derived from ethanol production for animal nutrition. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 234, n. 1, p. 113-118, 1998.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, 1998.

FURUKAWA, S.; WATANABE, T.; TOYAMA, H.; MORINAGA, Y. Significance of microbial symbiotic coexistence in traditional fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 5, p. 533-539, 2013.

FUX, C. A.; STOODLEY, P.; SHIRTLIFF, M.; COSTERTON, J. W. The functional resistance of bacterial biofilms. In: MAYERS, D. (Ed.). **Antimicrobial drug resistance: mechanisms of drug resistance**. New York: Humana Press, 2009. v. 1, chap. 11, p. 121-131.

GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 10, p. 30-34, 1992.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 6, p. 35-37, 1991.

GAO, Y. C.; ZHANG, G.; KRENTZ, S.; DARIUS, S.; POWER, J.; LAGARDE, G. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 8, n. 1, p. 76-83, 2002.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in the pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 511-518, 2004.

GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. Brazilian alcohol program: an overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, p. 17-22, 1994.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GRAHAM, H.; SANTOS, T. T.; WADT, G. Mode of action of yeast products in animal feed. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 77-90.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON K.; POWER, R. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1190-1196, 2006.

GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Flocculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica. 1º método de detecção preventiva e estudos para o controle. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 16, p. 25-27, 1998.

GULLO, F. P.; SARDI, J. C. O.; SANTOS, V. A. F. F. M.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANGI, N. S.; ROSSI, S. A.; SILVA, A. C. A. P.; SOARES, L. A.; SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/340787.

HALDEN, R. U.; PAULL, D. H. Co-occurrence of trichlorcarban and triclosan in U. S. water resources. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 1420-1426, 2005.

HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; McMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J.; COOTE, P. J. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3158-3164, 1996.

HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 284-291, 1997.

IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3604-3608, 1995.

INGLEDEW, W. M. Yeasts: physiology, nutrition and ethanol production. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009a. Chap. 9, p. 101-113.

INGLEDEW, W. M. Yeast stress in the fermentation process. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009b. Chap. 10, p. 116-126.

INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KRAUS, J. K. Commercial yeast production for the fuel ethanol and distilled beverage industries. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 11, p. 127-144.

INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. The alcohol industry: how has it changed and matured? In: _____. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 1, p. 1-6.

KABARA, J. J.; ORTH, D. S. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. In: KABARA, J. J.; ORTH, D. S. (Ed.). **Principles for product preservation**. New York: Marcel Dekker, 1997. v. 16, chap. 1, p. 1-14. (Cosmetic science and technology, v. 16).

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, sect. 14, p. 1208-1234.

KELSALL, D. R.; LYONS, T. P. Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 10, p. 121-133.

KETCHUM, P. A. **Microbiology**: concepts and applications. New York: John Wiley & Sons, 1988.

KHAN, S. J.; ROSER, D. J.; DAVIES, C. M.; PETERS, G. M.; STUETZ, R. M. TUKCER, R.; ASHBOLT, N. J. Chemical contaminants in feedlot wastes: concentration, effects and attenuation. **Environment International**, v. 34, p. 839-859, 2008.

KIRSOP, B. E. Maintenance of yeasts. In: KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. (Ed.). **Maintenance of microorganisms and cultured cells**. 2nd ed. London: Academic Press, 1991. p. 161-181.

KYRIAKIS, S. C.; SARRIS, K.; KRITAS, S. K.; SAOULIDIS, K.; TSINAS, A. C.; TSILOYANNIS, V. K. The effect of salinomycin on the control of *Clostridium perfringens* type-A infection in growing pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, p. 355-359, 2010.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 627-637, 2009.

LALUCE, C.; LONGO, E.; SPONCHIADO, S. R. P.; CILLI, E. M.; GALLARDO, J. C. M.; MASIERO, M. O. C. A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia**: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2012. Cap. 7, p. 165-194.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LEGRAS, J. L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J. M.; KARST, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2091-2102, 2007.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D. S.; REIS, M. H. M.; REZENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 611-618, 2013.

LEIVE, L. A nonspecific increase in permeability in *Escherichia coli* produced by EDTA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 53, n. 4, p. 745-750, 1965.

LEJA, K.; BRODA, M. The occurrence and identification of microbiological contamination in fuel ethanol production. **Technologia Alimentaria**, v. 4, n. 8, p. 25-31, 2009.

- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 1, p. 1-43. (Biotecnologia industrial, v. 3).
- LIMA, K. C.; NEVES, A. A.; BEYRUTH, J. B.; MAGALHÃES, F. A. C.; UZEDA, M. Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of NAF, chlorhexidine and combined chlorhexidine with NAF mouth rinses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 158-161, 2001.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2005.
- LIU, Y. P.; ZHENG, P.; SUN, Z. H.; NI, Y.; DONG, J. J.; ZHU, L. L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresources Technology**, v. 99, p. 1736-1742, 2008.
- LOWBURY, E. J. L.; LILLY, H. A. Use of 4% chlorhexidine detergent solution (hibiscrub) and other methods of skin disinfection. **British Medical Journal**, v. 1, p. 510-515, 1973.
- LUCENA, B. T. L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS JUNIOR, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, 2010. doi:10.1186/1471-2180-10-298.
- LYONS, T. P. Alcohol production: a traditional process changing rapidly. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. p. ix-xi.
- MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, p. 157-165, 2007.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MADSHUS, I. H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. **Biochemical Journal**, v. 250, n. 1, p. 1-8, 1988.
- MAEKAWA, L. E.; CARVALHO, A. S.; CARDOSO, P. E.; XAVIER, A. C. C.; OLIVEIRA, L. D. Atividade antimicrobiana de EDTA gel associado a peróxido de hidrogênio sobre cepas clínicas de *Candida albicans*. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 12, p. 57-60, 2009.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 103-121, 1983.
- MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeast from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 337-343, 2008.

MILL, P. J. The nature of the interaction between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 61-68, 1964.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, M. R. **Parâmetros de fermentação e estabilidade genética de leveduras em ciclos sucessivos de fermentação**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MULTICLOR QUÍMICA LTDA (Brasil). F. Jorge. **Cloro oxigenado para tratamento de águas e seu respectivo processo de obtenção e aplicação**. PI0902987-7A2, 12 ago. 2009, 12 abr. 2011.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 351-379, 2011.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 20, p. 287-298.

NARENDRANATH, N. V.; BREY, S. Bacterial contamination and control. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 23, p. 337-356.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, p. 2239-2243, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4187-4192, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NG, C. H.; TAN, S; X.; PERRONE, G. G.; THORPE, G. W.; HIGGINS, V. J.; DAWES, I. W. Adaptation to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of NADPH-generating systems and the SKN7 transcription factor. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1131-1145, 2008.

NOBEL, J. G.; DIJKERS, C.; HOOIJEBERG, E.; KLIS F. M. Increased cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with dithiothreitol or EDTA. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2077-2084, 1989.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 20-25, 2007.

NOWAK, B.; VANBRIESEN, J. M. **Biogeochemistry of chelating agents**. Washington, DC: American Chemical Society, 2005. (ACS symposium series, 910).

OLIVA-NETO, P. de; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVA-NETO; P. de; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4'-Trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. **Bioresources Technology**, v. 63, p. 17-21, 1998.

OLIVA-NETO, P. de; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 10-14, 2001.

OLIVA-NETO, P. de; LUDIWIG, K. M.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, D. F.; LIMA, V. M. G. Contaminação na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2012. Cap. 14, p. 447-488.

OLIVA-NETO, P. de; DORTA, C.; LUDIWIG, K. M.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; SILVA, D. F. The brazilian technology of fuel ethanol fermentation: yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological development**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. p. 371-379. (Energy book series, 1).

OLIVA-NETO, P. de; LIMA, F. A.; SILVA, K. C.; SILVA, D. F.; CARVALHO, A. F. A.; SANTOS, C. Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus fermentum* from distilleries producing fuel bioethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 441-447, 2014.

OLIVEIRA, K. F. de. **Efeitos do ácido láctico adicionado sobre a produção de etanol em fermentações com reutilização de células a 34 °C**. 2008. 191 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantan; Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OVIDO, C.; RODRIGUEZ, J. EDTA: chelating agent under environmental scrutiny. **Química Nova**, v. 26, p. 901-905, 2003.

PELCZAR, J. M. Jr.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1.

PENG, J.; ZHANG, L.; GU, Z. H.; DING, Z. Y.; SHI, Z. Y. The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 128-134, 2012.

PENG, X.; SUN, J.; ISERENTANT, D.; MICHIELS, C. Flocculation and coflocculation of bacteria and yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 777-781, 2001.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentation using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 53, p. 45-53, 2012.

PIGGOT, R. Treatment and fermentation of molasses when making rum-type spirits. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 8, p. 75-84.

PILGRIM, C. Status of the worldwide fuel alcohol industry. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 2, p. 7-17.

PILLAI, J. S.; DANESH, N.; PUTTAIAH, E. T.; FIRISH, K. Microbial diversity in solid waste molasses of sugar industry. **International Journal of Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 723-730, 2011.

POWER, R. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 3, p. 23-32.

RAMOS, I. A.; LEITE, R. B.; MENEZES, K. M. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de *Lactobacillus casei*. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 107-110, 2012.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

ROBERGE, P. R. Environments. In: _____. **Handbook of corrosion and Engineering**. New York: McGraw-Hill, 1999. Chap. 2, p. 55-220.

RÜCKLE, L.; SENN, T. Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 108, p. 139-147, 2006.

RUSSEL, I. Understanding yeast fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chap. 9, p. 85-119.

SALMA, M.; ROUSSEAU, S.; SEQUEIRA-LE GRAND, A.; DIVOL, B.; ALEXANDRE, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0077600.

SANDERSON, W. R. Cleaner industrial processes using hydrogen peroxide. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 7, p. 1289-1304, 2000.

SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 151-154, 1993.

SCHEBB, N. H.; INCEOGLU, B.; AHN, K. C.; MORISSEAU, C.; GEE, S. J.; HAMMOCK, B. Investigation of human exposure to triclocarban after showering and preliminary evaluation of its biological effects. **Environmental Science Technology**, v. 45, p. 3109-3115, 2011.

SCHIMIDELL, W. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 8, p. 179-192. (Biotecnologia industrial, v. 2).

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as bio preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.

SEELEY, H. W. Jr.; VANDEMARK, P. J.; LEE, J. J. **Microbes in action**. 4th ed. New York: Freeman & Company, 1984.

SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. The response of brewing yeast to acid washing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, p. 347-354, 1989.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004.

SOUZA, C.; OLIVEIRA, K. F.; TREVISAN, H. C.; LALUCE, C. A strategy to compare yeast strains and improve cell survival in ethanol production processes above 30°C. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology**. Badajoz: Fomatex, 2007. p. 410-417. (Microbiology book series, v. 1).

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast**, v. 5, p. 487-496, 1989.

STRATFORD, M. Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. **Microbiology Letters**, v. 136, p. 13-18, 1996.

STRAVER, M. H.; KIJNE, J. W.; SMIT, G. Cause and control of flocculation in yeast. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 228-232, 1993.

STROPPIA, C. T.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G. E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**, v. 102, p. 78-82, 2000.

TABER, H. W. Antibiotic permeability. In: LEWIS, K.; SALYERS, A. A.; TABER, H. W.; WAX, R. G. (Ed.). **Bacterial resistance to antimicrobials**. New York: Marcel Dekker, 2008. Chap. 8, p. 193-208.

TAMEHIRO, N.; HOSAKA, T.; XU, J.; HU, H.; OTAKE, N.; OCHI, K. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6412-6417, 2003.

TANG, Y. Q.; AN, M. Z.; ZHONG, Y. L.; SHIGERU, M.; WU, X. L.; KIDA, K. Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactors and the flocculating yeast strain KF-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 41-46, 2010.

TECLU, D.; TIVCHEVA, G.; LAINGB, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1157-1165, 2009.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90. p. 819-828, 2001.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic acid and lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1616-1623, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento microbiano. In: _____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 6, p. 156-182.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

VENTURA, R. Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2009. p. 137-142.

VIEGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias da fermentação etanólica**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 1998.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482-487, 1999.

XU, D.; LI, Y.; LINDENBERGER, A. L.; LIU, H.; GU, T. Green chemicals for enhanced biofilm mitigation. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Microbial pathogens and strategies for combating them**. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. v. 1, p. 90-101.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 423-432, 2003.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 12-16, 1991.

ZANDYCKE, S. V. Yeast monitoring and identification. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 8, p. 95-100.

ZHANG, Z. Batch fermentation and fermenter design. In: INGLEDEW, W. M.; AUSTIN, G. D.; KELSALL, D. R.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham Univ. Press, 2009. Chap. 17, p. 229-257.

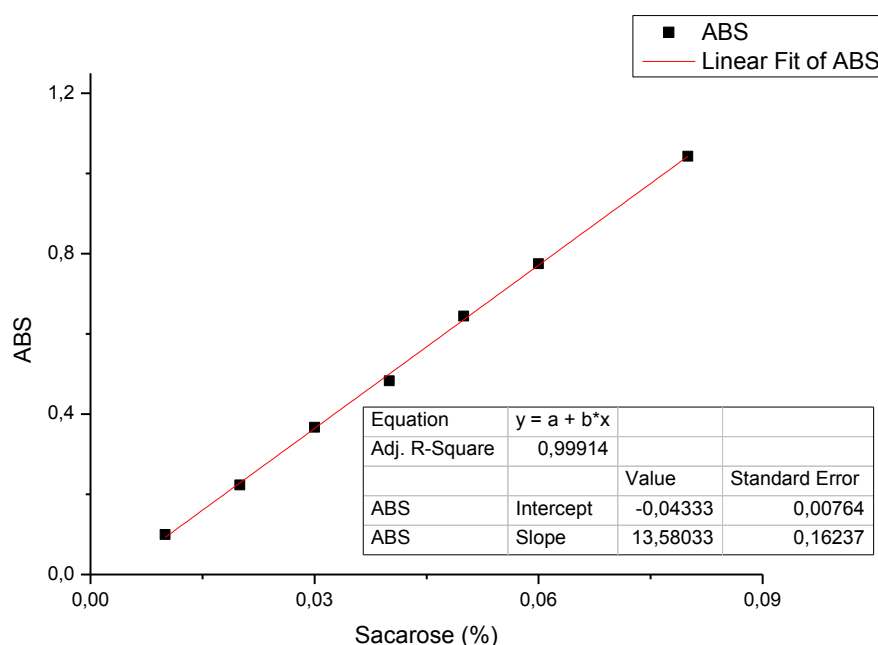
ZHU, C.; CHEN, Z.; YU, G. Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 495-502, 2013.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice 1 – Curva de calibração para dosagem de açúcares

Figura 40 - Curva padrão de calibração de sacarose 0,1% (m/v) para dosagens de açúcares redutores totais (ART) em função da absorbância (546nm), pelo método DNS em espectrofotômetro Biospectro mod. SP-22.



Apêndice 2 – ART dos melaços e mosto

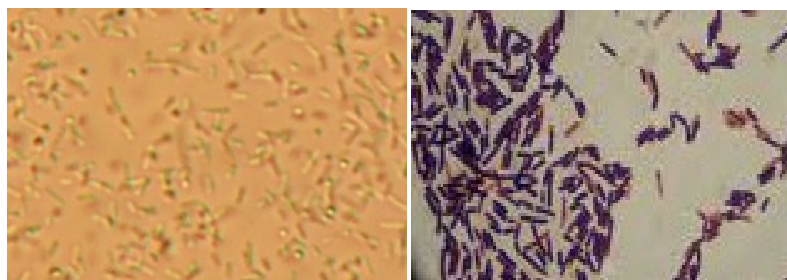
Tabela 21 - Concentrações de açúcares redutores totais (ART %) nos melaços e mosto 22° Bx, obtidas pelo método DNS, a partir da curva padrão obtida (Figura 40).

Amostra	Diluição 1:50*	Diluição 1:100*	ART médio
Padrão Sacarose 0,1%	0,109 ± 0,07	0,099 ± 0,02	0,104 ± 0,01
Mosto 22° Bx	16,27 ± 0,06	16,23 ± 0,01	16,25 ± 0,03
Melaço Guaíra	63,70 ± 0,03	62,82 ± 0,02	63,26 ± 0,62
Melaço Batatais	61,78 ± 0,01	59,80 ± 0,01	60,79 ± 1,40
Melaço Guarani	52,06 ± 0,04	49,25 ± 0,02	50,65 ± 1,99

*Médias de triplicatas

Apêndice 3 – Imagens de *Lactobacillus ssp.* Isolado de fermentação industrial

Figura 41 - Bactéria láctica isolada, parcialmente identificada como *Lactobacillus ssp.* de isolado de fermentação industrial vista ao microscópio ótico (aumento 1000 x) em suspensão (A) e em coloração de Gram (B).



A

B

Fonte: Próprio autor

Apêndice 4 – Dados brutos submetidos as análises estatísticas

Tabela 22 - Viabilidade de levedura em fermentações contendo diferentes concentrações de ácido láctico e ácido sulfúrico, referente às Figuras 10 e 11.

Trat./Ciclo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AS 0,6%	97,27	96,91	96,67	96,16	95,86	96,94	96,56	95,68	94,70	93,39
AS 1,2%	96,31	95,56	94,70	94,35	94,21	95,57	93,35	91,67	89,34	87,43
AS 1,8%	94,95	93,27	92,24	91,02	90,25	92,80	90,58	87,81	84,63	81,53

Tabela 23 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com biocida TCC + CBA, em comparação com ácido sulfúrico, referente à Figura 22.

Trat./ Ciclo	1	2	3	4	5
TCC + CBA 50	513	1.243	1.864	2.212	3.240
TCC + CBA 50	513	1.237	1.945	2.266	3.326
TCC + CBA 80	513	1.150	1.723	2.050	2.690
TCC + CBA 80	513	1.162	1.790	2.092	2.636
TCC + CBA 100	513	980	1.687	1.622	1.750
TCC + CBA 100	513	976	1.572	1.591	1.895

Tabela 24 - Concentração de ácido láctico em fermentações tratadas com a maitenina, extrato de lúpulo, e ácido sulfúrico, referente à Figura 24.

Tratamento	1	2	3	4	5	6
Maitenina	477	651	404	387	453	636
Maitenina	469	674	413	406	467	652
Betabio	477	670	396	458	703	915
Betabio	469	693	387	463	714	930
Ac. Sulf.	477	668	435	695	872	1216
Ac. Sulf.	469	654	447	670	891	1198

Tabela 25 - Concentração de etanol em fermentações tratadas com a maitenina (MT), extrato de lúpulo (BB), referente à figura 25.

Prod. Ciclos	1	2	3	4	5
MT	6,58	6,60	6,33	6,21	5,78
MT	6,75	6,72	6,38	6,32	6,01
BB	6,47	6,76	6,24	5,63	5,49
BB	6,50	6,81	6,27	6,56	5,53

Tabela 26 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com *L. fermentum*, tratadas com salinomicina (SL) e monensina (MN), referente à Figura 27.

Prod./Ciclos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SL	586	783	378	323	315	331	398	453	569	498
SL	586	790	385	331	304	325	380	462	548	557
MN	586	775	243	165	140	152	178	222	343	183
MN	586	786	252	178	153	160	169	240	355	203

Tabela 27 - Concentração de ácido láctico em fermentações contaminadas com *Lactobacillus ssp.*, tratadas com salinomicina e monensina, referente à Figura 31.

Prod./Ciclos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SL	495	653	271	265	183	197	229	321	460	282
SL	495	678	280	238	204	209	241	298	416	264
MN	495	680	694	516	560	659	760	724	654	722
MN	495	674	673	510	535	645	802	671	690	708

Tabela 28 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com *L. fermentum*, tratadas com salinomicina (SL) e monensina (MN), referente à Figura 28.

Prod./Ciclos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SL	6,45	6,59	6,68	6,73	6,70	6,27	6,50	6,57	6,75	6,77
SL	6,51	6,54	6,62	6,70	6,69	6,25	6,53	6,64	6,73	6,70
MN	6,60	6,96	7,04	7,22	7,43	7,24	6,93	6,75	6,89	6,90
MN	6,57	6,80	7,13	7,25	7,51	7,28	6,90	6,77	6,94	7,01

Tabela 29 - Concentração de etanol em fermentações contaminadas com *Lactobacillus ssp.*, tratadas com salinomicina e monensina, referente à Figura 32.

Prod./Ciclos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SL	6,39	6,80	6,91	7,14	7,05	6,92	6,84	6,95	7,09	7,12
SL	6,45	6,72	6,80	6,95	7,00	6,56	6,71	6,83	6,98	7,03
MN	6,25	6,42	6,50	6,31	5,89	6,15	6,26	6,17	6,03	6,00
MN	5,89	6,32	6,57	6,45	6,02	5,97	6,1	6,05	5,86	6,14