

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E ANTIMICROBIANOS A  
BASE DE LÚPULO NO CONTROLE DA INFECÇÃO BACTERIANA EM  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**JOSIMARA LACERDA PRADO**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Energia na  
Agricultura)

**BOTUCATU – SP**

**Janeiro – 2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E ANTIMICROBIANOS A  
BASE DE LÚPULO NO CONTROLE DA INFECÇÃO BACTERIANA EM  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**JOSIMARA LACERDA PRADO**

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Energia na  
Agricultura)

BOTUCATU – SP

Janeiro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Prado, Josimara Lacerda, 1980-  
P896u      Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica / Josimara Lacerda Prado. - Botucatu : [s.n.], 2014  
            vii, 45 f. : tabs., ils. color., fots. color.

            Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2014  
            Orientador: Waldemar Gastoni Venturini Filho  
            Inclui bibliografia

            1. Álcool. 2. Cana-de-açúcar. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico. I. Venturini Filho, Waldemar Gastoni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

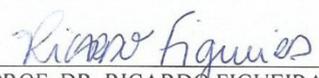
TÍTULO: "USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E ANTIMICROBIANOS A  
BASE DE LÚPULO NO CONTROLE DA INFECÇÃO BACTERIANA EM  
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA"

ALUNA: JOSIMARA LACERDA PRADO

ORIENTADOR: PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. RICARDO FIGUEIRA

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. ANDRESSA M. PARENTE NOGUEIRA

Data da Realização: 28 de janeiro de 2014.

*“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito [...].  
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.*  
*(Marthin Luther King)*

**Dedico**

Aos meus pais, Antonio e Amélia e ao meu amor Jackson.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família, meus pais Antonio e Amélia, pela grandiosa força concedida ao longo de mais uma jornada.

Ao Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho, meu orientador, pelos ensinamentos, delicadeza e confiança a mim depositada.

À empresa em que trabalho, pelos dados fornecidos e pela disponibilização de meus horários.

Aos membros da banca examinadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andressa Nogueira e ao Prof.Dr. Ricardo Figueira pelas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Luciana Trevisan, Profa. Dra. Martha Mischan pela ajuda com a estatística deste trabalho.

Ao professor Bruno, pela ajuda com o inglês.

Ao meu amor e companheiro Jackson Naves por me acompanhar nesta jornada e compreender as minhas ausências.

Agradeço aos meus queridos amigos Paulo Affonso, Gedaiás Silva e minhas queridas amigas Milena Mileski, Mariana Wagner, Gisele Souza e todos os demais amigos do mestrado, pelo apoio e ajuda nos momentos que mais precisei.

Ao programa Energia na Agricultura, a todos os funcionários e professores que tive o prazer de conviver.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	VII
CAPÍTULO I.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.2 Revisão bibliográfica.....	7
1.2.1 Microbiologia da fermentação alcoólica.....	7
1.2.2 Leveduras de processo.....	9
1.2.3 Taxonomia.....	9
1.2.4 Citologia.....	10
1.2.5 Reprodução.....	14
1.2.6 Metabolismo.....	15
1.2.7 Bactérias contaminantes.....	20
1.2.8 Formas de contaminação bacteriana nos processos fermentativos.....	21
1.2.9 Controle da fermentação.....	22
1.2.10 Antimicrobianos.....	23
1.2.11 Antimicrobianos convencionais.....	24
1.2.12 Antimicrobianos à base de lúpulo.....	25
1.3 REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO II.....	33
2 INTRODUÇÃO.....	34
2.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1.1 Planejamento experimental.....	38
2.1.2 Método de contagem em placas de bactérias láticas.....	39
2.1.3 Cálculo da taxa de redução populacional (TRP).....	39
2.1.4 Análise estatística.....	40
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.3 CONCLUSÕES.....	42
2.4 REFERÊNCIAS.....	43

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Páginas</b>
Tabela 2.1 Análise de variância para as taxas de redução populacional dos antimicrobianos convencionais (Kamorán WP, Alcapen 1030, Corstan) e antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e BetaBio.....	40
Tabela 2.2 Teste de Tukey da taxa de redução populacional (TRP) de bactérias lácticas, durante a fermentação alcoólica na safra de 2008/2009, para antimicrobianos convencionais (Kamorán WP, Alcapen 1030, Corstan) e na safra 2011/2012, para os antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e BetaBio.....	41



# CAPÍTULO I

## USO DE ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E ANTIMICROBIANOS A BASE DE LÚPULO NO CONTROLE DA INFECÇÃO BACTERIANA EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Autor: Josimara Lacerda Prado

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de antibióticos convencionais em relação aos antimicrobianos à base de lúpulo, em escala de produção industrial de bioetanol. A comparação foi feita por meio de cálculo da redução populacional de bactérias lácticas em dois ciclos consecutivos de fermentação. O experimento teve cinco tratamentos (três antibióticos convencionais: Kamoran WP, Corstan e Alcapen 1030, e dois antimicrobianos à base de lúpulo: BetaBio e IsoStab). As amostras foram coletadas na dorna de fermentação. Para quantificar a população inicial de bactérias lácticas, foi coletada amostra no final do processo fermentativo (vinho) antes do tratamento com antibióticos ou lúpulo, e para determinar a população final, a coleta das amostras foi realizada ao final do processo fermentativo (vinho) após o tratamento com esses produtos. O experimento foi inteiramente casualizado e a análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) para as variáveis transformadas pela equação  $y' = \sqrt[2]{\log(y + 1)}$ . Após a transformação dos dados foi aplicado o teste de Levene para verificar a aderência dos dados à distribuição normal, e as médias comparadas

por meio do teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Os resultados mostraram que os antimicrobianos a base de lúpulo (IsoStab e Beta Bio) podem substituir os antibióticos convencionais (Kamoran, Alcapen e Corstan), pois não houve diferença estatística entre os tratamentos.

---

Palavras-chave: álcool, cana, bactérias lácticas, contaminantes.

USE OF CONVENTIONAL ANTIBIOTICS AND HOP-BASED ANTIMICROBIALS IN  
CONTROL OF BACTERIAL INFECTION IN ALCOHOLIC FERMENTATION

Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências  
Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: Josimara Lacerda Prado

SUMMARY

The objective of this work was to compare the efficiency of conventional antibiotics in relation to hop-based antimicrobials, in industrial-scale production of bioethanol. The comparison was made by calculating the lactic acid bacteria population reduction in two consecutive fermentation cycles. The experiment used five treatments (three conventional antibiotics: Kamoran WP, Corstan and Alcapen 1030, and two hop-based antimicrobials: BetaBio and IsoStab). The samples were collected in the fermentation vat. In order to quantify the initial lactic acid bacteria population, a sample was collected at the end of the fermentation process (wine) before the treatment with antibiotics or antimicrobials, and to determine the final population, the sample collection happened at the end of the fermentation process (wine) after the treatment with antibiotics or antimicrobials. The experiment was completely randomized and the statistical analysis was performed through analysis of variance (ANOVA) for the transformed analysis  $y' = \sqrt{\log(y + 1)}$ . After the data transformation, Levene's test was applied to verify the adherence of the data to the normal distribution, and the averages were compared through Tukey's test at 5% probability. The results showed that the hop-based antimicrobials

(IsoStab and BetaBio) can be used instead of the conventional antibiotics (Kamoran, Alcapen and Corstan), since there was no statistical difference between the treatments.

---

**Keywords:** alcohol, sugar cane, lactic acid bacteria, contaminants.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol no Brasil é feita por via fermentativa, podendo ocorrer a competição entre os microrganismos de processo (leveduras) com os contaminantes da fermentação alcoólica (bactérias) que utilizam o substrato (sacarose) para o seu metabolismo. As bactérias produzem substâncias indesejáveis, como ácidos orgânicos, sendo que o principal deles é o ácido lático.

No processo fermentativo, o grupo de bactérias mais importante é o lático (Gram-positivas).

A infecção bacteriana durante o processo fermentativo diminui o rendimento da produção de álcool, devido ao consumo da sacarose pelas bactérias. Além disso, pode promover a formação de goma, floculação do fermento, inibição do crescimento e queda da viabilidade das leveduras, causando prejuízos ao processo. Outro aspecto negativo é a queda de produtividade da fermentação.

O método adotado pelas usinas sucroalcooleiras para o controle das bactérias é a adição de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo. Os antibióticos deixam resíduos no fermento após a sua secagem, o qual é utilizado como matéria-prima no preparo de rações para animais ou ingrediente de alimentos para humanos.

As usinas que secam o excedente de leveduras, para que não ocorra a ingestão desses antibióticos por humanos ou animais domésticos, adotaram o uso de

substâncias naturais extraídas da planta do lúpulo que já eram utilizadas em processos de produção de cerveja.

Para atender às inúmeras exigências do mercado consumidor de levedura seca, que demanda produtos que não possuam resíduos de antibióticos, as usinas sucroalcooleiras iniciaram a eliminação do uso dos antibióticos convencionais em seu processo fermentativo. Entretanto, as destilarias não poderão deixar de usar produtos químicos para o controle da infecção bacteriana, devido aos inúmeros prejuízos que as bactérias causam no processo fermentativo.

Sendo assim, as indústrias produtoras de antimicrobianos naturais, com grau alimentício, desenvolveram ou adaptaram seus produtos, antes utilizados em indústrias cervejeiras, para as indústrias alcooleiras. Os antimicrobianos naturais são produtos extraídos da flor de lúpulo e diferenciam-se dos antibióticos convencionais em sua função química e modo de ação.

O presente trabalho teve por objetivo comparar o potencial antibacteriano dos ácidos de lúpulo com os antibióticos convencionais no controle de populações de bactérias lácticas durante o processo fermentativo, em uma usina sucroalcooleira do interior do estado de São Paulo.

## 1.2 Revisão bibliográfica

### 1.2.1 Microbiologia da fermentação alcoólica

A utilização de microrganismos na transformação dos elementos da matéria acontece desde a antiguidade. Através da observação do ambiente, o ser humano detectou que certos processos se desenvolviam devido à presença de microrganismos no meio. O conhecimento de que microrganismos modificam os substratos, possivelmente foi feita ao acaso, como ao notar que a carne seca resiste à deterioração; ou ao deixar o leite azedar para retirar o coalho para fabricar queijo; ou que ao secar os grãos antes da estocagem era possível evitar o aparecimento de fungos. Desde então, foi possível entender melhor e utilizar esses microrganismos a fim de atender as nossas necessidades (TORTORA et al., 2006).

O cultivo de microrganismos pode ocorrer através de substratos com valor comercial baixo, podendo até mesmo, ser resíduos de outros processos. A

produção do etanol e outros solventes orgânicos, pode ocorrer através da utilização de resíduos como fonte de carbono ou nitrogênio, como por exemplo, o bagaço de cana, considerado de grande importância para indústria alcooleira. Considera-se viável no cultivo de microrganismos, porém, para o cultivo de células animais isso não torna-se possível pois, devido às várias exigências da célula, há o encarecimento do processo de cultivo de células animais (NAJAFPOUR, 2007).

O termo “fermentação” pode apresentar significados distintos perante o setor que o utiliza. De modo genérico, o termo significa qualquer processo de cultivo microbiológico que ocorre com ou sem ar. Bioquimicamente, significa o processo metabólico onde o substrato orgânico atua como doador e como receptor final de elétrons, ocorrendo em condições anaeróbias, mas sem a utilização de uma cadeia respiratória, como acontece na respiração anaeróbia. (TORTORA et al., 2006).

O termo “fermentador” também apresenta discordância devido a conceitos. Inicialmente, foi utilizado para descrever os tanques onde ocorria o cultivo. Devido a maior porção dos cultivos realizados nesses tanques serem de forma aeróbica, um novo nome foi proposto para não contradizer a definição bioquímica de fermentação. A nova nomenclatura “biorreator” passou a ser utilizada para descrever o local onde eram realizados cultivos de microrganismos em condições aeróbicas e anaeróbicas (NAJAFPOUR, 2007).

O etanol ou simplesmente álcool, pode ser obtido basicamente de duas formas distintas: por fermentação alcoólica ou por síntese química a partir do petróleo (TORTORA et al., 2006)

A levedura e outros microrganismos fermentam a glicose em etanol e gás carbônico (MAHAN; MYERS, 2002).

Nesse processo, a glicose é convertida em piruvato pelas reações bioquímicas da glicólise e o piruvato é convertido em etanol e gás carbônico em dois passos, sendo o primeiro, a descarboxilação do piruvato, catalisada de forma irreversível através da enzima piruvato descarboxilase. Esta reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A tiamina pirofosfato é uma coenzima firmemente ligada ao piruvato descarboxilase que demanda de  $Mg^{2+}$ . No segundo passo, o acetaldeído é reduzido a etanol pois ocorre a ação da enzima álcool desidrogenase por meio da oxidação do NADH, que é derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (MAHAN; MYERS, 2002).

### 1.2.2 Leveduras de processo

Os processos fermentativos com maiores rendimentos são aqueles que utilizam leveduras selecionadas para obtenção do etanol (FIGUEIREDO, 2012).

As leveduras de processo foram selecionadas em função de suas características durante a fermentação, como elevados rendimento e produtividade, tolerância ao etanol, baixa produção de espuma e resistência à floculação (MEIRELLES, 2006).

O uso de linhagens selecionadas permite maior uniformidade de produtos mesmo em safras distintas (CABRINI; GALLO, 1998), pois há alterações de clima, solo, variedades de cana, alterações de processo e outros fatores que contribuem para alterações na produção do álcool.

*Saccharomyces* é o gênero de maior predominância nos processos fermentativos. No Brasil, a espécie que apresenta a melhor adaptação às condições industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*. Também existem outras espécies do mesmo gênero *Saccharomyces* e outros gêneros isolados em destilarias no Brasil, como por exemplo, *S. ellysoideus*, *S. fragilis*, *S. coreanus*, *S. bayanus*, *S. chevalieri*, *S. pretoriensis* (*Torulaspora pretoriensis*) e *Schizosaccharomyces pombe*, entre outras (CINELLI, 2012).

As linhagens que existem são muito variadas e seu desempenho é diferenciado dependendo da região onde é utilizada no Brasil. Encontram-se denominadas comercialmente como linhagens industriais de *S. cerevisiae*: CAT-1, PE-1, PE-2, SA-1, FT858L, BG-1, dentre outras (FARREL, et al., 2006).

### 1.2.3 Taxonomia

Leveduras são microrganismos também conhecidos como fungos unicelulares. Estão descritas cerca de 600 espécies que formam 80 gêneros (TRABULSI et al., 2004).

De modo geral, as leveduras são capazes de sobreviver a condições mais restritas de umidade que as bactérias, porém são mais sensíveis que os bolores quanto à umidade necessária para seu desenvolvimento. Sua faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento é de 25°C a 30°C. Tem como característica, o crescimento favorecido em meio ácido, multiplicando-se melhor em aerobiose (com exceção das leveduras

fermentadoras que se multiplicam melhor em anaerobiose) usam açúcar como fonte de energia (MAHAN; MYERS, 2002).

As principais são representadas pelas espécies: *Saccharomyces cerevisiae* (panificação e cervejaria), a *Kluyveromyces marxianus* (soro leite), *Shizosaccharomyces pombe* (modelo científico), *Cryptococcus neoformans* (patógeno humano e causa várias micoses sistêmicas), *Candida albicans* (um patógeno humano que causa micoses superficiais e profundas), *Blastomyces* spp (micoses profundas sistêmicas, invasivas de órgãos e tecidos), *Paracoccidioides brasiliensis* (micoses superficiais e profundas) (TORTORA et al., 2006).

A classificação taxonômica de microrganismos, incluindo a levedura, inicialmente, baseava-se nas características macromorfológicas, ou seja, eram consideradas as características de colônia, além de considerar a forma da célula no microscópio. Informações como características fisiológicas e bioquímicas também eram observadas, mas considerando as técnicas atuais de biologia molecular, apresentam desvantagens e incertezas (MATIENZO, 2002).

O primeiro sistema de identificação que descreve muitas das espécies conhecidas nos dias atuais foi descrito por Emil Christian Hansen em 1896. Emil considerou as características fisiológicas, habilidades de fermentação da glicose, demais açúcares e compostos nitrogenados para estabelecer o procedimento para classificação (TORTORA et al., 2006).

As leveduras alcoólicas pertencem ao domínio Eukaryota, reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae (ALCARDE et al., 2007).

#### 1.2.4 Citologia

As leveduras são amplamente encontradas na natureza, como no solo, nas cascas de frutas, nas superfícies de órgãos dos vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados (STECKELBERG, 2011).

Possuem a forma esférica, ovoide, globosas ou alongadas. Apresentam de 1 a 8 µm de largura e 3 a 15 µm de comprimento, variando de acordo com idade e ambiente (ALCARDE et al., 2007).

Estruturalmente, a levedura é composta principalmente por parede celular, membrana citoplasmática, citoplasma, organelas e núcleo (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

A parede celular é uma estrutura formada principalmente de polissacarídeos glicanos (entre 30 a 34%) e manano (cerca de 30%), havendo também lipídeos com concentrações entre 8,5 a 13,5%, além de 6 a 8% de proteínas. É rígida, dando forma e resistência mecânica à célula. A parede celular sempre será mais fina em células jovens quando comparadas às células mais antigas (ALCARDE et al., 2007).

A parede celular inicialmente confere proteção à célula por ser uma barreira física (ALCARDE et al., 2007), principalmente contra o rompimento da célula quando há excesso de turgor. Porém é uma estrutura que permite passagem de moléculas até atingirem a membrana celular.

Os polissacarídeos e proteínas presentes na estrutura da parede mantêm a estabilidade eletroquímica, permitindo a passagem das moléculas e não apresentam seletividade neste transporte. A interação dos polissacarídeos com as proteínas são importantes na regulação da floculação desses microrganismos (KHALAF, 2009).

A membrana citoplasmática ou membrana plasmática está localizada entre a parede celular e o citoplasma. Inicialmente, retém e limita o conteúdo celular. Quimicamente é constituída predominantemente de fosfolipídios dispostos em dupla camada, representando cerca de 50% de seus constituintes (KURTZMAN; FELL, 1998). Outro componente são as proteínas, substância funcional na membrana. As proteínas localizam-se entre a camada de fosfolipídios, portanto, estrutura de composição lipoproteica. Da mesma forma, todas as membranas de organelas presentes na célula da levedura como as mitocôndrias, retículos e aparelho de Golgi são constituídas por fosfolipídios. As proteínas possuem papel importante na seletividade da membrana, mas também desempenham funções de enzimas e receptor de membrana ao reconhecer substâncias seja do meio interno ou externo da levedura, para permitir ou não sua interação (BAMFORTH, 2005).

A seletividade da membrana citoplasmática é a capacidade de permitir a passagem de determinadas substâncias e impedir de outras para o interior ou para o exterior da célula. Moléculas neutras, pequenas e lipossolúveis não encontram dificuldade para atravessar a membrana citoplasmática enquanto que, moléculas grandes, íons e moléculas insolúveis em gordura precisam de mecanismos específicos para atingir o

lado oposto da membrana em que estão. A entrada e saída de água na célula da levedura ocorrem através das regras da osmose (ALCARDE et al., 2007).

Outra estrutura que compõe a célula de levedura é o citoplasma. Ele está localizado entre membrana celular e membrana nuclear. Apresenta grande variedade de componentes responsáveis pelas atividades da célula. O citosol, substância gelatinosa que acomoda as organelas citoplasmáticas, é composto por água em sua maioria, além de íons e macromoléculas solúveis, entre elas enzimas, carboidratos, sais e proteínas, substâncias essenciais ao funcionamento de todas as organelas e do núcleo (FERNANDES, 2007).

No citoplasma das leveduras existem organelas de forma membranosa ou microtubular, as do tipo membranosas são representadas pelos retículo endoplasmático, ribossomos, complexo de Golgi, lisossomos, vacúolos e mitocôndria. As organelas do tipo microtubulares são representadas pelos centríolos (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

A organela denominada retículo endoplasmático, é um sistema de membranas constituído pela invaginação da membrana plasmática. O retículo endoplasmático está em contato com o citoplasma externamente e internamente, possui um espaço denominado lúmen que está isolado do citoplasma (FERNANDES, 2007).

O retículo endoplasmático é formado por túbulos e sacos achatados, e pode ser denominado retículo endoplasmático rugoso, quando apresenta em sua superfície externa, ribossomos aderidos, porém quando está livre de ribossomos em sua superfície, denomina-se retículo endoplasmático liso ou agranular (ALCARDE et al., 2007).

O retículo endoplasmático rugoso está associado à síntese proteica. As principais funções do retículo endoplasmático são transportar e armazenar substâncias, facilitar reações químicas do citoplasma devido sua associação de membranas e enzimas e, sintetizar lipídeos como triglicerídeos, fosfolípidos e esteroides (FERNANDES, 2007).

Os ribossomos estão soltos ou aderidos à membrana no retículo endoplasmático. Quando estão agrupados em fileiras, presos por uma fita de RNA mensageiro denomina-se polissomo ou polirribossomo. Possuem em sua composição RNA ribossômico e proteínas e são formados no interior do nucléolo (KURTZMAN; FELL, 1998).

O complexo de Golgi ou aparelho de Golgi está localizado entre o retículo endoplasmático e as vesículas secretoras que se destacam dos dictiossomos. O dictiossomo é um empilhamento de sáculos e vesículas achatadas. O complexo de Golgi é o conjunto de dictiossomos. Sua função na levedura está relacionada com o armazenamento, empacotamento e exportação de substâncias (FERNANDES, 2007).

Os lisossomos são vesículas formadas pelo complexo de Golgi. Possuem em seu interior, enzimas digestivas que estão relacionadas com a digestão intracelular (FERNANDES, 2007).

As enzimas contidas nos lisossomos são produzidas pelo retículo endoplasmático rugoso e são transferidas ao complexo de Golgi que produzem as vesículas envolvendo a enzima. Após a levedura inserir em seu interior qualquer substância, entre elas as moléculas de glicose, forma-se um vacúolo alimentar. O lisossomo é expelido e se funde ao vacúolo possibilitando o contato da enzima com a molécula a ser digerida. Esta digestão celular pode ocorrer com moléculas inseridas na célula ou mesmo moléculas produzidas pelo metabolismo da levedura (KURTZMAN; FELL, 1998).

A organela denominada mitocôndria está relacionada a respiração celular. Apresentam forma cilíndrica e possuem dupla membrana sendo, a membrana externa lisa e a interna contendo pregas, denominadas cristas mitocondriais (ALCARDE et al., 2003). A membrana externa é responsável pelo controle de entrada e saída de substâncias. Na membrana interna, ocorre a cadeia transportadora de elétrons. No seu interior, há a matriz mitocondrial, cavidade interna preenchida por substância viscosa que comporta várias enzimas envolvidas com a respiração celular, DNA e RNA, além de ribossomos (ALCARDE et al., 2003).

O núcleo é definido como o centro de controle das atividades celulares. Contém o material genético da levedura e participa ativamente da divisão celular através da produção de RNA e da síntese de proteínas. Como toda célula eucarionte, o núcleo da levedura possui carioteca, suco nuclear, nucléolo e cromatina (KURTZMAN; FELL, 1998).

A carioteca é a membrana que delimita o material nuclear. É constituída por dupla camada e quimicamente semelhante à membrana plasmática, lipoproteica. O lado externo da carioteca, face voltada para o citoplasma, pode apresentar ribossomos. Há diversos poros presentes na totalidade da carioteca. Estes poros permitem a

passagem de moléculas como, por exemplo, m-RNA para atuar na formação de proteínas e duplicação do DNA (FERNANDES, 2007).

O suco nuclear contém a cromatina e os nucléolos, sendo conhecido como nucleoplasma. O suco nuclear é uma substância consistente, um gel proteico e preenche o núcleo. Devido à presença de água e diferentes enzimas, diversas reações do metabolismo celular são favorecidas. A comunicação do suco nuclear com o citoplasma ocorre através de poros existentes na carioteca (KURTZMAN; FELL, 1998).

Os nucléolos, estruturas esféricas, não possuem membrana. Quimicamente sua constituição é principalmente de RNA ribossômico associado à proteínas. Atua nos primeiros estágios da divisão celular (ALCARDE et al., 2003).

A cromatina é o material genético que aparece em forma de um conjunto de filamentos no interior da celular e é visível apenas na fase da divisão celular chamada interfase (parte da divisão celular onde o material genético duplica) e com técnicas de coloração no microscópio se mostra como um emaranhado de filamentos individualizados (KURTZMAN; FELL, 1998).

### 1.2.5 Reprodução

As leveduras apresentam duas formas de reprodução: sexuada e assexuada (STECKELBERG, 2011).

A forma mais comum de reprodução da levedura alcoólica é a assexuada, realizada por gemulação ou brotamento. Esse tipo de reprodução ocorre com o surgimento de uma protuberância na parede da célula-mãe que aumenta de tamanho com o decorrer do tempo, até atingir o tamanho semelhante à célula original. Em seguida, a parede de ambas as células (mãe e filha) se fecham, formando uma dupla camada, completando assim, o brotamento. Neste caso, surgirá uma cicatriz permanente na célula-mãe e neste local não haverá mais brotamento (STECKELBERG, 2011).

A formação de um broto ocorre aproximadamente a cada 2 horas. Esta estratégia utilizada pelas leveduras não permite variação genética entre as células-mães e células-filhas (STECKELBERG, 2011).

Para que a variabilidade genética ocorra, a levedura utiliza a reprodução sexuada. A produção deste tipo de esporo se faz por meio de meiose (processo redutor e formador de gametas), ou seja, há a formação de indivíduos com metade da

informação gênica ( $n$  – haploide) que, futuramente, irão se fundir novamente, formando um novo indivíduo com a carga gênica completa ( $2n$  – diploide) (STECKELBERG, 2011).

A presença de esporos sexuais ocorre conforme a atividade das leveduras. Podem ocorrer na natureza e também na dorna de fermentação industrial. As leveduras dispõem deste mecanismo por uma questão adaptativa ao meio e de sobrevivência (STECKELBERG, 2011).

### 1.2.6 Metabolismo

As leveduras alcoólicas apresentam metabolismo respirofermentativo, isto é, respiram e fermentam durante o seu cultivo em substratos açucarados. Durante o processo de fermentação de leveduras ocorre liberação de energia sem a participação de oxigênio. Essa liberação acontece após várias reações enzimáticas que degradam uma molécula orgânica, no caso o açúcar (glicose), em compostos mais simples com liberação de energia (MARTINS, 2004).

No processo de glicólise, cada molécula de glicose é desdobrada em duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico), com liberação de hidrogênio e energia, por meio de várias reações químicas. O hidrogênio combina-se com moléculas transportadores de hidrogênio (NAD), formando um composto reduzido (NADH) (ZAGO et al., 2005).

As Figuras 1.1 e 1.2 mostram o processo da glicólise que ocorre nas leveduras alcoólicas.

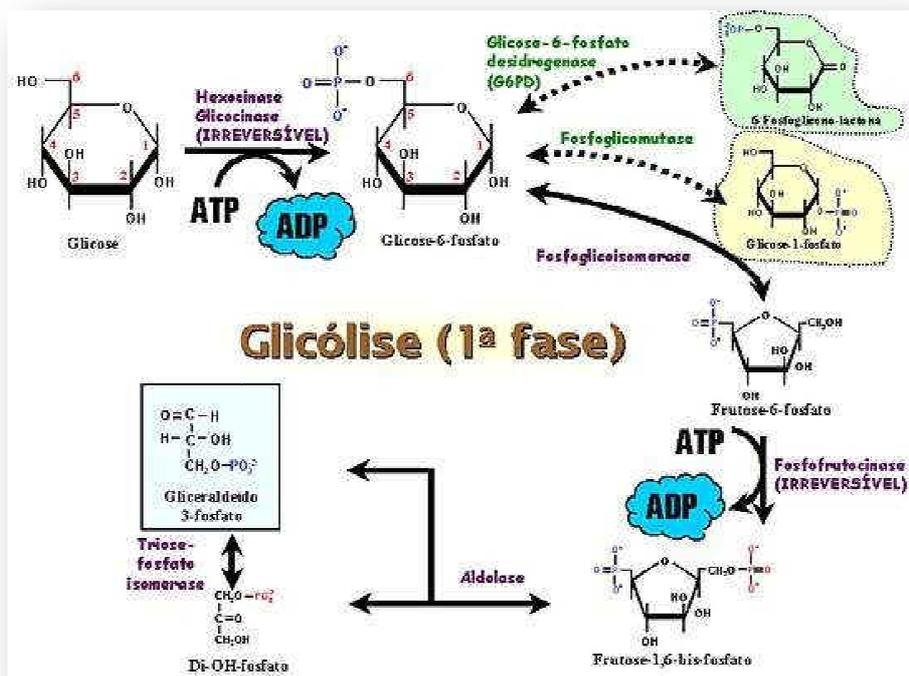


Figura 1.1 Glicólise fase I. Fonte: Nelson e Cox (2008).

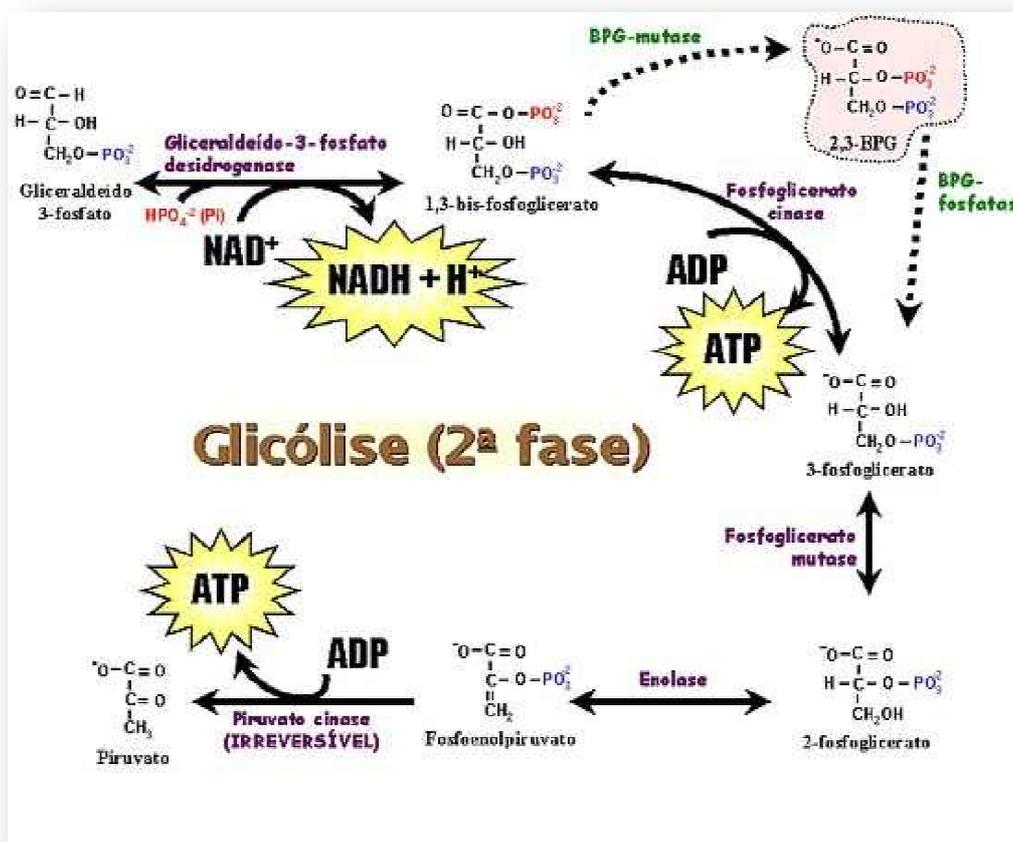
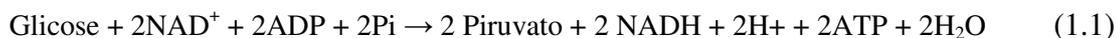


Figura 1.2 Glicólise fase II. Fonte: Nelson e Cox (2008).

A Equação 1.1 mostra o processo de glicólise ou quebra da glicose:

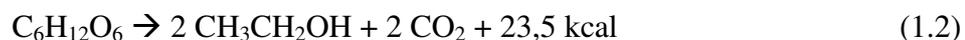


A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que leva a transformação de açúcares em etanol e gás carbônico (CO<sub>2</sub>), via reações catalisadas por enzimas. Este processo ocorre no citoplasma das células de leveduras com o objetivo de produzir energia (ATP), a qual é empregada na realização de suas atividades fisiológicas, tais como o crescimento. Assim, o etanol é um subproduto desse processo de geração de energia (LIMA et al., 2001).

Este processo celular rende ao microrganismo um saldo energético muito baixo, pois a conversão de açúcar em álcool e CO<sub>2</sub> promove a produção de uma pequena quantidade ATP, molécula utilizada em todos os processos metabólicos da levedura com gasto energético (BASSO, 2007).

Este processo se dá pela conversão de ácido pirúvico presente no meio intracelular que é ionizado na forma de piruvato com produção de um intermediário reduzido NADH. O piruvato sofre descarboxilação (perda de um átomo de C na forma de CO<sub>2</sub>) pela ação da enzima piruvato descarboxilase, resultando o aldeído acético. Através da enzima álcool desidrogenase, o aldeído acético é reduzido, por meio da oxidação do NADH para NAD<sup>+</sup>, havendo a formação do etanol (BASSO, 2007).

A equação geral da fermentação alcoólica é mostrada na Equação 1.2.



A capacidade de sobreviver em condições anaeróbias dos microrganismos tem seu preço. A geração de energia por via anaeróbia é 19 vezes menos eficiente na formação de moléculas de ATP quando comparada à via metabólica aeróbica, pois, nas fermentações para obtenção de etanol, a levedura gera apenas 2 ATP por molécula de glicose enquanto que, na presença de oxigênio, o saldo final de ATP é de 38 por molécula de glicose (BASSO, 2007).

O Quadro 1.1 mostra o balanço energético da glicólise e respiração das leveduras.

Quadro 1.1 Balanço energético da glicólise, síntese e ciclo de Krebs.

Balanço Energético		
Etapa	Ocorrência	Rendimento (em moléculas de ATP)
Glicólise	Formação direta de ATP	2
	Formação de 2 NADH <sub>2</sub> (x 3 ATP na cadeia respiratória)	6
Síntese da Acetil-CoA	Formação de 2 NADH <sub>2</sub> (x 3 ATP na cadeia respiratória)	6
Ciclo de Krebs	Formação direta de ATP	2
	Formação de 6 NADH <sub>2</sub> (x 3 ATP na cadeia respiratória)	18
	Formação de 2 FADH <sub>2</sub> (x 2 ATP na cadeia respiratória)	14
<b>Total</b>		<b>38</b>

Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2008).

As reações químicas que ocorrem na respiração podem ser agrupadas em duas fases: a anaeróbica e a aeróbica.

Na primeira, ocorre a glicólise na ausência do oxigênio no citosol da célula e na segunda, ocorrem as reações vinculadas ao ciclo de Krebs e cadeia respiratória na presença de oxigênio nas células eucarióticas e dentro das mitocôndrias (LEHNINGER et al., 2006).

O mecanismo anaeróbio é considerado o mais primitivo dos mecanismos para a obtenção de energia dos seres heterotróficos, estando presente em todos os organismos (BASSO, 2007).

Algumas espécies de bactérias podem realizar um tipo diferenciado de respiração, denominado respiração anaeróbia. Sendo, neste caso, em vez do uso de O<sub>2</sub>, utilizam nitritos, nitratos, sulfatos ou carbonatos para oxidar a matéria orgânica. Como exemplo, há as bactérias desnitrificantes do solo, como a *Pseudomonas denitrificans* (NELSON; COX, 2008).

Segundo Lehninger et al. (2006), elas participam do ciclo do nitrogênio, devolvendo à atmosfera o N<sub>2</sub>.

Por somente realizarem esse processo na ausência de O<sub>2</sub>, a desnitrificação não é um mecanismo frequente em solos oxigenados, sendo comum em regiões pantanosas onde a taxa de O<sub>2</sub> é reduzida (NELSON; COX, 2008).

Segundo Nelson e Cox (2008), na mitocôndria, ocorre a respiração celular, que acontece em duas etapas. Na primeira, o piruvato é descarboxilado e entra no

ciclo de Krebs, onde sofrerá mais duas descarboxilações. Na segunda etapa, conhecida como cadeia respiratória, as coenzimas reduzidas (NADH e FADH) produzidas na glicólise e ciclo de Krebs são oxidadas, com a correspondente produção de ATP.

A Figura 1.3 mostra representação esquemática do Ciclo de Krebs.

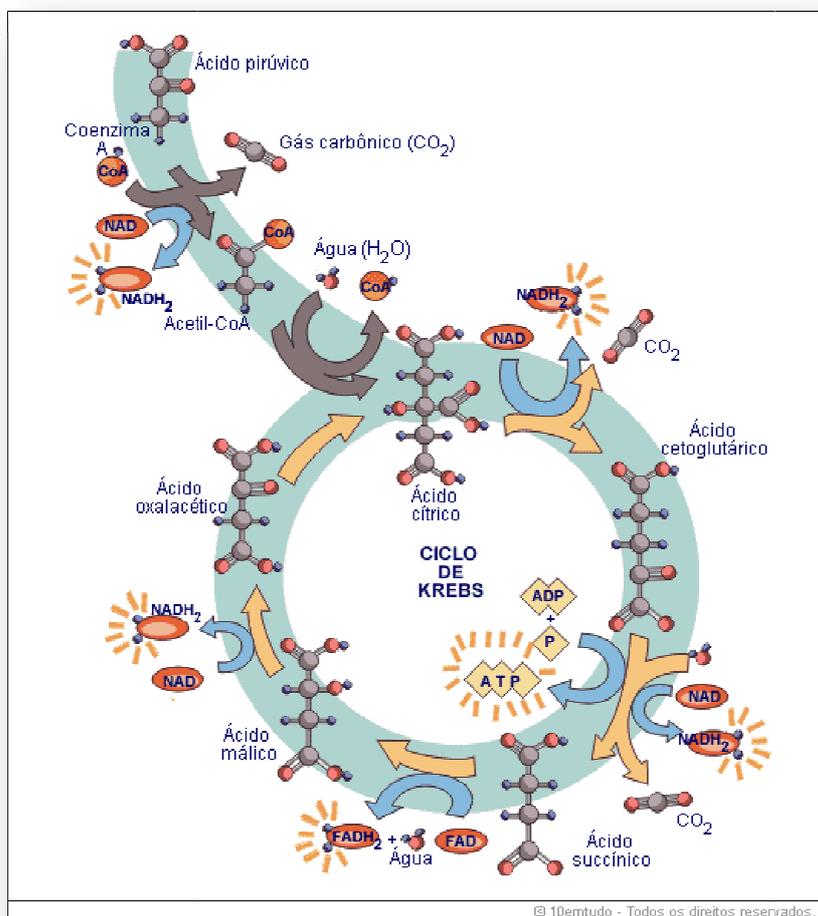
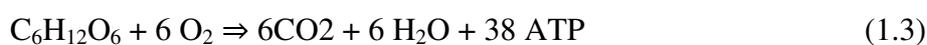


Figura 1.3 Ciclo de Krebs. Fonte: Nelson e Cox (2008).

Analisando o processo de glicólise, Lehninger et al. (2006) descreveram que quando atravessam a membrana da mitocôndria, as recém-geradas moléculas de NADH gastam mais 2 ATPs dando ao final da glicólise um saldo de 4 ATP.

O mecanismo aeróbico é representado pela equação a seguir:



### 1.2.7 Bactérias contaminantes

O processo de produção do etanol atualmente praticado no Brasil envolve a participação de leveduras em várias etapas e, com isso, os contaminantes também podem fazer parte de várias etapas da produção, causando diversos distúrbios tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido às toxinas lançadas no meio pelo contaminante, fermentações secundárias oriundas da atividade desses microrganismos, além do problema de floculação das células de levedura provocado tanto por bactérias como por leveduras (ALTHEERTUM et al., 1984).

Segundo Basso (2007), a floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol leva à decantação das leveduras no fundo das dornas e dificulta a conversão do açúcar em etanol porque, para uma máxima conversão de açúcar em etanol e gás carbônico, é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas.

Este fenômeno causa perda de células na centrífuga e a obrigatoriedade de reposição celular, trazendo gastos para o processo e proporcionando queda no rendimento alcoólico (LUDWIG et al., 2001).

A floculação impede a ação do antibacteriano por impedir o contato da substância utilizada no processo e a bactéria. Devido a isso, não ocorre a diminuição da proliferação desses contaminantes, que provocam aumento de acidez, devido produção de ácidos orgânicos que prejudicam a qualidade do etanol produzido, tanto na indústria sucroalcooleira quanto para a indústria de alimentos (ROSE, 1980).

Para o controle da infecção bacteriana, e de suas consequências no processo de obtenção de etanol, visando uma fermentação sem contaminantes, com rapidez e alta eficiência, é necessário estudos para soluções práticas e viáveis que atenuem ou eliminem a contaminação e conseqüentemente a floculação do fermento nas destilarias, reduzindo assim o custo do etanol (LUDWIG et al., 2001).

Apesar dos danos gerados, ainda não há métodos totalmente eficazes no controle industrial para caracterização e monitoramento destes agentes (ROSE et al., 1995).

### 1.2.8 Formas de contaminação bacteriana nos processos fermentativos

Nos processos de fermentação alcoólica, qualquer espécie de bactéria presente no meio de fermentação é considerada contaminante (WARD, 1991).

Inúmeros microrganismos infectantes da fermentação alcoólica são provenientes da flora natural da cana e do solo, ficando aderidos à cana, sendo transportados até as destilarias, onde se multiplicam (ROSE, 1980).

As bactérias oriundas do solo e matéria-prima aderem aos equipamentos de extração de caldo, e quando há condições favoráveis, esses microrganismos podem se multiplicar e causar problemas ao processamento (YOKOYA, 1989).

No processo fermentativo, bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Leuconostoc* são normalmente encontradas no caldo. Estes gêneros de microrganismos produzem ácidos orgânicos tais como o butírico, acético, fórmico e lático (ANDRIETTA et al., 2011).

Diversos estudos são realizados para determinar a influência dos ácidos acético e lático quanto à inibição do crescimento e a queda da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ao utilizar cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, observa-se que, ocorre queda no rendimento alcoólico significativamente ao obter contaminação bacteriana acima de  $10^6$  ou  $10^7$  células/mL no mosto (ALCARDE et al., 2007).

Dentre as bactérias produtoras de ácido lático, o gênero *Leuconostoc* se destaca por ser comum contaminante na produção tanto de açúcar quanto de álcool. Este microrganismo utiliza o açúcar disponível no caldo e produz goma. Há outros gêneros produtores de goma como *Klebsiella* e *Acetobacter*, encontrados geralmente, na condução de caldo na usina. Levantamentos da predominância da microbiota predominante no processo fermentativo, revelam que 98,52% das bactérias encontradas e isoladas foram classificadas como pertencentes ao grupo Gram-positivo sendo o gênero *Lactobacillus*, o mais frequente entre eles (59,75%) (ANDRIETTA et al., 2011).

O fator mais crítico da contaminação bacteriana para as fermentações, especialmente nas destilarias que extraem levedura para secagem, é a floculação. Esse fenômeno ocorre quando há interação entre os lactobacilos e a levedura,

potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Tais condições levam as bactérias a se aderirem nas paredes das leveduras, por meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (VENTURA; ZINK, 2002).

O corte apresenta grande diferencial para a contaminação bacteriana, pois no corte manual a exposição de áreas da cana é menor se comparada ao corte mecanizado. Esse último proporciona às bactérias possibilidades maiores de proliferação, além da contaminação no campo e no transporte. O caldo de cana pode sofrer contaminação em todas as fases do processamento que antecede a fermentação como, por exemplo, na moagem, trocadores de calor, preparo e adição de insumos entre outros (SILVA, 2010).

#### 1.2.9 Controle da fermentação

Denominam-se antibióticos, compostos orgânicos, podendo ser naturais ou sintéticos, e que inibem o crescimento ou possam causar a morte de microrganismos específicos. Tem a característica de apresentar seletividade quanto aos alvos. Outra característica, é que, devido os microrganismos alvos serem específicos, o constante uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias pode induzir à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007).

Em diversos países, não é permitido a utilização de levedura, tanto para alimentação animal ou alimentação humana, que contenha residual de antibióticos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

Biocidas naturais, quando utilizados para controle de contaminantes da fermentação, estão reduzindo com sucesso a carga microbiana, mas os resultados são demonstrados de forma isolada. As formas de utilização dos biocidas naturais podem, de certa forma, auxiliar nas decisões para o controle em que se apresentam de acordo com as exigências atuais de redução de resíduos. Além disso, há elevado custo na utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol, enquanto o controle exercido pelos biocidas apresenta baixos custos de utilização (CAETANO; MADALENO, 2011).

Segundo Bregagnoli (2006), para o problema das contaminações, a utilização de antissépticos e antibióticos que atuam de forma diferente, pode ser uma solução viável, devido à ação ocorrer sobre um ou mais grupos de microrganismos. Porém, existe a possibilidade de deixarem resíduos nos destilados. Dosagens nas proporções de 0,01 a 0,05 g/L de mosto de pentaclorofenol ocorreram durante anos, com bons resultados, porém seu uso é hoje proibido. O hexaclorofeno em dose de 4 mg/L de mosto, segundo pesquisas, contribui para boas fermentações. São citados na literatura também sulfato de cobre, embora o mais utilizado na indústria seja o ácido sulfúrico que se adiciona nas cubas de tratamento de fermento.

A utilização de substâncias proibidas na alimentação animal, ou que contenham coadjuvantes inertes prejudiciais à levedura, são muito comuns e, recentemente, esse grupo de produtos é objeto de monitoramento e regulamentação em levedura seca. Este monitoramento partiu das autoridades regulatórias dos países compradores desse material, e isso ocorreu devido a detecção de residual de antibióticos acima do esperado em lotes exportados (VENTURA, 2009).

Além disso, a resistência microbiana aos antibióticos é um crescente problema, e a entendimento do uso de drogas antimicrobianas no futuro é duvidosa, o que torna o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

#### 1.2.10 Antimicrobianos

Existem três efeitos distintos quando um agente antimicrobiano é inserido à uma cultura bacteriana na fase exponencial do crescimento: o efeito bacteriostático, o efeito bactericida e o bacteriolítico (EGUCHI, 2007).

O primeiro consiste na inibição do crescimento, porém sem morte celular. Esses agentes são frequentemente inibidores de síntese proteica e atuam por ligação aos ribossomos. É o caso dos antibióticos que inibem a síntese da parede celular em bactérias como a penicilina (SILVA, 2010).

O segundo refere-se a uma morte das células, mas não há lise celular. Por fim, o efeito bacteriolítico provoca a indução da morte celular por lise, levando à diminuição da turbidez do meio de cultura e do número de células viáveis (SILVA, 2010).

### 1.2.11 Antibióticos convencionais

Os microbiocidas específicos, com ação seletiva sobre as principais bactérias contaminantes da fermentação são representados por uma diversidade de substâncias, classificadas segundo seu mecanismo de ação (EGUCHI, 2007).

A indústria sucroalcooleira trata o fermento com antibiótico e ácido sulfúrico para o controle da infecção bacteriana. Os princípios ativos dos antibióticos são de origem do metabolismo de microrganismos selecionados e o seu grau de pureza depende do refinamento do processo de purificação de cada empresa produtora de antibióticos (CHERUBIN, 2003).

Antibióticos como penicilina e a tetraciclina são utilizados nas fermentações. A penicilina é a mais vantajosa economicamente, devido sua dosagem ser de 500 a 1000 UI/L mosto, sendo esta dosagem menor que a dos demais antibióticos disponíveis para uso em fermentações (BREGAGNOLI, 2006).

Os antibióticos mais utilizados no Brasil são a penicilina e antibióticos a base de monensina. A monensina é uma substância monitorada em países europeus importadores de levedura seca quanto ao seu residual no produto final. Ambos agem em bactérias Gram-positivas, sendo a monensina considerada a mais eficiente (MORAES et al., 2006).

A penicilina, composto beta-lactâmico, inibe a biossíntese de constituintes essenciais da membrana plasmática (EGUCHI, 2007). Os beta-lactâmico ligam-se a receptores denominados PBP (*Penicillin Binding Protein*) na membrana das bactérias impedindo a ação da enzima responsável pela ligação entre as cadeias de peptídeos que compõe a formação da membrana celular (SILVA, 2010).

O antibiótico denominado Kamoran age seletivamente como bactericida e bacteriostático. É obtido a partir da fermentação de *Streptomyces cinnamomensis* que produz o princípio ativo monensina sódica cristalina. Esta molécula impede o transporte de cátions na membrana das bactérias Gram-positivas (REVISTA QUIMICA REAL, 2009).

A oxitetraciclina atua em bactérias Gram-negativas e positivas, pois é um antibiótico de amplo espectro. O mecanismo de ação das tetraciclinas está em bloquear o receptor no ribossomo que se liga aos t-RNA na transcrição genética,

conferindo capacidade de inibir a síntese proteica e posterior inibição da replicação das bactérias (SILVA, 2010).

A virginiamicina, substância química extremamente utilizada na produção animal a partir de 1950, possui ação sobre as bactérias Gram-positivas atuando por meio de ligação com os ribossomos, inibindo a síntese proteica (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004). A virginiamicina é um antibiótico com moléculas denominadas estreptograminas que formam um grupo pequeno de antibióticos e todos relacionados como pristinamicina, virigniamicina, micamicina e vernamicina que inibem a formação de pontes peptídicas, resultando na formação de cadeias proteicas incompletas (SILVA, 2010).

A substância clindamicina, produzida pela cepa *Streptomyces lincolnensis*, inibe a síntese proteica do microrganismo alvo, por meio do impedimento das ligações peptídicas. É um antibiótico considerado bacteriostático em baixas dosagens, mas quando em altas dosagens pode ser bactericida. (YEWALE; DHARMAPALAN, 2012).

Troppa (1998) descreveu que ao comparar o uso de tetraciclina e penicilina foi possível observar que é necessário maior concentração de tetraciclina para inibir o desenvolvimento de bactérias no mosto do que penicilina, e que ambos não causam alterações no metabolismo das leveduras.

Segundo o autor, a associação de antibióticos é uma prática utilizada nas destilarias e pode ser vantajoso no combate à contaminação bacteriana (TROPPIA, 1998).

O uso indiscriminado e contínuo dos antibióticos convencionais durante os processos fermentativos nas indústrias de álcool provocam seletividade nas cepas de bactérias presentes nestes processos. Com isso, as bactérias selecionadas tornam-se menos sensíveis à ação dos antibióticos (CINELLI, 2012).

Quando o antibiótico Kamoran WP foi lançado, a indicação de dosagem era de 1 a 3 ppm, mas esta foi alterada atualmente para 4 ppm, demonstrando assim, a resistência das bactérias a este composto (SILVA, 2010).

#### 1.2.12 Antimicrobianos à base de lúpulo

A origem da planta do lúpulo é a Europa e Ásia Ocidental, mas é cultivada em zonas de clima temperado em todo o mundo, concentrando-se em maior

proporção na Alemanha, Estados Unidos, China, Inglaterra, República Checa, Eslovênia, Austrália e França (RUCKLE; SENN, 2006).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) pertence à família *Cannabinaceae* e à ordem Urticales. Portanto, botanicamente, está relacionada com as urtigas irritantes. É uma planta perene trepadora, que atinge até 6 metros de altura. São dioicas (flores masculinas e femininas em plantas diferentes que se distinguem pelo tamanho) e o período de florescimento é durante julho e agosto por toda Europa e Ásia Ocidental (HORNSEY, 1999).

As flores femininas apresentam uma estrutura morfológica denominada “cone de lúpulo”, cujas pétalas contêm glândulas de lupulina, que é constituída por uma resina rica em ácidos alfa e beta (RUCKLE; SENN, 2006).

A lupulina contém óleos essenciais (0,2 – 3%), ácidos beta ou lupulonas (1,5 – 9,5%) e ácidos alfa ou humulonas (2,0 – 16%) que variam em suas proporções nas diferentes variedades da planta (SILVA; FARIA, 2008).

Os ácidos do lúpulo interferem no transporte de metabólitos na membrana celular e modificam o pH intracelular o que provoca a morte das bactérias por meio de insuficiência nutricional. Sua ação é mais eficiente em bactérias Gram-positivas (SILVA; FARIA, 2008).

Para obtenção do efeito bacteriostático, a dosagem do extrato de lúpulo deve manter a concentração mínima do princípio ativo entre 3 a 5 mg L<sup>-1</sup>. Nessa faixa de dosagem, não há alteração no crescimento e metabolismo das *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA et al., 1996).

Atuam principalmente sobre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, limitando seus metabolismos e melhorando as condições fermentativas para as leveduras. Isso proporciona melhores condições para o crescimento das leveduras que irão fermentar mais rapidamente o mosto e com maior produção de álcool (RUCKLE; SENN, 2006).

Em 2007, o extrato de lúpulo 45% foi lançado no setor sucroalcooleiro brasileiro. O uso do extrato para controle bacteriano mostrou vantagens, como a redução no gasto com ácido sulfúrico no tratamento do levedo e incremento no rendimento de etanol. Além disso, o extrato é um produto natural que as empresas produtoras de levedura seca podem aderir ao uso, pois não deixa residual químico em

alimentos. Em relação aos custos para as usinas, o uso do extrato de lúpulo é semelhante aos antibióticos (CAETANO; MADALENO, 2011).

### 1.3 REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R.; HORII, J.; NOBREI, T. P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M., HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 137-147, out/dez. 2003.

ALTHERTUM, F. et al. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB Açúcar e Álcool**, Piracicaba, v.3, n.1, p.42-49, set/dez. 1984.

ANDRIETTA, M. et al. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. p. 50.

BAMFORTH, C. W. The science underpinning food fermentations. In: BAMFORTH, C. W. **Food, fermentation and micro-organisms**. Califórnia: Blackwell Publishing, 2005. Cap. 1. p. 1-38.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 1., PROJETO PROGRAMA DE PESQUISA EM POLÍTICAS PÚBLICA, 2007. **Anais...** São Paulo: ESALQ/USP. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper\\_sessao\\_2\\_Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_2_Basso.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2012.

BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CABRINI, K. T., GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 46, n. 1, p. 207-216, out. 1998.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011. Disponível em: <[http://www.fatecjab.edu.br/revista/2011\\_v02\\_n01/3\\_caetano.pdf](http://www.fatecjab.edu.br/revista/2011_v02_n01/3_caetano.pdf)> Acesso em: 22 jan. 2013.

CHERUBIN, R. A. **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.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

EGUCHI, J. Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 2, n. 22, p. 35-39, 2007. Disponível em: <[http://www.sbcc.com.br/sumario\\_22.htm](http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm)>. Acesso em: 15 jan 2011.

FARRELL, et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, Chicago, v. 311, n. 5760, p. 506-508, jan. 2006.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática**. 2007. 201 f. Tese (Doutorado em biologia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2007.

FIGUEIREDO, C. M. **Análise molecular da floculação e da formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.

HORNSEY, I. S. **Elaboración de cerveza: microbiología, bioquímica y tecnología**. Zaragoza: Acribia, 1999, 110 p.

KHALAF, P. I. **Obtenção de hidrogênio, carbono nanoestruturado e gás de síntese por plasma térmico de argônio a partir da degradação de metano, biogás e água**. 2009. 187 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeasts and yeast-like organisms**. 2. ed. Michigan: VCH, 1990. 528 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Classification of yeast. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2000. Cap. 1. p. 1-3.

LEHNINGER, A. L. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LIMA, et al. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 3, 593 p.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, Jan. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612001000100014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000100014)>. Acesso em: 22 Out. 2012.

MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química: um curso universitário**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2002. 457 p.

MARTINS, B. A. D. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo**. 2004. 124 f. Dissertação (mestrado em engenharia ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MATIENZO, P. A. **RE-Identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MEIRELLES, A. J. A. Expansão da produção de etanol e melhoria tecnológica da produção alcoólica. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 2006. São Paulo: EEL/USP. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper\\_sessao\\_4\\_Antonio\\_Meirelles.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_4_Antonio_Meirelles.pdf)>. Acesso em: 09 set. 2013.

MORAES, J. A. S., BERCHIELLI, T. T., REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. cap 1, p. 539-561.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical engineering and biotechnology**. Elsevier: Amsterdam, DC, 2007. 421p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. 1100 p.

OLIVEIRA, A.J. et al. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ, 1996. 89 p.

**REVISTA QUÍMICA REAL: Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca**. Belo Horizonte: Kamoran News, v. 1, n. 1, mar. 2009.

ROSE, A. H. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae* In: SKINNER F. A. PASSMORE, S. M.; DANVENPORT, R. R. **Biology and Activity of yeast**. London, Academic Press, 1980. p. 103.

ROSE, A. H.; WHEALS, A. E.; HARRISON, J. S. **The Yeasts**, 2. ed. Londres: Academic Press, 1995. 181 p.

RUCKLE, L.; SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products**, Nurenberg, v. 7, n. 9, 2006.

Disponível em:

<[http://www.betatechopproducts.com/literature/files/Hop\\_acids\\_natural\\_antibacterials.pdf](http://www.betatechopproducts.com/literature/files/Hop_acids_natural_antibacterials.pdf)>. Acesso em: 01 fev. 2013.

SILVA, G. K. C. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para obtenção do etanol**. 2010. 93 f. Trabalho de Conclusão Curso (Graduação do curso de Tecnologia em Biocombustíveis). Faculdade de Tecnologia, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba, 2010.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciências Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 902-906, out./dez. 2008.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 245p.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 175-182.

TROPPIA, C. T. **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes**. 1998. 132 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan./fev. 2004.

VENTURA, M.; ZINK, R. Identificação específica e molecular na análise de *Lactobacilos johnsonii* usando métodos de PCR e eletroforese em gel de campo pulsado. **FEMS Microbiology Letters**: Berlim, v. 217, n. 2 p. 141-154, 2002.

VENTURA, R. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE USO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., 2009, Campinas. **Potenciais Contaminantes em Levedura Extraída de Fermentação Alcoólica**. Campinas: CBNA, 2009. p. 137 - 142.

WARD, O. **Biotecnologia de la Fermentación**. Zaragoza: Acribia, 1991. 155 p.

YEWALE, V. N.; DHARMAPALAN, D. Promoting appropriate use of drugs in children. **International Journal of Pediatrics**: Bethesda, v. 2012, p. 1-5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijped/2012/906570/>>. Acesso em: 11 mar. 2013.

YOKOYA, F. Microbiologia de Processo. In: EGUCHI S.Y. et al. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello, 1989. p.1-22.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PARQUINI, R. **Hematologia**: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu, 2005. 1081 p.

# CAPÍTULO II

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém uma tecnologia única no mundo para utilização em grande escala de um combustível renovável (etanol) que não depende do petróleo. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2010/2011, mais de 660 milhões de toneladas de cana que foram processadas em açúcar, álcool e derivados, sendo 28,5 bilhões de litros de álcool. Na região sul do Brasil, 26,3 bilhões de litros foi produzido e 16,2 bilhões de litros no estado de São Paulo (BRESSAN; ANDRADE, 2013).

O conhecimento do processo fermentativo é fundamental para o aperfeiçoamento na produção de etanol, pois a produção do álcool ocorre essencialmente por esta via (COSTA, 2010).

São muitos os fatores que podem causar danos ao processo de fermentação na produção do etanol e a infecção bacteriana é um deles. Ela pode causar consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição de crescimento e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio, promovendo assim a redução no rendimento e na produtividade da fermentação (OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001).

Algumas substâncias são comumente empregadas para impedir essas contaminações e tornar a produção livre de agentes que promovam situações de baixo rendimento e produtividade; são os antibióticos, os antimicrobianos, além de substâncias que podem impedir a contaminação como os ácidos de lúpulo (MUTHAIAN et al., 2010).

Os antibióticos são substâncias sintéticas ou naturais elaboradas por fungos, bactérias, entre outros seres vivos, apresentando atividade bactericida. O uso indevido e incorreto de antibióticos pode trazer consequências agravantes na fermentação. As bactérias têm a capacidade para criar resistência aos antibióticos através de vários mecanismos (PELCZAR, 1996).

Segundo Badin (2010), os antibióticos convencionais podem deixar resíduos no creme de levedura, o qual é utilizado por algumas empresas como matéria-prima na produção de levedura seca. Este produto é usado na fabricação de ração animal ou ingrediente para produtos de consumo humano. Por esse motivo, há a necessidade de desenvolvimento de substâncias para o controle de bactérias contaminantes, não prejudiciais à saúde de animais e seres humanos, que consigam a mesma eficiência de controle microbiano nas dornas de fermentação.

A Figura 2.1 mostra principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos.

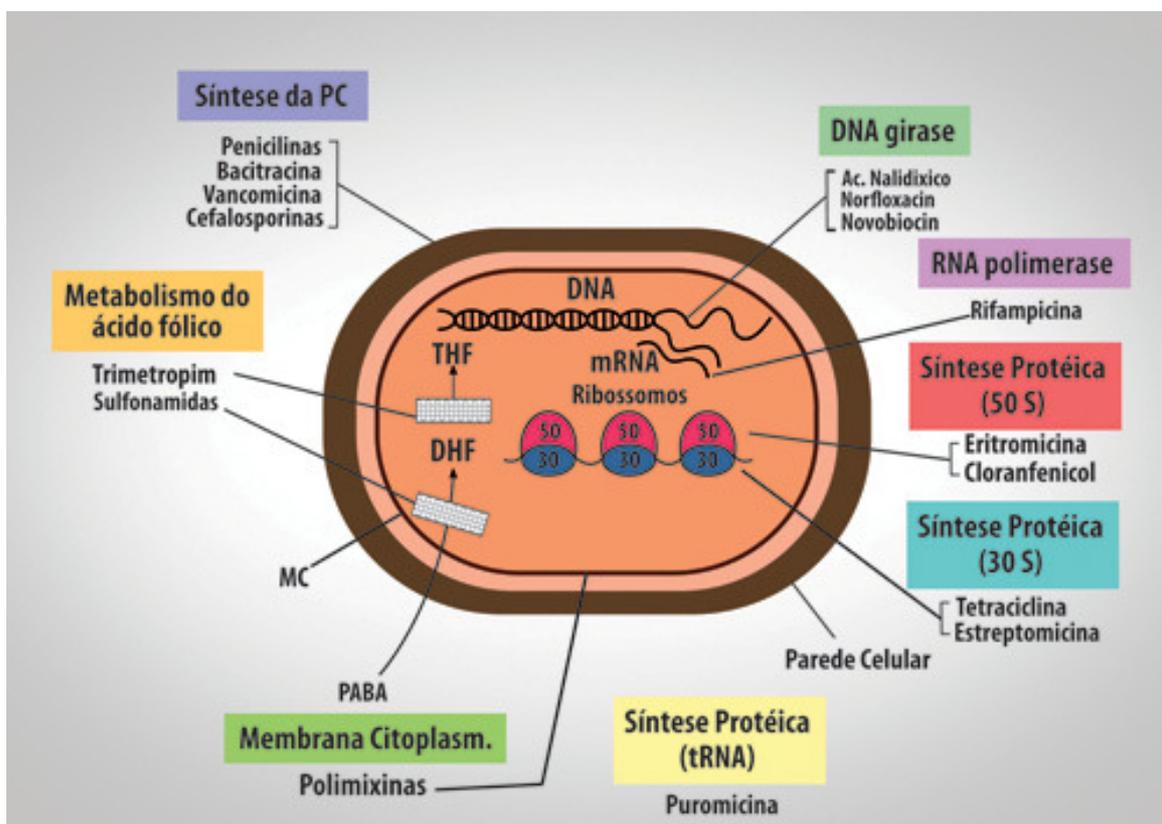


Figura 2.1 Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por antibióticos. Fonte: adaptado de Ruckle e Senn (2006).

As substâncias antimicrobianas são muito utilizadas e objetivam proteger o processo fermentativo, são agentes químicos que inibem o crescimento de microrganismos (REVISTA FOOD INGREDIENTS, 2010).

O cloreto de sódio (sal de cozinha) é considerado o mais antigo agente antimicrobiano. Atualmente, são utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos com baixo valor de pH, ácidos orgânicos como o acético, benzóico, propanóico e sórbico. Para inibir o crescimento da bactéria *Clostridium botulinum* em alimentos que contenham carne crua como, por exemplo, linguiça, presunto, bacon e salame, são utilizados nitratos e nitritos. Em frutas secas, sucos e vinhos, dióxido de enxofre e sulfitos é usado para controlar o crescimento de microrganismos. Para inibir o crescimento de bactérias e fungos, utiliza-se nisina e natamicina (REVISTA FOOD INGREDIENTS, 2010).

O lúpulo é utilizado na indústria como agente bacteriostático e o uso de produtos à base de lúpulo, técnica já utilizada na fabricação de cerveja, foi incorporado ao processo de produção de álcool etílico carburante. O lúpulo na forma de péletes ou extrato confere gosto amargo às cervejas, mas também inibe o crescimento de espécies bacterianas contaminantes do processo fermentativo (RUCKLE; SENN, 2006).

O lúpulo é utilizado na indústria como agente bacteriostático e o uso de produtos à base de lúpulo, técnica já utilizada na fabricação de cerveja, foi incorporado ao processo de produção de álcool etílico carburante. O lúpulo na forma de péletes ou extrato confere gosto amargo às cervejas, mas também inibe o crescimento de espécies bacterianas contaminantes do processo fermentativo (LEITE et al., 2012).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta do tipo dioica, sendo as flores femininas responsáveis por produzir material resinoso denominado lupulina, que é responsável em conferir o gosto amargo e aroma à cerveja (LOPES; SILVA, 2011).

O lúpulo pertence ao reino *Plantae*, Classe *Magnoliopsida*, ordem *Rosales*, família *Cannabaceae*, gênero *Humulus*, espécie *H. lupulus* (SILVA; FARIA, 2008).



Figura 2.2 *Humulus lupulus*. Fonte: Google Imagens.

No extrato de lúpulo existem naturalmente os ácidos alfa e beta que atuam sobre os microrganismos contaminantes, inibindo o seu crescimento (RUCKLE; SENN, 2006).

O ácido beta é extraído com gás carbônico supercrítico que mantém suas propriedades naturais. É dissolvido em propileno glicol de grau alimentício. Resultados de pesquisas mostram que o beta ácido possui propriedades antimicrobianas e são particularmente ativos contra bactérias Gram-positivas. As pesquisas também revelaram que a atividade contra bactérias Gram-negativas é insignificante. Outra descoberta indica que o produto não produz nenhum efeito maléfico na levedura (REVISTA ALCOOLBRAS, 2007).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou comparar a eficiência dos antibióticos convencionais em relação aos antimicrobianos à base de lúpulo, em escala de produção industrial de bioetanol.

## 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes experimentais foram realizados em usina sucroalcooleira do Estado de São Paulo que opera com processo de fermentação descontínua alimentada. A planta de fermentação é constituída por 14 fermentadores com capacidade de 800 m<sup>3</sup>, 6 pré-fermentadores (60 m<sup>3</sup>) e 6 centrífugas para a separação do fermento. A condução do

processo fermentativo por batelada alimentada possibilita o rastreamento das infecções que ocorrem em cada fermentador.

### 2.1.1 Planejamento experimental

O trabalho foi realizado a partir da coleta de dados de contagem de bactérias láticas durante o processo de fermentação alcoólica, em duas safras.

Os dados utilizados foram coletados na safra de 2008/2009, em que o controle da infecção bacteriana foi realizado exclusivamente por meio de antibióticos convencionais, e na safra de 2011/2012, na qual o controle das bactérias contaminantes foi realizado com a adição de antimicrobiano à base de extrato de lúpulo.

A comparação da eficiência dos antibióticos convencionais em relação aos antimicrobianos à base de lúpulo foi feita por meio taxa de redução populacional em dois ciclos consecutivos de fermentação.

Os antibióticos avaliados foram Kamoran WP, Alcapen 1030 e Corstan. Os antimicrobianos à base de lúpulo foram IsoStab e Beta Bio. O Kamoran WP e o Corstan têm como princípio ativo a monensina sódica (REVISTA QUIMICA REAL, 2009), o Alcapen 1030, a oxitetraciclina e penicilina (LOPES; SILVA, 2011), enquanto que o IsoStab e BetaBio, alfa e beta ácidos obtidos do extrato de lúpulo (RUCKLE; SENN, 2006).

O experimento teve cinco tratamentos (três com antibióticos convencionais e dois com antimicrobianos à base de lúpulo), com 17 repetições para Kamoran WP, 17 repetições para Alcapen 1030 e 13 para Corstan, enquanto que para o IsoStab 28 repetições e para o Beta Bio 17 repetições.

As amostras foram coletadas na dorna de fermentação para o mesmo fermento em dois momentos. Para quantificar a população inicial de bactérias láticas, foi coletada amostra no final do processo fermentativo (vinho) antes do tratamento com antibióticos ou lúpulo, e para determinar a população final, a coleta das amostras foi ao final do processo fermentativo (vinho) após o tratamento com esses produtos.

### 2.1.2 Método de contagem em placas de bactérias lácticas

O método de contagem total de bactérias lácticas foi feito utilizando a técnica *pour plate* (contagem de unidade formadora de colônias por ml) descrito no Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos – ITAL (SILVA et al., 2007).

Essa análise microbiológica foi realizada em câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada. As amostras de vinhos foram inoculadas em placas de *Petri* separadas, esterilizadas, com diluições adequadas. Às placas de *Petri* foi adicionado meio de cultura MRS esterilizado com sobrecamada. A incubação das placas foi feita de forma "invertida" em estufa com temperatura controlada de 30°C por 48h. Após o período de incubação, com o auxílio do contador, efetuou-se a contagem das colônias e obtenção dos resultados (SILVA et al., 2007).

### 2.1.3 Cálculo da taxa de redução populacional (TRP)

A taxa de redução populacional para cada antibiótico e antimicrobiano à base de lúpulo foi calculada pela seguinte equação:

$$TRP = \frac{\text{População inicial}}{\text{População final}} \quad (2.1)$$

Sendo:

TRP = taxa de redução populacional

População inicial = contagem de bactérias contaminantes no vinho antes do tratamento com antibiótico ou lúpulo (UFC/mL)

População final = contagem de bactérias contaminantes no vinho após o tratamento com antibiótico ou lúpulo (UFC/mL)

Após a determinação da taxa de redução populacional para cada tratamento, foi calculada a média para cada tratamento. O valor médio foi utilizado na análise estatística.

### 2.1.4 Análise estatística

O experimento foi considerado inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA). Em função da elevada variabilidade dos resultados de contagem de bactérias lácticas, os dados originais foram transformados ( $y' = \sqrt[2]{\log(y + 1)}$ ) e submetidos ao teste de Levene para verificar a sua distribuição normal. Após isso, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (VIEIRA, 2006).

O *software* utilizado foi o SAS 9.1 em nível de 5% de probabilidade (SAS INSTITUTE INCORPORATION, 2003).

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A elevada variação dos resultados de contagem de bactérias lácticas exigiu a transformação dos dados originais, conforme descrito no item 2.4 (Análise estatística). Foi constatado em todos os tratamentos que, para algumas contagens, a população cresceu após o tratamento com os antimicrobianos. Em função disso, resolveu-se calcular a taxa de redução populacional (TRP), como demonstrada na Equação 2.1, para evitar os valores negativos quando se trabalha com TRP expressa em percentagem.

A análise de variância (Tabela 2.1) foi significativa ao nível de 5% de probabilidade, indicando que há diferença estatística entre os tratamentos. O teste de Tukey realizado ao nível de 5% de probabilidade mostrou que os produtos de lúpulo (IsoStab e BetaBio) foram superiores e/ou equivalentes aos antibióticos, porém, nunca inferiores (Tabela 2.2).

Tabela 2.1. Análise de variância para as taxas de redução populacional dos antimicrobianos convencionais (Kamoran WP, Alcapen 1030, Corstan) e antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e BetaBio.

<b>Causa de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma de quadrados</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p&gt;F</b>
Tratamento	4	2,9699	0,7425	3,03	0,0218*
Resíduo	87	21,3368	0,2452		
Total	91	24,3067			

\*significativo (p<0,05)

Tabela 2.2. Teste de Tukey da taxa de redução populacional (TRP) de bactérias lácticas, durante a fermentação alcoólica na safra de 2008/2009, para antimicrobianos convencionais (Kamoran WP, Alcapen 1030, Corstan) e na safra 2011/2012, para os antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e Beta Bio.

<b>Tratamento</b>	<b>Nº Observações</b>	<b>Média TRP ± Desvio Padrão</b>
Kamoran WP	17	1,51 ± 0,60 a
Alcapen 1030	17	1,01 ± 0,43 b
Corstan	13	1,50 ± 0,43 ab
IsoStab	28	1,45 ± 0,47 a
BetaBio	17	1,45 ± 0,53 ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% pelo teste Tukey.

Segundo os resultados obtidos na Tabela 2.2, a TRP não foi totalmente eficiente para nenhum dos antimicrobianos utilizados, pois não houve eliminação das bactérias contaminantes e sim, redução da população. Esta informação está de acordo com os resultados de Nobre et al. (2007). Quanto à comparação da TRP do antimicrobiano BetaBio em relação ao Kamoran, o presente trabalho mostrou resultados diferentes em relação aos publicados por Leite et al. (2012), para quem o antibiótico foi superior ao lúpulo.

Foi possível observar redução da contagem de bactérias lácticas em tratamentos com antibióticos convencionais Kamoran e Corstan. Estes resultados são semelhantes ao de Mello (2002) que compararam os mesmos produtos no controle de bactérias lácticas durante o processo fermentativo de caldo de cana.

Os resultados expostos na Tabela 2.2 mostraram que a eficiência da dosagem do antibiótico Kamoran não foi total ao ponto de eliminar as bactérias contaminantes com dosagens de 3 ppm. Este fato foi relatado por Lopes e Silva (2011) que obtiveram melhores resultados com dosagens de 6 ppm, o dobro da recomendada pelo fabricante.

Pela análise dos resultados mostrados na Tabela 2.2, observou-se que os antimicrobianos a base de lúpulo se igualam aos antibióticos convencionais ou os supera o que corrobora com Lopes e Silva (2011) que relataram que os compostos a base de extrato de lúpulo foram eficazes, apresentando resultados de redução populacional bacteriana a partir de dosagens de 5 a 10 ppm, quantidade inferior às recomendadas pelo fabricante.

Alcarde et al. (1996) observaram que a penicilina permitiu o desenvolvimento de bactérias mesmo quando usada em altas dosagens. Nos dados obtidos no presente trabalho, o produto Alcapen 1030, que apresenta penicilina em sua composição, demonstrou menor eficiência na TRP, quando comparado ao Kamoran e IsoStab.

É possível afirmar, a partir da análise da Tabela 2.2, que estatisticamente o antibiótico convencional Kamoran apresentou resultado semelhante aos antimicrobianos naturais à base de lúpulo, comportamento semelhante ao observado por Badin (2010).

Na rotina da destilaria, objeto deste estudo, constatou-se que os antibióticos convencionais apresentam custo mais elevado quando comparados aos antimicrobianos à base de lúpulo. Os valores para os cálculos foram obtidos com o departamento de compras da empresa.

Comparando valor entre produtos a base de monensina, não há grandes diferenças. O valor do quilo de Kamoran WP é 2% mais alto que o antibiótico Corstan. Porém, quanto comparado ao Alcapen 1030, antibiótico a base de oxitetraciclina e penicilina, a diferença fica em torno de 48% maior para o Kamoran.

Antibióticos a base de monensina, apresentam valor torno de 225% mais elevados que os antimicrobianos de lúpulo.

### 2.3 CONCLUSÕES

Dentro das condições em que este estudo foi feito, considerando as limitações metodológicas do estudo de caso no interior de uma usina sucroalcooleira em safras diferentes, concluiu-se que os antimicrobianos a base de lúpulo (IsoStab e Beta Bio) podem substituir os antibióticos convencionais (Kamoran, Alcapen e Corstan), pois os estudos demonstraram que sua eficácia é igual ou superior aos convencionais.

## 2.4 REFERÊNCIAS

ALCARDE, V. E.; OLIVEIRA, C. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e células vegetativas de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 2, n. 17, p.223-229, jun. 1996. Semestral.

BADIN, F. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol**. 2010. 212 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

BRESSAN, A.; ANDRADE, R. A. **Perfil do setor do açúcar e do etanol no brasil**.: Safra 2010/2011. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_30\\_11\\_58\\_18\\_perfil\\_setor\\_sucroalco\\_edicao\\_10-11.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_30_11_58_18_perfil_setor_sucroalco_edicao_10-11.pdf)>. Acesso em: 23 maio. 2013.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando à obtenção do etanol**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química). Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

LEITE, I. R. et al. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 611-618, 2013.

LOPES, M. B.; SILVA, T. M. B. Teste de sensibilidade in vitro aos antibióticos do processo de fermentação de uma usina sucroalcooleira no interior do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.4, n.3, p. 445-465, set/dez. 2011.

MELLO Jr., G. M. Aplicação dos produtos Elanco Kamoran e Corstan durante o processo de tratamento do fermento com pH na Faixa de 1,9 a 2,5. **STAB**, Piracicaba, v. 20, n. 4, p 47-48, jan/fev. 2002.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEN, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Arkansas, v.37, n. 3, p.351-370, jun. 2011.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciências e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p.10-14, 2001.

PELCZAR Jr., M. J. **Microbiologia**: conceitos básicos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996, 524 p.

REVISTA ALCOOLBRAS: **Inimigo natural**. São Paulo: Valete, n. 110, maio 2007. Disponível em: <[http://www.revistaalcoholbras.com.br/edicoes/ed\\_110/mc\\_2.html](http://www.revistaalcoholbras.com.br/edicoes/ed_110/mc_2.html)>. Acesso em: 22 out. 2012.

REVISTA FOOF INGREDIENTS BRASIL: **Agentes antimicrobianos**. São Paulo: Insumos, v. 15, set/out/nov. 2010. Disponível em: <[www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com)>. Acesso em: 22 out. 2012.

REVISTA QUÍMICA REAL: **Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca**. Belo Horizonte: Kamoran News, v. 1, n. 1, mar. 2009.

RUCKLE, L., SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products**: Nurenberg, Germany, v. 7, n. 9, 2006. Disponível em: <[http://www.betatechopproducts.com/literature/files/Hop\\_acids\\_natural\\_antibacterials.pdf](http://www.betatechopproducts.com/literature/files/Hop_acids_natural_antibacterials.pdf)>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2013.

SAS INSTITUTE INCORPORATION. **The SAS for Windows, release 9.1**. Cary: SAS, 2003. CD-ROM.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2007. 544 p.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciências Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 902-906, out./dez. 2008.

VIEIRA, S. **Análise de Variância: (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.