

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

NATALIA JANAINA LAGO MAIA

**APLICAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE
DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

NATALIA JANAINA LAGO MAIA

**APLICAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE
DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL.....	5
2.1.1 Histórico e perspectivas.....	5
2.1.2 Obtenção do etanol.....	6
2.1.2.1 Etanol de primeira geração.....	7
2.1.2.2 Etanol de segunda geração.....	8
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL.....	9

2.2.1 Seleção de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	10
2.2.2 Uso de levedura na alimentação animal.....	12
2.3 CONTAMINAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	13
2.3.1 Principais contaminantes da produção de etanol.....	14
2.4 MEDIDAS DE CONTROLE DOS CONTAMINANTES.....	15
2.4.1 Tratamentos químicos.....	17
2.4.2 Compostos de origem vegetal ou animal.....	18
2.4.3 Compostos naturais de origem microbiana.....	21
CAPÍTULO 3	
3. INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.2.1 Micro-organismos utilizados em testes laboratoriais	29
3.2.2 Meio de Cultura para teste de ensaio fermentativo	29
3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) <i>in vitro</i>.....	30
3.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima da combinação de antimicrobianos e índice da concentração inibitória fracionada (ICIF).....	30

3.2.5 Teste de inibição em ensaio fermentativo.....	31
3.2.6 Análises microbiológicas.....	32
3.2.7 Análises físico-químicas.....	32
3.2.8 Preparação de fórmula antimicrobiana.....	32
3.2.9 Avaliação de antimicrobianos naturais em teste com levedo industrial.....	33
3.2.10 Análises estatísticas.....	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.3.1 CIM para <i>Lactobacillus fermentum</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	34
3.3.1.1 Concentração inibitória mínima da combinação de antimicrobianos...	37
3.3.2 Teste de inibição em ensaio fermentativo.....	38
3.3.3 Utilização de fórmula antimicrobiana em teste fermentativo laboratorial.....	44
3.3.4 Teste dos antimicrobianos utilizando massa de levedo industrial..	45
3.4 CONCLUSÃO.....	50
CAPÍTULO 4	
4. CONCLUSÃO GERAL.....	52
REFERÊNCIAS.....	54

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada "*in memoriam*" aos meus queridos pais Pedro Jair Lago e Altamira Alvez Bezerra, pelo grande amor, educação e dedicação dada à família.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos dons e pela vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano pela grande humildade no compartilhamento de conhecimentos e ideias, por todo incentivo e amizade desenvolvida.

A Sugarcane trading pelo financiamento deste projeto, confiança e auxílio prestado.

A Pontifícia universidade católica do Paraná, PUCPR, pelo suporte financeiro e pela oportunidade para recebimento de mais um título.

A equipe formada pela Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis e ao departamento de bioquímica e microbiologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro SP, pelos ensinamentos e auxílio prestado para realização das atividades técnicas deste projeto.

Aos professores do PPGCA pelo profissionalismo e sabedoria repassada.

A secretária do PPGCA Caroline Nocera por toda ajuda e apoio.

Aos meus colegas de laboratório Rachel Tereza Rigotti, Bruno Ludvig Tracz, Hanna Lethycia Wolupeck e Crisley Aparecida Morete pela companhia, ajuda, compartilhamento de ideias e bons momentos de descontração.

A todos os alunos de PIBIC e PIBIT que me auxiliaram durante os experimentos laboratoriais.

Aos laboratoristas do campus PUCPR São José dos Pinhais, pelo auxílio prestados nas realizações das atividades do projeto, pela parceria e troca de experiências.

A minha família, pelo imenso apoio, amor, orações e confiança; especialmente ao meu amado esposo Carlos Enock de Oliveira Maia.

Ao meu filho Samuel Andre Lago Maia que mesmo sendo criança é instrumento de Deus para me fortalecer, animar e me ensinar o amor verdadeiro.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 é um artigo preparado para submissão para um periódico científico.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Atualmente a contaminação bacteriana é considerada um desafio para os produtores de etanol. Esta contaminação em níveis $>10^7$ UFC/mL, afeta significativamente o metabolismo das leveduras, reduzindo até 30% da fermentação alcoólica. Os antibióticos, geralmente associados a processos de desinfecções ácidas do fermento, são utilizados para reduzir estas contaminações. Mas resíduos destes antibióticos podem ser detectados na massa de levedura seca, utilizada para alimentação animal, inviabilizando o comércio deste subproduto em países europeus. Neste sentido, alguns estudos relacionados ao uso de compostos naturais para controle de contaminantes nas indústrias sucroalcooleiras têm sido desenvolvidos e suas aplicações são viáveis neste setor para evitar o embargo de seus subprodutos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de lúpulo, ácido 4-hidroxibenzóico, nisina A, nisina Z e lisozima, contra *Lactobacillus fermentum* (LF) e *Leuconostoc mesenteroides* (LM), que são contaminantes comuns nas usinas brasileiras de etanol. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano natural foi determinada para LM e LF, assim como, a CIM da combinação dos antimicrobianos. Apenas as substâncias que não foram tóxicas para *Saccharomyces cerevisiae* (SC) e eficazes na redução da população bacteriana foram selecionadas. Assim, a nisina, o extrato lúpulo, e sua combinação foram usadas em biorreatores contendo caldo de cana suplementado e os micro-organismos SC, LF e LM, simulando o caldo de fermentação de usinas de produção de etanol. Posteriormente, a combinação de nisina e extrato de lúpulo foi testada em uma indústria parceira do projeto. O extrato de lúpulo teve a menor CIM, seguido de nisina e de ácido 4-hidroxibenzóico. A lisozima não apresentou efeitos contra as bactérias (LM e LF) em níveis de até 125 mg/L e o ácido 4-hidroxibenzóico apresentou efeitos tóxicos para a levedura (SC) a níveis ≥ 38 mM. A CIM da combinação do extrato de lúpulo e nisina também foi testada. O uso desses agentes antimicrobianos em combinação mostrou efeito sinérgico tal como calculado pelo índice de concentração inibidora fracionada (IFIC). O extrato de lúpulo e a nisina não apresentaram efeitos tóxicos à levedura, mesmo com uso de doses extremas (até 1000 x CIM). A utilização de nisina 30 mg/L e extrato de lúpulo em 5 mg/L, apresentaram resultados semelhantes à monensina em 10 mg/L no caldo de fermentação. A eficácia da fórmula desenvolvida também foi avaliada em um caldo industrial, onde mostrou efeito semelhante a produtos comerciais compostos por extrato de lúpulo rico em α -ácidos e ClO_2 . Novos estudos devem ser realizados para verificar a estabilidade da fórmula desenvolvida para posterior comercialização.

Palavras-chave: Produção de etanol. Nisina. Lúpulo. *Lactobacillus fermentum*. *Leuconostoc mesenteroides*.

ABSTRACT

Currently, bacterial contamination is considered a challenge for ethanol producers. Contamination at levels $>10^7$ CFU/mL, interfere significantly with the yeast metabolism, reducing the alcoholic fermentation by 30%. Antibiotics, usually associated with acid disinfection, are used to reduce these contaminations. However, residues of these antibiotics can be detected in the dry yeast, which is used for animal feed, preventing the commercialization of this product in European countries. Some studies related to the use of natural compounds in order to control contaminants in ethanol-producing plants have been developed and these products can substitute antibiotics, avoiding the embargo of the dry yeast by European countries. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of hop extract, 4-hydroxybenzoic acid, nisin A, nisin Z and lysozyme, against *Lactobacillus fermentum* (LF) and *Leuconostoc mesenteroides* (LM), which are common contaminants of Brazilian ethanol plants. Minimum inhibitory concentration (MIC) of each natural antimicrobial was determined for LM and LF. The combination of the two best antimicrobials was also tested. Only the substances that were not toxic to *Saccharomyces cerevisiae* (SC) and effective in reducing the bacterial population were selected. Subsequently, nisin, hop extract, and their combination were used in bioreactors containing supplemented sugar cane broth, SC, LF and LM, simulating the fermentation broth of ethanol producing plants. Finally, the combination of nisin and hop extract was also tested in an ethanol-producing plant. Hop extract showed the lowest MIC, followed by nisin and 4-hydroxybenzoic acid. Lysozyme had no effect against bacteria (LM and LF) at levels up to 125 mg/L and 4-hydroxybenzoic acid was toxic to the yeast (SC) at levels ≥ 38 mM. The MIC of the combination of nisin and hop extract was also tested. The use of these antimicrobials in combination showed synergistic effect as calculated by the fractional inhibitory concentration index (FIC_{index}). The hop extract and nisin had no toxic effects to the yeast, even with the use of extreme doses (up 1000x MIC). The use of nisin 30mg/mL and hop extract at 10 mg/L presented similar results to monensin at 5 mg/L in fermentation broth. The effectiveness of the formula developed was also evaluated in an industrial partner, where it showed the same effect as commercial products composed by hop extract and ClO_2 . Further studies should be performed to check stability of the formula developed for further commercialization.

Keywords: Natural antimicrobials. Ethanol production. Nisin. Hop extracts.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACPH	Ácido ρ-hidroxibenzóico
BAL	Bactérias ácido lácticas
CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and Drug Administration
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
LF	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LIS	Lisozima
LUP	Extrato de lúpulo
NISA	Nisina A
NISZ	Nisina Z
ppm	Partes por milhão
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TRP	Taxa de redução populacional
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 Doses e produtos avaliados com cultura mista em caldo CSN em teste de inibição em ensaio fermentativo.....	31
Tabela 3.2 Concentração inibitória mínima de diferentes antimicrobianos contra <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1629; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CCT 0848 e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCT 0122 <i>in vitro</i>	35
Tabela 3.3. Resultados da utilização de diferentes doses de nisina A em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).....	38
Tabela 3.4. Resultados da utilização de diferentes doses de extrato de lúpulo em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).....	40
Tabela 3.5 Resultados da utilização de doses de CIM da combinação de nisina A (3,75 mg/L) e extrato de lúpulo (0,625 mg/L) em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL),	

	população e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).....	41
Tabela 3.6	Resultados da utilização de diferentes doses de monensina sódica em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).....	42
Tabela 3.7	Resultados da utilização de diferentes doses de formulação composta por nisina e extrato de lúpulo nas proporções de 6:1 em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1. São apresentados os dados da população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).....	44
Tabela 3.8	Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, LactoStab e dióxido de cloro em teste industrial sobre a população de bastonetes no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação	46
Tabela 3.9	Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, LactoStab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a população de células de leveduras, no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de	

	levedo após centrifugação.....	47
Tabela 3.10	Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, Lactostab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a redução dos compostos solúveis totais e produção de etanol (°GL) após 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.....	48
Tabela 3.11	Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, lactostab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a % viabilidade e % de taxa brotamento de leveduras no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Etapas de obtenção de etanol de 1 ^a e 2 ^a geração.....	07
Figura 2.2 Processo da glicólise e fermentação em leveduras.....	10
Figura 2.3 Estruturas químicas dos principais α - e β -ácidos presentes no extrato de lúpulo.....	19

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O etanol é o biocombustível mais utilizado como substituinte aos combustíveis petro-derivados, sendo o Brasil e os Estados Unidos os líderes da produção mundial (ALI et al., 2013; CHUM et al., 2013). No Brasil, a produção de etanol foi estimulada após a primeira crise do petróleo na década de 70 com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) em 1975, que teve como objetivo o aprimoramento e desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998; ABREU et al., 2014). Estima-se que sejam produzidos 28,66 bilhões de litros de etanol durante a safra brasileira de cana-de-açúcar 2014-2015, o equivalente a 2,53% a mais do produzido na safra anterior, sendo os estados da região centro-sul responsáveis pela maior parte da produção nacional (CONAB 2014).

O etanol pode ser obtido a partir da fermentação de diferentes fontes de açúcares simples e polissacarídeos (BALAT & BALAT, 2009; HANSEN & KYRITSIS, 2009; MUSSATTO et al., 2010). O micro-organismo mais utilizado para conduzir o processo fermentativo é a levedura, principalmente cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GHORBANI et al., 2011; LIMAYEM et al., 2011). Esta espécie é intensivamente utilizada, pois é resistente às condições desfavoráveis do processo, isto é, às variações de temperatura e pH, presença de baixas concentrações de sulfito e altas concentrações de álcool (BAI et al., 2008). Além disso, parte da massa de levedura gerada na produção de etanol pode ser reutilizada como suplementação na alimentação de animais de produção, por ser uma excelente fonte de aminoácidos, proteínas e vitaminas (LANDELL et al., 1993; ZANUTTO et al., 2008). Contudo, diversos fatores afetam a viabilidade celular das leveduras durante o processo de fermentação, sendo a contaminação bacteriana o fator mais preocupante para as indústrias sucroalcooleiras (NARENDRANATH et al., 1997; LUCENA et al., 2010; LEITE et al., 2013). Contaminações bacterianas em concentrações acima de 10^7

UFC/mL afetam significativamente a capacidade de fermentação etanólica das leveduras, podendo diminuir em até 30% o rendimento da produção de etanol (BISCHOFF et al., 2007; COMPART et al., 2013).

Na maioria das usinas sucroalcooleiras do Brasil, a produção de etanol combustível ocorre de maneira não limpa favorecendo a proliferação bacteriana (DA SILVA-FILHO et al., 2005; LUCENA et al., 2010). Os micro-organismos contaminantes mais detectados são bactérias Gram positivas pertencentes à família *Lactobacillaceae*, as quais apresentam uma taxa de crescimento rápida, grande tolerância ao etanol e pH ácido, o que lhes permitem competir por nutrientes com a levedura no mosto de fermentação (BISCHOFF et al., 2007; TIUKOVA et al., 2014). Um dos gêneros mais identificados nas usinas sucroalcooleiras é *Leuconostoc*, caracterizado por bactérias Gram positivas, anaeróbias facultativas, sendo a espécie mais prevalente *Leuconostoc mesenteroides* (HOLT et al., 2001). As espécies deste gênero são conhecidas por serem formadores de goma a partir da conversão da sacarose em polímeros de dextrano, os quais podem levar ao entupimento de filtros e tubulações (LEATHERS et al., 2011). Este gênero também é produtor de ácido lático e um tipo de bacteriocina conhecida como mesenterocina, que apresenta potencial para aplicações na indústria de alimentos (DABA et al., 1991). Além de *Leuconostoc*, é comum a presença de espécies do gênero *Lactobacillus* como contaminantes do processo fermentativo, como *L. fermentum*, *L. vine*, *L. brevis* e *L. plantarum* (BISCHOFF et al., 2007; LUCENA et al., 2010). A cana-de-açúcar assim como o melaço utilizado como base da fermentação são substratos que naturalmente apresentam bactérias ácido lácticas (BAL). Portanto, a própria matéria prima pode ser o veículo dos micro-organismos contaminantes (LUCENA et al., 2010). Um dos graves problemas associados com a presença de algumas estirpes de *Lactobacillus fermentum* é a floculação do fermento, onde células das bactérias se aderem às leveduras causando a sedimentação do fermento e queda do rendimento da taxa de conversão de açúcar em etanol (LUDWIG et al., 2001; CUNHA et al., 2006).

O controle das contaminações é extremamente importante, já que além de interferir na produtividade da levedura, a contaminação bacteriana pode levar à corrosão das dornas de fermentação e outros equipamentos (MURPHREE et al., 2014).

Diversos métodos são utilizados como medida de controle destas contaminações, sendo que os mais comuns são a aplicação de antibióticos nas dornas de fermentação e as desinfecções ácidas sobre a massa de levedura (LUCENA et al., 2010; DA SILVA-FILHO et al., 2005). Os produtos mais utilizados para controlar as contaminações são antibióticos que atuam na síntese proteica das bactérias ou diretamente na síntese da parede celular (MUTHAIYAN et al., 2011). Antibióticos como virginiamicina, penicilina, eritromicina, estreptomicina, monensina e as combinações destes são geralmente utilizados no controle das contaminações bacterianas (NARENDRANATH et al., 2000; MURPHREE et al., 2014). A *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Commission* (EC) demonstram preocupação em relação ao uso intensivo de antibióticos nos processos industriais de fermentação etanólica, já que alguns estudos demonstraram que resíduos destas substâncias podem permanecer no subproduto que é adicionado às rações animais (COMPART et al., 2013). A presença de antibióticos na ração é proibida na Comunidade Europeia, e conseqüentemente, é vetada a utilização destes produtos em usinas sucroalcooleiras que comercializam levedura para este fim (EC, 2003; KAKLAMANOS et al., 2013). Extratos de levedura brasileira já sofreram embargos ao serem exportados para a Europa devido a presença de antibióticos (FEED INFO, 2008).

Antibacterianos de origem natural podem ser utilizados como substituintes aos antibióticos atualmente utilizados nas usinas sucroalcooleiras, fazendo com que não ocorra nenhum tipo de problema com a comercialização da massa de levedura derivada do processo fermentativo. Nas indústrias de alimentos esta prática é comum já que a aplicação de compostos naturais tem atraído a atenção dos consumidores em geral (MUTHAIYAN et al., 2011). Diversos estudos relacionados ao uso de compostos naturais nas indústrias sucroalcooleiras com a finalidade de reduzir a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação foram desenvolvidos (LIMAYEM et al., 2011; COMPART et al., 2013; LEITE et al., 2013).

Um dos poucos produtos naturais comercialmente disponíveis para controlar as contaminações bacterianas na fermentação etanólica é o extrato de lúpulo, sendo que seu uso em doses a partir de 3 mg/L causam redução significativa da carga bacteriana *in vitro* (LEITE et al., 2013). As atividades antibacterianas do lúpulo estão atribuídas

aos compostos amargos presentes nas flores femininas da planta conhecidas como humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos), que possuem atividade inibitória contra diversas bactérias Gram positivas (NATARAJAN et al., 2008; LEITE et al., 2013). Diversas versões de extrato de lúpulo compostas por concentrados de β - ou α -ácidos são comercializadas para uso específico no setor sucroalcooleiro. Contudo, este produto tem um alto custo (~US\$ 140,00/L), que muitas vezes inviabiliza a ampliação de sua utilização pela indústria.

Produtos que apresentam ação contra *Lactobacillus* também já foram testados em processos de fermentação industrial, já que estes são os principais contaminantes na produção de etanol (LIMAYEM et al., 2011; NERIS et al., 2013). Desta forma, pode-se destacar a ação da nisina, que é uma bacteriocina sintetizada por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, utilizada como conservante para alimentos desde a década de 60 (DELVES-BROUGHTON et al., 1996). O mecanismo de ação da nisina está relacionado a interações desta com a membrana celular dos micro-organismos, onde ela utiliza o Lipídeo II presente na membrana como molécula de ancoragem e causam a formação de poros. Isso leva à despolarização da membrana e extravasamento de moléculas essenciais às células, como K^+ , amino ácidos e ATP (MORENO et al., 1999; ABEE et al., 2003; COTTER et al., 2005). A atividade antimicrobiana da nisina abrange grande parte das espécies Gram positivas, sem apresentar efeitos tóxicos às leveduras (RAYMAN et al., 1981; PENNA et al., 2006; BORDIGNON-JUNIOR et al., 2012).

A aplicação de produtos naturais como substituinte à antibióticos no setor sucroalcooleiro, até o presente momento, é limitado a produtos compostos por extrato de lúpulo. Tendo em vista o potencial na expansão do uso de compostos naturais neste setor, o objetivo geral da presente dissertação foi o desenvolvimento de fórmulas com compostos antibacterianos de origem natural capazes de eliminar ou reduzir significativamente a população contaminante de bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*) durante o processo fermentativo na produção de etanol. Neste trabalho foram verificadas a ação de diferentes compostos, como extratos vegetais, ácidos fenólicos, enzimas, bacteriocinas e suas combinações.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

2.1.1 Histórico e perspectivas

O uso de etanol como combustível foi introduzido no Brasil na década de 30, durante o governo de Getúlio Vargas com a criação do Decreto nº 19.717, de 20 de Fevereiro de 1931, que indicava a obrigatoriedade de adicionar 5% de álcool à gasolina importada (ABREU et al., 2014). Apesar dos incentivos dados pelo governo para produção de etanol, este sempre esteve em disputa com a produção de açúcar. Porém, a preocupação com o meio ambiente e a grande crise do petróleo ocorrida em 1970 alteraram o quadro da produção nacional (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998). A criação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) em 1975 alavancou a produção em larga escala de etanol combustível no Brasil (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998; ANDRIETTA et al., 2011; ABREU et al., 2014).

O aumento da produção de etanol desde a década de 70 estimulou também o mercado automobilístico na criação de carros movidos a álcool combustível. O aumento na venda deste tipo de automóvel no Brasil nesta época foi de 98% e, após 36 anos da criação do programa, cerca de 95% dos carros vendidos no Brasil são FLEX-FUEL (AMORIM et al., 2011). Desde a criação do PROÁLCOOL a produção de etanol apresenta crescimentos anuais. Em 1975/76 a produção foi de 556 milhões de litros e estima-se que a safra 2014/15 resultará em 28,66 bilhões de litros de etanol, sendo os estados da região centro-sul responsáveis pela maior parte da produção nacional (CONAB 2014). Mesmo após crises enfrentadas pelo setor sucroenergético, o etanol ainda é o combustível mais utilizado como substituinte de combustíveis fósseis, sendo o Brasil e os EUA líderes na produção mundial (CHUM et al., 2013). Conforme 2º Relatório de Sustentabilidade gerado pela União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) em 2010, o setor sucroenergético foi responsável pela geração 2% do Produto

Interno Bruto do Brasil em 2008, além de ser um dos setores mais importantes na geração de emprego no país.

Muitas melhorias foram implantadas na produção de etanol desde o lançamento do PROÁLCOOL, como o melhoramento genético ou seleção de espécies, avanço nas técnicas de plantio, colheita e na automação industrial (MACEDO, 2007; CHUM et al., 2013). Os avanços biotecnológicos na produção de cana-de-açúcar permitiram ao Brasil a seleção de variedades mais produtivas, resistentes às pragas e doenças agrícolas e com maior concentração de carboidratos (BASSO et al., 2008). Além disso, a substituição da gasolina por etanol combustível contribui para redução de 90% da emissão de gases como CO₂, NO_x e SO_x pelos automóveis (UNICA, 2010; GHORBANI et al., 2011).

2.1.2 Obtenção do etanol

O etanol pode ser obtido a partir da fermentação de diferentes fontes de açúcares simples e polissacarídeos (BALAT & BALAT, 2009; HANSEN & KYRITSIS, 2009; MUSSATTO et al., 2010). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com 8,51 milhões de hectares ocupados por este plantio, sendo esta a principal matéria prima utilizada para obtenção de açúcar, etanol de primeira geração e etanol de segunda geração, sendo que este último utiliza bagaço da cana como matéria prima (DIAS et al., 2012; UNICA 2010).

O etanol é obtido em basicamente três fases: 1) obtenção de açúcares fermentáveis; 2) fermentação; e 3) separação do etanol, realizada por destilação (Figura 1). As etapas que ocorrem antes da primeira fase é que irão determinar se a produção de etanol é de primeira ou segunda geração, isto é, qual tipo de matéria prima será utilizado para extração de açúcares fermentáveis (MUSSATTO et al., 2010).

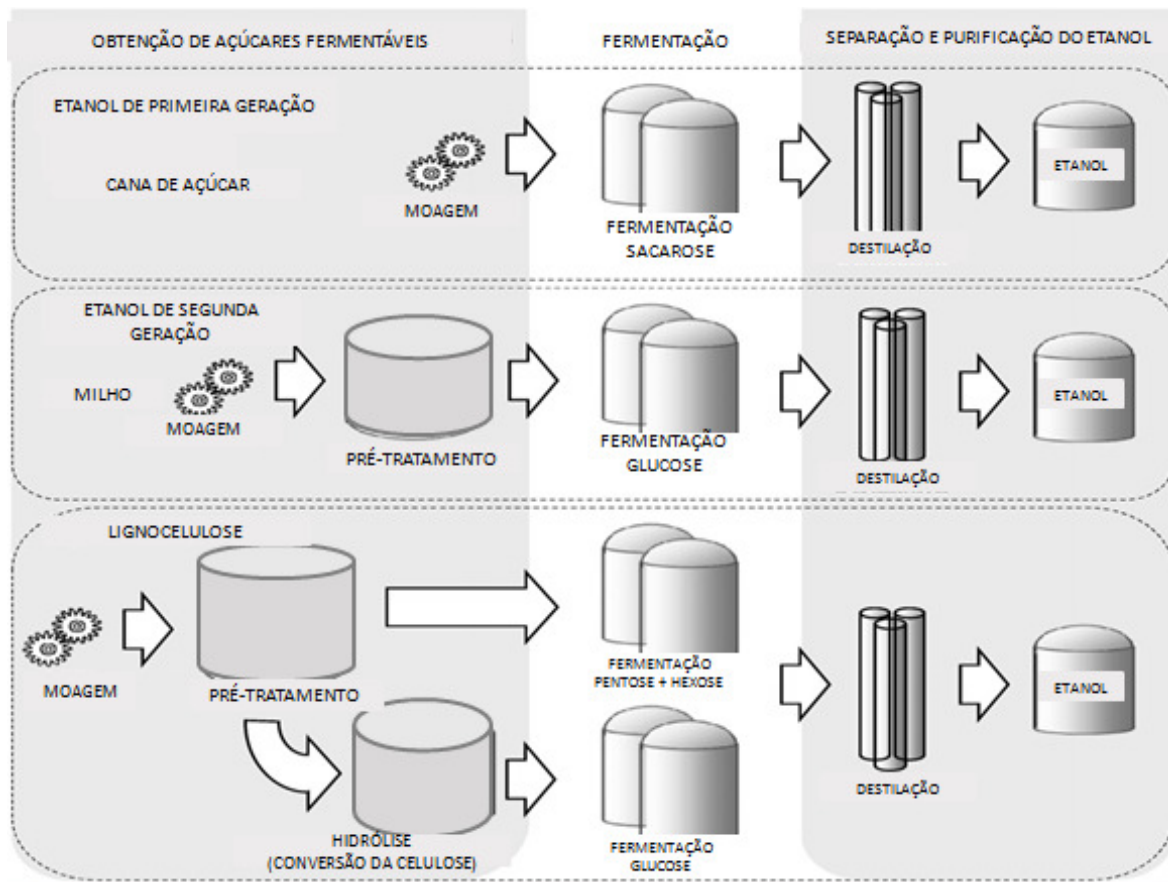


Figura 2.1 - Etapas da produção de etanol de 1ª e 2ª geração. Adaptado de MUSSATTO et al., 2010.

2.1.2.1 Etanol de primeira geração

Após a colheita, a cana-de-açúcar passa por processo de limpeza com água para retirada de sujidades e então é moída para extração do caldo de cana. O processo de moagem é realizado em uma sequência de moendas, sendo o caldo extraído nas moendas iniciais conhecido como caldo primário, o qual geralmente é destinado à produção de açúcar. Já o caldo secundário (derivados das moendas posteriores) é primariamente destinado à produção de etanol. Com o objetivo de retirar impurezas e para proporcionar clareamento da coloração do caldo, este passa por um processo conhecido como clarificação que pode ocorrer por sulfitação ou por bicarbonatação (ARAÚJO, 2007).

Após a clarificação, o caldo destinado a produção de etanol, segue para formação do mosto, que é um processo de preparo do líquido que será destinado à fermentação. Primeiramente a temperatura do caldo é elevada à 105°C e faz-se a correção do pH para ~ 4,5. Então, a quantidade de açúcares é corrigida por meio de diluição e o mosto tem sua temperatura diminuída para 30°C (ALCARDE, 2005). O caldo obtido após estes processos é conduzido à fermentação, que ocorre em tanques com capacidade de até 3 milhões de litros. A maioria das usinas brasileiras adota o processo de batelada alimentada e apenas 15% utilizam processos contínuos (GODOY et al., 2008; DIAS et al., 2012). Após a fermentação, as células de leveduras são recicladas e tratadas para remoção da contaminação bacteriana e o líquido resultante da fermentação, segue para o processo de destilação (DE PAIVA & MORABITO., 2007).

2.1.2.2 Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração é obtido pela fermentação de matérias primas lignocelulósicas. No Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar gerado na produção de etanol de primeira geração é a principal matéria-prima utilizada para produção de etanol de segunda geração (DIAS et al., 2012). A maior parte do bagaço da cana é destinada à queima para geração de energia em caldeiras, que é utilizada pela própria usina. Contudo, parte do bagaço pode ser destinado para outros fins, incluindo a produção de etanol de segunda geração (PIPPO et al., 2011). Macedo (2007) relatou que cada usina sucroalcooleira brasileira gerou em média um excesso de 48 milhões de toneladas de bagaço e palha de cana, já descontando o material utilizado na geração de energia e adubo para as plantações. A utilização deste subproduto pode ser considerada uma alternativa extra para diminuir a dependência aos combustíveis fósseis, sendo que a utilização desta biomassa pode vir a diminuir a demanda de cana-de-açúcar, reduzindo a “competição” por terras utilizadas para o cultivo de produtos destinados à alimentação humana e animal (DA ROSA & GARCIA, 2009; AMORIM et al., 2011).

2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL

A fermentação ocorre pela ação da levedura na transformação do açúcar presente na cana ou melaço em álcool. O principal gênero de levedura utilizado neste processo é *Saccharomyces*, pois apresenta osmotolerância, capacidade de manutenção de sua atividade metabólica em ambientes ácidos e de transformar rapidamente açúcar em álcool (ANDRIETTA et al., 2007). Durante a fermentação alcoólica as leveduras produzem majoritariamente o etanol (~93%), e outros compostos menores como glicerol, succinato e malato (~7%). A fermentação ocorre em tanques com capacidade média de 300 mil litros e com alta densidade de levedura (10% à 15% m/v) (GODOY et al., 2008).

Grande parte das usinas brasileiras adotam o método de reciclagem das células de levedura. Neste método ocorre a centrifugação da massa de levedura seguida de lavagem com ácido para eliminação da contaminação bacteriana. O reciclo de leveduras aumenta o rendimento das fermentações, já que as leveduras irão permanecer em tanques de fermentação por um período limitado, sendo então substituídas por células novas que priorizam a utilização do açúcar para a produção de etanol ao invés de gerar outros metabólitos (AMORIM et al., 2011). Além disso, a alta densidade populacional de levedura desde o início do processo faz com que a conversão de açúcar em etanol seja rápida, sendo que o tempo total de fermentação nas dornas varia de 6 à 11 h (BASSO et al., 2008).

O processo realizado pelas leveduras para obtenção de álcool é conhecido como fermentação, onde a molécula de glicose é degradada através da glicólise em piruvato, o qual é degradado no processo fermentativo em CO₂ e álcool sem o consumo de oxigênio (processo anaeróbio) (Figura 2) (BAI et al., 2008).

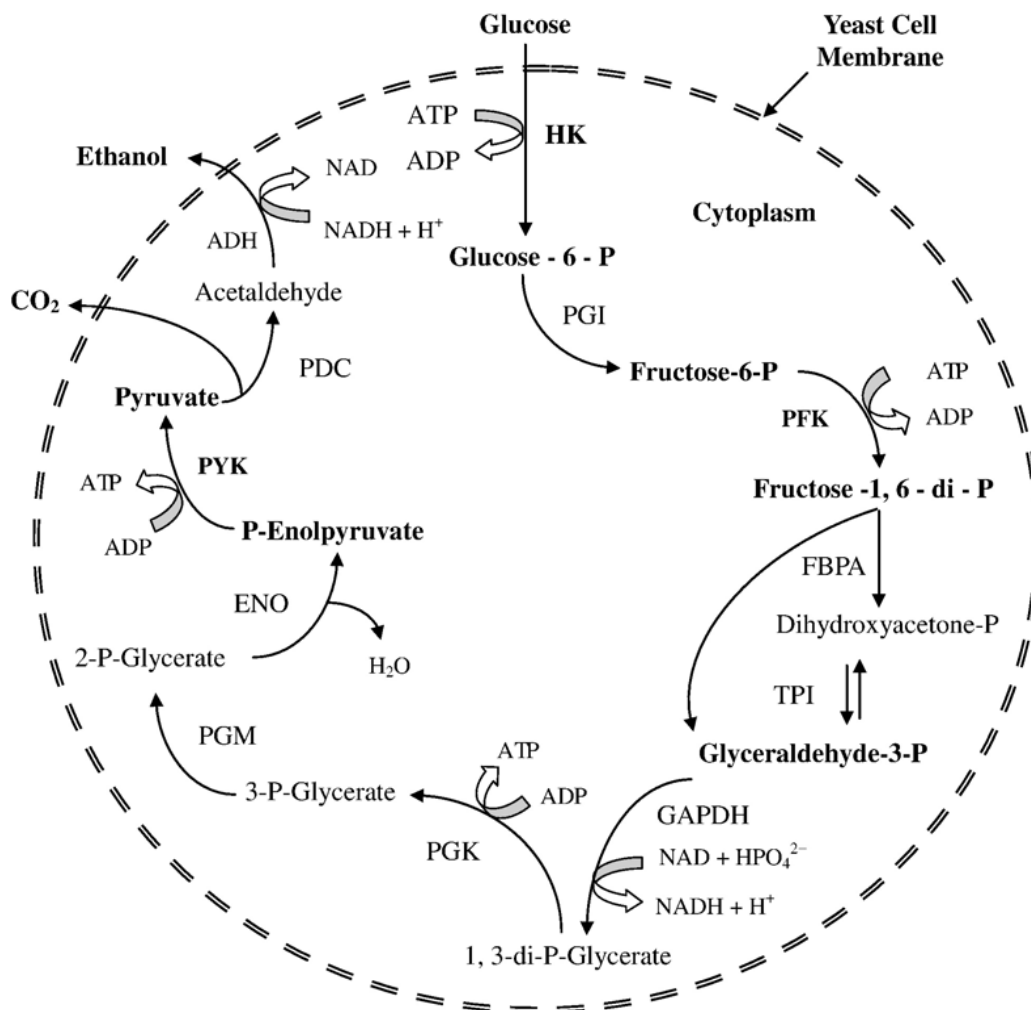


Figura 2.2 – Processo da glicólise e fermentação em leveduras. Fonte: BAI et al., 2008

2.2.1 Seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

No início da produção de etanol no Brasil a fermentação ocorria de forma natural, ou seja, por ação das leveduras nativas da cana-de-açúcar (AMORIM et al., 2005). Com o passar dos anos as usinas passaram a utilizar fermento de panificação para iniciar os ciclos de produção, pois este era um processo de baixo custo e as leveduras eram facilmente adquiridas no mercado. Porém, observou-se que estes organismos não eram capazes de competir com as leveduras selvagens presentes na cana e não toleravam o processo de reciclo de células (BASSO et al., 2008). Atualmente, o processo é conduzido por leveduras selvagens que, após identificação e avaliação de desempenho, se destacaram por apresentarem baixo tempo para

fermentação do meio, resistência ao ambiente e processo de reciclagem, e rápida reprodução (DA SILVA-FILHO et al., 2005).

No trabalho realizado por BASSO et al (2008) foram analisadas 350 estirpes de *S. cerevisiae* para observar sua resistência e produtividade na fermentação de caldo de cana-de-açúcar. Foram utilizadas amostras de diferentes marcas de fermento de panificação e cepas isoladas de 78 usinas sucroalcooleiras de todo o Brasil. Após isoladas e identificadas por cariotipagem, as cepas passaram por processo de fermentação laboratorial e em seguida foram adicionadas a processos industriais, dando início ao ciclo de fermentação em usinas. Neste trabalho observou-se que em um período de 20 à 30 dias as cepas de panificação são rapidamente substituídas por linhagens selvagens. Já as cepas previamente isoladas de usinas, como JA-1, CR-1 e SA-1, permanecem no processo durante um período maior, de aproximadamente 180 dias. Acredita-se que as condições do processo encontrado no Brasil sejam relevantes para seleção de novas espécies com atividade metabólica adaptada a temperaturas mais elevadas. A rapidez na conversão do açúcar em etanol gera o aumento da temperatura nos tanques de fermentação e, apesar de tolerar variações de temperatura, sabe-se que o crescimento ideal dessas leveduras ocorre à temperaturas em torno de 28°C. Porém, é comum que o processo ocorra com temperatura um pouco mais elevada, em torno de 34°C, devido a temperatura média brasileira (ANDRIETTA et al, 2011). Após a realização da identificação molecular e de testes fermentativos é possível destacar seis cepas comercializadas no Brasil que apresentam as melhores taxas de conversão alcoólica, tolerância à pH ácido e capacidade de multiplicação: PE-2; BG-1; VR-1; CR-1; CAT-1 e SA-1 (DA SILVA-FILHO et al., 2005).

A permanência de algumas estirpes durante uma determinada safra é dependente da época da colheita (períodos com mais chuvas ou secas) e da adição de melaço para fermentação, sendo que algumas espécies prevalecem em concentrações maiores de açúcares. É importante ressaltar que algumas espécies selvagens podem acarretar alterações não desejáveis, como a formação de espuma, maior tempo para fermentação do substrato e floculação. Portanto, o acompanhamento constante do processo e utilização de cepas específicas pode trazer melhor desempenho para as usinas (BASSO et al., 2008).

2.2.2 Uso de levedura na alimentação animal

Na produção de etanol, além da geração de grande quantidade de bagaço de cana, também são formados outros subprodutos, como a massa de levedura. Esta pode ser utilizada como suplementação na alimentação de animais por ser uma excelente fonte proteica de alta digestibilidade e por apresentar baixo custo para comercialização (ZANUTTO et al., 2008). A parede celular das leveduras apresenta mananoligossacarídeo que atuam como beneficiários no sistema imunológico dos animais de produção, com a capacidade de influenciar positivamente a microbiota do sistema gastrointestinal desses animais (SPRING et al., 2000; DAVIS et al., 2002)

A levedura destinada à alimentação animal recebe o nome de levedura de recuperação, a qual é obtida pela centrifugação do levedo utilizado na fermentação, seguida de um processo de secagem (ex. rolos rotativos, spray-dryer e turbo-dryer) (ZANUTTO et al., 2008). Conforme descrito por FURTADO et al (2010), as leveduras podem ser adicionadas em rações preparadas ou à pastagens/fenos destinados à equinos. A adição de leveduras à alimentação de cavalos pode melhorar a digestibilidade da celulose, aumentar a população de bactérias lácticas no intestino dos animais e melhorar a eficiência da microbiota do trato digestivo (JOUANY et al., 2009). Nos experimentos realizados por Davis et al (2002) foram adicionados doses a partir de 20 ppm de Cu e MOS (mananoligossacarídeo) as rações dadas a leitões, neste experimento foi possível observar que os grupos alimentados com Cu e MOS apresentaram melhoras no desempenho produtivo, consumo de ração e aumento de peso em comparação aos grupos alimentados apenas por adição de Cu ou sem a adição de suplementos.

Contudo, desde o início dos anos 2000, as autoridades de segurança alimentar da Comunidade Europeia estabeleceram normas referentes à proibição do uso de antibióticos e aditivos como melhoradores de desempenho na alimentação de animais de produção, com objetivo de garantir proteção à saúde humana, saúde animal e ao meio ambiente (EC, 2003). Sabe-se que para controlar a contaminação bacteriana presente na produção de etanol, faz-se necessário o uso de antibióticos e outros métodos de desinfecção. Porém, os resíduos destes antibióticos podem ser detectados

na levedura derivada da indústria sucroalcooleira, sendo esta a causa do embargo de leveduras de destilarias brasileiras exportadas para a Europa (FEED INFO, 2008; MUTHAIYAN et al., 2011; COMPART et al., 2013). A maioria dos antibióticos utilizados para controlar as contaminações bacterianas em usinas sucroalcooleiras é de uso comum na medicina humana e animal devido ao seu baixo custo. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas e produtos para controle dessas contaminações (MANITCHOTPISIT et al., 2013).

2.3 CONTAMINAÇÕES DO PROCESSO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Atualmente a contaminação bacteriana é considerada um desafio para os produtores de etanol, pois em concentrações acima de 10^7 UFC/mL afetam significativamente a taxa de conversão de açúcar em etanol das leveduras, resultando em prejuízos econômicos para o setor (MUTHAIYAN et al. 2010). A contaminação encontrada na produção de etanol derivado de cana-de-açúcar pode ser oriunda de diversas fases do processo, sendo a logística de produção uma das maiores contribuidoras para o aumento da contaminação (LUCENA et al., 2010). O tempo entre colheita, transporte e moagem da cana é determinante para a proliferação ou não de micro-organismos na matéria prima (NARENDRANATH et al., 1997). É importante lembrar que todo o processo de produção de etanol não ocorre sob as mesmas condições de higiene encontradas na indústria de alimentos (LEITE et al., 2013).

Os problemas causados por altos níveis destas contaminações bacterianas são a formação de ácido acético e láctico, a formação de goma, a floculação do fermento, o entupimento e formação de biofilmes nas tubulações (LUCENA et al., 2010). Além disso, a presença de BAL diminui em até 30% o rendimento da produção de etanol (BISCHOFF et al., 2007; COMPART et al., 2013). Conforme Ebert (2007), níveis elevados de contaminação em uma planta de produção de etanol são sinônimos de possíveis paradas de produção para limpeza total das dornas e tubulações, gerando perdas financeiras por atrasos na produção. Contaminações elevadas também favorecem a formação de biofilmes bacterianos na dorna e nas tubulações, que

funcionam como reservatórios de células para contaminações crônicas do mosto de fermentação (SKINNER & LEATHERS, 2004; MUTHAIYAN et al., 2010).

2.3.1 Principais contaminantes da produção de etanol

As bactérias presentes como contaminantes na produção de etanol são na sua maioria Gram positivas pertencentes principalmente à família *Lactobacillaceae*, que possui espécies homofermentativas e heterofermentativas (MUTHAIYAN et al., 2011; SILVA et al., 2013). É frequente a presença de BAL pois, apresentam baixo tempo de geração, adaptação à ambientes ácidos com a presença de etanol e são capazes de formar biofilmes, havendo uma reciclagem constante dessas células na dorna de fermentação (NARENDRANATH et al., 1997; MANITCHOTPISIT et al., 2013).

Segundo CHANG et al (1997), espécies de *Lactobacillus* heterofermentativos como *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus salivarius*, e heterofermentativos facultativos como *Lactobacillus casei*, são os principais contaminantes de processos fermentativos. Porém, espécies contaminantes de outros gêneros também são encontradas, como *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* e *Weisella* (SKINNER & LEATHERS, 2004). A maioria destes contaminantes são produtores de ácido láctico ou acético, sendo que a presença destes ácidos afeta o metabolismo das leveduras diminuindo a taxa de conversão de açúcar em etanol. Além disso, quando os dois ácidos estão presentes concomitantemente eles afetam sinergicamente a levedura, sendo necessária uma concentração menor destes compostos para causar efeitos negativos sobre o seu metabolismo (GRAVES et al., 2007). BASSO et al (2014) realizaram a fermentação de mosto a base de melão e caldo de cana inoculados com diferentes espécies *Lactobacillus*. Foi possível observar neste experimento que a cepa de *L. fermentum* (espécie heterofermentativa) produziu ao menos três metabólitos, sendo eles manitol, ácido láctico e ácido acético, e a presença deste contaminante diminui 0,45 g.L⁻¹ da produção de etanol, equivalente a 5,51% a menos se comparado a amostras sem contaminantes. Assim como outros *Lactobacillus*, a presença de *L. fermentum* diminui a viabilidade celular das leveduras e conforme estudos em escala laboratorial, este

micro-organismo apresenta resistência ao tratamento com monensina sódica (3 mg/L) ou à reciclagem de células de levedura com ácido sulfúrico (DE PAULA NOBRE et al., 2007). *Leuconostoc* também é um gênero bacteriano muito identificado nas usinas brasileiras. Trata-se de micro-organismo Gram positivo, anaeróbio facultativo, com capacidade de formação de biofilmes corrosivos e de goma a partir da conversão da sacarose em polímeros de dextrano. Esta goma pode causar o entupimento de filtros e tubulações (MESSETTI et al., 2010; LEATHERS et al., 2011).

Leveduras selvagens também são frequentes contaminantes dos processos fermentativos. Gêneros como *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Saccharomyces* selvagens normalmente estão presentes na matéria prima utilizada para fermentação e estão associadas à diminuição da produtividade na produção de etanol (BASÍLIO et al., 2008; BECKNER et al., 2011). O gênero *Brettanomyces* também é conhecido por ser produtor de ácido acético e por isso é comparado aos contaminantes bacterianos. Estas leveduras são capazes de produzir ácidos em baixos níveis de oxigênio e são mais identificadas como contaminantes em usinas que adotam processos contínuos (ABBOTT & INGLEDEW, 2005; DE SOUZA LIBERAL et al., 2007).

2.4 MEDIDAS DE CONTROLE DOS CONTAMINANTES

Atualmente, as medidas de controle contra contaminações bacterianas nas indústrias sucroalcooleiras compreendem tratamentos com antibióticos nas dornas de fermentação e desinfecções ácidas sobre as leveduras, onde há a centrifugação das leveduras e lavagens ácidas com adição de H₂SO₄. Após este tratamento, as leveduras passam por um período de “descanso” e são devolvidas aos tanques de fermentação (DA SILVA-FILHO et al., 2005; LUCENA et al., 2010). Os principais antibióticos utilizados no Brasil são virginiamicina, penicilina, eritromicina, estreptomicina, monensina e combinações entre estes compostos (NARENDRANATH et al., 2000; MURPHREE et al., 2014).

Sabendo que a erradicação total dos contaminantes é algo extremamente difícil, a intenção dos produtores é manter a contaminação em níveis baixos, sendo aplicados procedimentos operacionais para desinfecções sistêmicas do processo e manutenções preventivas nas plantas das usinas (EBERT, 2007). Os antibióticos utilizados na dorna de fermentação, também são utilizados com intuito de reduzir a formação de biofilmes das tubulações em algumas usinas. Porém, biofilmes bacterianos apresentam grande resistência à ação de desinfecções químicas, sendo necessárias doses no mínimo 100 vezes superiores àquelas necessárias para o controle de células planctônicas (RICH et al., 2011). Além disso, o uso abusivo de antibióticos pode ocasionar o aparecimento de cepas geneticamente resistentes, sendo comum o isolamento de bactérias resistentes à penicilina e virginiamicina em usinas sucroalcooleiras (LUSHIA et al., 2005).

Como medida de prevenção para estas contaminações, além dos procedimentos de rotina, deve-se projetar bem a construção de uma usina ou alterar as instalações nas plantas já construídas, pois, é importante evitar tubulações ou tanques com a presença de soldas ou dobras, onde haja locais propícios ao acúmulo de líquido (ponto morto). Espera-se que haja um bom fluxo de líquidos durante todo o processo evitando a formação de áreas de baixo fluxo que favoreçam a proliferação bacteriana (EBERT, 2007). Além disso, o controle sobre estas contaminações pode ser obtido com o desenvolvimento de novas tecnologias e aplicação de diferentes compostos antimicrobianos (PENG et al., 2012).

A busca por alternativas para controle dos contaminantes foi intensificada nos últimos anos, sendo que alguns critérios são importantes na aplicação de novos produtos, entre eles: o produto não pode apresentar toxicidade às leveduras; deve ser de fácil manipulação e administração; deve atingir a maioria ou todos os contaminantes sem propiciar o desenvolvimento de resistência; deve ser de baixo custo e não oferecer toxicidade a humanos, animais e ao meio-ambiente em geral (MUTHAIYAN et al., 2011).

2.4.1 Tratamentos químicos

A maioria das usinas adotam o método de reciclagem de células de leveduras. Para isso deve-se eliminar a contaminação bacteriana que está associada ao fermento realizando procedimentos de limpeza ácida depois da centrifugação da massa de levedura, onde o pH do fermento é alterado de aproximadamente 4,5 para 2,0 com adição de ácido sulfúrico. A massa de levedura é mantida neste pH, em um período chamado de descanso, por 2 horas. Este procedimento já é utilizado em indústrias cervejeiras há muito tempo, porém com a acidificação feita com ácido fosfórico (CUNNINGHAM & STEWART, 1998; MARQUES & SERRA, 2004).

Produtos químicos com ação oxidante também tem sido utilizados para reduzir a população bacteriana durante a reciclagem da levedura. Em um estudo de escala laboratorial para desinfecção da massa de levedura com aplicação de peróxido de hidrogênio associada ao procedimento de reciclagem de células, resultou na redução de 0,533 log UFC/mL da população de *L. fermentum* com 40 mM de H₂O₂. Doses maiores foram mais efetivas na redução da contaminação bacteriana, atingindo uma redução de 2,159 log UFC/mL com 200 mM. Porém, esta dose apresentou leve diminuição da população das leveduras em 0,221 log UFC/mL (CHANG et al, 1997). O uso de dióxido de cloro também é muito comum no processo fermentativo das usinas brasileiras. Doses a partir de 10 ppm são eficazes no controle de algumas espécies de *Lactobacillus*, porém, doses a partir de 50 ppm podem ser tóxicas às leveduras (MENEHIN et al., 2008).

Além da adição de compostos químicos na desinfecção da massa de levedura, aconselha-se seu uso em outros equipamentos como os trocadores de calor. Os trocadores de calor apresentam superfícies ideais para adesão de micro-organismos, que aliado à temperatura mantida nestes equipamentos e a presença de nutrientes no caldo que será resfriado, oferece um ambiente ideal para proliferação bacteriana. Portanto, é importante realizar a desinfecção constante dos trocadores de calor, a qual é realizada periodicamente através da limpeza ácida com ácido sulfúrico ou alcalina com soda cáustica (EBERT, 2007).

2.4.2 Compostos de origem vegetal ou animal

A grande preocupação com problemas de saúde pública associados à resistência de micro-organismos devido ao uso abusivo de antibióticos, torna a utilização de compostos naturais uma excelente medida para o controle microbiológico (RÜCKLE & SENN, 2006). Um importante ponto para escolha de novas alternativas para controle dos contaminantes no processo de fermentação alcoólica é a preservação das células de leveduras (LEITE et al., 2013).

O extrato da *Humulus lupulus* (lúpulo), originária da China, contém compostos polifenólicos que apresentam ação bactericida, propriedades sedativas, diuréticas, antitumorais e efeitos farmacológicos no sistema nervoso central no tratamento de pacientes com distúrbios do sono (ZANOLI & ZAVATTI, 2008; ROZALSKI et al., 2013). Extratos são compostos principalmente por terpenos, chalconas, flavonóides glicosilados e substâncias amargas como floroglucinol (5% à 20% do estróbilo da planta) (ZANOLI & ZAVATTI, 2008). Suas propriedades bactericidas vêm sendo pesquisadas desde o século XIX, as quais são relacionadas aos ácidos responsáveis pelo amargor do extrato das flores femininas da planta (MUTHAIYAN et al., 2011; VRIESEKOOOP et al., 2012). O extrato de lúpulo é um dos ingredientes na produção de cerveja (17 ppm a 55 ppm), o qual confere propriedades de aroma e sabor ao produto final, além de evitar contaminações bacterianas (SUZUKI et al., 2006; ROZALSKI et al., 2013). As propriedades antibacterianas do lúpulo estão atribuídas às humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos) (Figura 3), que possuem atividade inibitória contra bactérias Gram positivas (NATARAJAN et al., 2008; LEITE et al., 2013), como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus* (SRINIVASAN et al., 2004). A ação do extrato de lúpulo está inteiramente associada com a reatividade de seus componentes, que geram um elevado estresse oxidativo nas células bacterianas ocasionando interferências no transporte de metabólitos na membrana celular das bactérias e modificação do pH intracelular, levando as células à morte (ZANOLI & ZAVATTI, 2008; DA SILVA & DE FARIA, 2008).

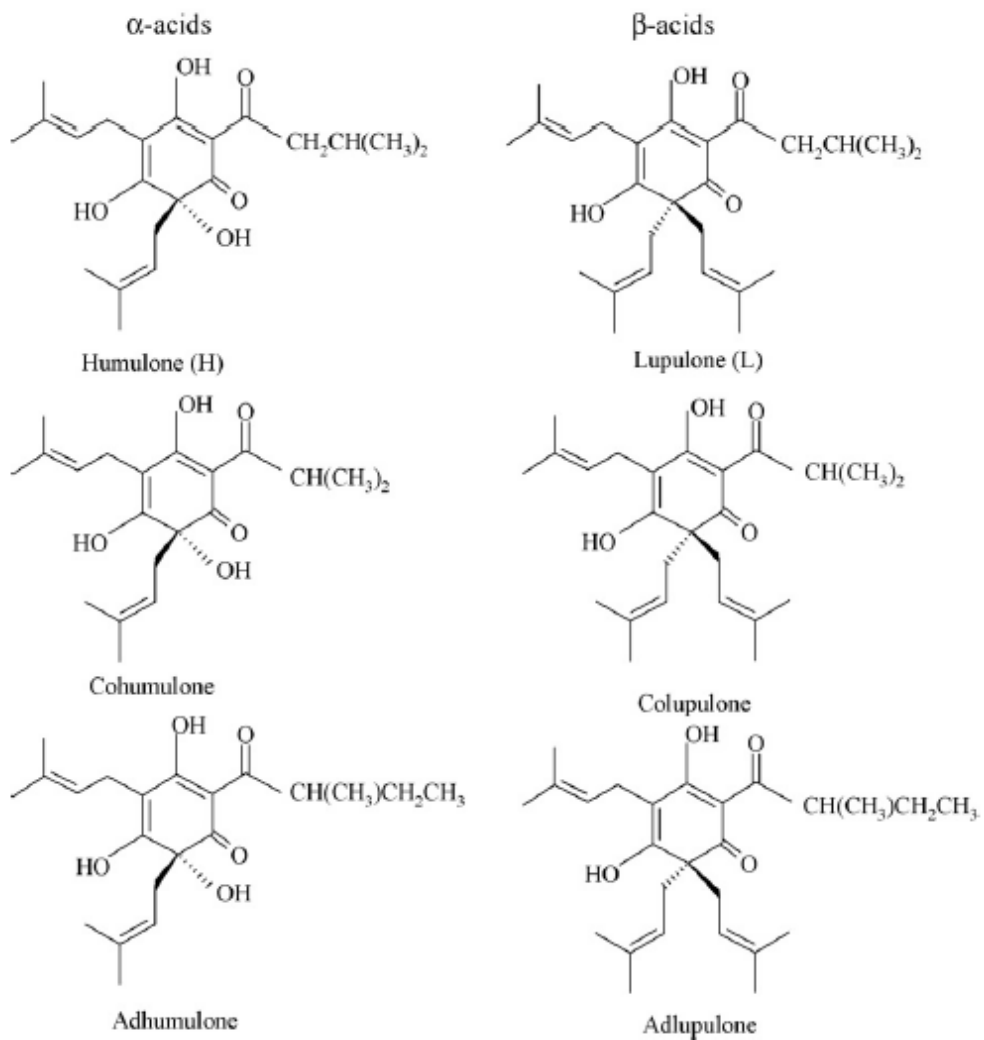


Figura 2.3 –Estruturas químicas dos principais α - e β -ácidos presentes no extrato de lúpulo. Fonte: ZANOLI & ZAVATTI, 2008.

Existem versões comerciais do extrato de lúpulo compostas majoritariamente por β -ácidos ou α -ácidos destinados ao setor sucroalcooleiro. Estudos realizados por Rückle & Senn (2006), demonstraram que as populações de BAL, assim como, a produção de ácido láctico e acético, foram inibidas com doses entre 30 e 80 mg/L de Lactostab[®] e Isostab[®] (ricos em α -ácidos) em processos que utilizaram beterraba e trigo como matéria prima para fermentação. Foram realizadas fermentações em escala laboratorial utilizando caldo de cana contaminado e aplicação de 10 ppm de extrato de lúpulo (BETABIO 45[®], rico em β -ácidos), houve redução de 3,087 log UFC/mL da

contaminação bacteriana após 8 h de fermentação, sem efeitos tóxicos às leveduras (LEITE et al., 2013).

Contaminantes bacterianos também geram problemas que vão além da inibição do metabolismo das leveduras, como a formação de goma e biofilmes corrosivos. Assim, foi verificada a ação do óleo de rícino, derivado de mamona, no controle populacional de *Leuconostoc mesenteroides* e, conseqüentemente, sobre a formação de goma por este micro-organismo (MESSETTI, 2010). Concentrações acima de 1% de óleo de rícino diminuíram a formação de goma em 17,53% com 24 h de contato, e com a adição de 0,2% do produto foi possível observar uma diminuição de 56,56% da concentração de *L. mesenteroides* após 26 h de contato com o produto (MESSETTI, 2010).

Outro composto com atividade bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas é a lisozima, que é uma enzima capaz de clivar as ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina presentes na camada de peptidoglicano de bactérias (MCKENZIE & WHITE, 1991; CHUNG & HANCOCK, 2000). Em processos fermentativos, em especial na indústria da vinicultura, a lisozima pode ser utilizada com intuito de diminuir a carga microbiana de alguns gêneros contaminantes de vinhos, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*, reduzindo o uso de dióxido de enxofre que, com o consumo crônico, pode causar danos à saúde humana (BARTOWSKY, 2009). Com a aplicação de 500 mg/L de lisozima sobre mosto de vinho contaminado, foi possível observar que algumas bactérias apresentaram sensibilidade à ação desta enzima, como *Oenococcus oeni* e *L. brevis*, porém, outras bactérias apresentaram resistência à lisozima, como *L. plantarum*, que após 16 h em contato com produto apresentou aumento da população bacteriana (AZZOLINI et al., 2014). No estudo de Limayem et al. (2011) a lisozima utilizada isoladamente não apresentou concentração inibitória mínima (>100 mg/mL) contra algumas estirpes de *Lactobacillus* contaminantes da produção de etanol, como, *L. plantarum* ATCC 8014; *L. plantarum* WCFS1; *L. casei* ATCC 11578 e *L. sakei* 23K. A única exceção foi *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797, que foi inibido com valores de 100 mg/mL (LIMAYEM et al., 2011).

O uso de ácidos fenólicos é eficiente no controle de diferentes bactérias contaminantes das indústrias de alimentos, incluindo espécies de *Lactobacillus* (BALASUNDRAM et al., 2006; CUEVA et al., 2010; SÁNCHEZ - MALDONADO et al., 2011). Em avaliações da atividade antimicrobiana de 13 diferentes ácidos fenólicos contra diferentes espécies de *Lactobacillus*, foi possível observar que o ácido 4-hidroxibenzóico foi o composto mais ativo, sendo que doses $\geq 62,5$ mg/L foram inibitórias para *L. paraplantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis* (CUEVA et al., 2010). Estes ácidos são abundantes na natureza e possuem um baixo custo comercial. Contudo, não foi encontrado na literatura, até o presente momento, nenhum estudo que demonstre sua utilização em processos de produção de etanol.

2.4.3 Compostos naturais de origem microbiana

Bacteriocinas são grupos heterogêneos de peptídeos sintetizados por diversas bactérias, que atuam contra o crescimento de outros micro-organismos (DOBSON et al., 2012). Acredita-se que todas as bactérias apresentam a capacidade de produzir bacteriocinas, podendo uma espécie produzir mais de um tipo de bacteriocina (KLAENHAMMER, 1993; WIRAWAN et al., 2006).

A nisina é uma bacteriocina sintetizada por *Lactococcus lactis* subs. *lactis* que pertence ao grupo dos lantibióticos (INGRAM et al., 1969; SCHNEIDER et al., 2011; SCHILLINGER, 2014). No Brasil, a nisina é aprovada para comercialização e utilização como conservante na indústria de alimentos desde a década de 90 (JOZALA, 2013), mas, em outros países, ela já é autorizada para uso na produção de alimentos desde 1969, após aprovação da Food and Agriculture Organization (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (PUNYAUPPA-PATH et al., 2015). A primeira versão comercial da nisina foi desenvolvida por Aplin & Barrett em 1957, conhecida como Nisaplin® (DELVES-BROUGHTON et al., 1996). Existem algumas variantes da nisina que são classificadas conforme sua seqüência peptídica com algumas diferenças na posição dos aminoácidos, podendo-se citar as nisininas A, Z, M e Q sintetizadas por *Lactococcus lactis*, e nisina U e U2 sintetizadas por *Streptococcus* sp. (WIRAWAN et al., 2006; PIPER et al., 2011). A diferença nas variantes de nisina são caracterizadas

por alterações nas cadeias peptídicas. Por exemplo, a presença do amino ácido histidina na posição 27 da sequência peptídica de nisina A é substituída pela asparagina na sequência peptídica da nisina Z (WIRAWAN et al., 2006).

A atividade antimicrobiana da nisina abrange grande parte das espécies de bactérias Gram positivas. Contudo, este composto apresenta baixa atividade contra bactérias Gram negativas, leveduras e bolores (RAYMAN et al., 1981; PENNA et al., 2006; BORDIGNON-JUNIOR et al., 2012). O mecanismo de ação da nisina está associado às interações desta com a membrana celular dos micro-organismos alvo, a qual ocorre em duas etapas. Primeiro a bacteriocina realiza interações hidrofóbicas ou eletrostáticas com componentes aniônicos da parede celular. Então, a nisina interage com o Lipídeo II, molécula essencial para biossíntese do peptidoglicano, impedindo assim a formação *de novo* da parede celular. Isso leva à formação de poros, gerando a despolarização da membrana e extravasamento de moléculas essenciais como K⁺, amino ácidos e ATP (ABEE et al., 2003; COTTER et al., 2005; PUNYAUPPA-PATH et al., 2015).

A nisina quando testada contra bactérias contaminantes da indústria de bioetanol foi eficaz contra a maioria das cepas de *Lactobacillus* com concentração inibitória mínima (CIM) < 50 mg/L (LIMAYEM et al., 2011). Com objetivo de verificar a ação da nisina na preservação de vinhos, Neris et al (2013) testaram a ação do produto comercial Nisaplin[®] contra cepas de *Lactobacillus* e *Bacillus* através do teste de sensibilidade por disco difusão. Observou-se que espécies como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*, apresentaram maior sensibilidade à nisina em concentrações de 100 UI/mL. Também foi verificada a ação do produto em vinhos previamente contaminados com um *pool* destas bactérias. A mesma dose de 100 UI/mL foi capaz de reduzir aproximadamente 2,4 log UFC/mL do pool de bactérias em relação ao controle.

O uso de antimicrobianos de origem natural é atraído por fortes tendências de mercado, pois estão relacionados com a promoção de saúde e bem estar de consumidores. Contudo, a aplicação de compostos naturais na indústria de produção de etanol combustível limita-se aos derivados de extrato de lúpulo associados ou não a

outras técnicas de limpeza e desinfecção da massa de levedura. Como citado anteriormente, alguns antimicrobianos de origem natural são efetivos no controle da população de BAL contaminante da produção de etanol. Potencialmente, a aplicação destes compostos é viável para substituir os antibióticos utilizados normalmente, possibilitando a exportação de levedo para países europeus.

CAPÍTULO 3

INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL

RESUMO

A presença de contaminantes bacterianos em níveis acima de 10^7 UFC/mL na produção de etanol afeta diretamente o metabolismo das leveduras, reduzindo em até 30% o volume da produção. Antibióticos são utilizados para reduzir essas contaminações, porém, seus resíduos podem ser detectados na massa de levedura, inviabilizando a comercialização deste subproduto nos países europeus. Perante isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de compostos naturais como extrato de lúpulo (Betabio 45[®]), ácido 4-hidroxibenzóico, nisina A, nisina Z e lisozima, contra *Lactobacillus fermentum* (LF) e *Leuconostoc mesenteroides* (LM) isolados de usinas sucroalcooleiras brasileiras, e desenvolver uma fórmula antimicrobiana eficaz no controle destes contaminantes em processos fermentativos. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antimicrobiano natural foi determinada para LM e LF, assim como a CIM da combinação de extrato de lúpulo e nisina. Posteriormente, a nisina, o extrato de lúpulo e sua combinação foram usados em testes fermentativos laboratoriais contendo caldo de cana suplementado adicionado de LM, LF e *Saccharomyces cerevisiae* (SC). O extrato de lúpulo mostrou a menor CIM (5 mg/L), seguido de nisina (30 mg/L) e de ácido 4-hidroxibenzóico (70 mM). O ácido 4-hidroxibenzóico apresentou efeitos tóxicos à levedura na dose de 38 mM e juntamente com a lisozima, que não apresentou inibição das bactérias em doses de até 125 mg/L, foram descartados do estudo. Houve efeito sinérgico na combinação de nisina (3,75 mg/L) e extrato de lúpulo (0,625 mg/L) conforme índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Assim, foi desenvolvida uma formulação única contendo nisina e extrato de lúpulo nas proporções determinadas na CIM da combinação destes. Estes antimicrobianos apresentaram redução da população bacteriana em testes de fermentativos laboratoriais, onde foram comparados ao uso de monensina sódica e em testes industriais. O extrato de lúpulo e a nisina não foram tóxicos à levedura, mesmo com uso de doses extremas (até 1000 x CIM). A eficácia da fórmula desenvolvida também foi avaliada em um parceiro industrial, onde mostrou o mesmo efeito que os produtos comerciais compostos por extrato de lúpulo (LactoStab[®]) com doses de 40 mg/L e ClO₂ (dióxido de cloro) com doses de 200 mg/L. Novos estudos devem ser realizados para verificar a estabilidade da fórmula desenvolvida para sua posterior comercialização.

Palavras chaves: Lúpulo. Nisina. Antimicrobianos naturais. *Lactobacillus fermentum*. *Leuconostoc mesenteroides*.

Abstract

On ethanol production, the presence of bacterial contaminations at levels $>10^7$ CFU/mL interfere significantly with the yeast metabolism, reducing the alcoholic fermentation by 30%. Antibiotics are used to reduce this contamination, but residues of these antibiotics can be detected in dry yeast, forbidden the marketing of this by-product in several countries. In this set, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of natural compounds such as hops extract (Betabio 45[®]), 4-hydroxybenzoic acid, nisin A, nisin Z and lysozyme against *Lactobacillus fermentum* (LF) and *Leuconostoc mesenteroides* (LM), and develop antimicrobial formula comprised of the better biocides. The Minimum inhibitory concentration (MIC) of each natural antimicrobial was determined for LM and LF. Subsequently, nisin and hop extract, and their combination were used in bioreactors containing supplemented sugar cane broth, *Saccharomyces cerevisiae* (SC), LF and LM, simulating the fermentation broth of ethanol producing plants. The biocides 4-hydroxybenzoic acid, at dose of 38 mM had toxic effects to *Saccharomyces cerevisiae*, jointly lysozyme which showed no inhibition of bacteria in doses of up to 125 mg/L, were excluded from the study. Synergistic effects was observed with the combination of nisin (3.75 mg / L) and hops extract (0.625 mg / L) as fractional inhibitory concentration index (FIC_{index}). So it was developed unique formulation containing nisin and hop extract in certain proportions in the MIC combination of these. These biocides had reduced bacterial population in inhibition tests of fermentation tests, in laboratory and industrial scale. Nisin, was more effective in reducing the bacterial population in laboratory tests being the compound that showed similarity to monensin. The formulation developed was tested on industrial scale and showed inhibitory results to contaminants. None of the compounds evaluated in fermentation tests showed interference in the viability and population of yeast, had no toxic effects to the yeast, even with the use of extreme doses (up 1000 X > MIC). No differences were observed in the use of nisin A or nisin Z.

Palavras chaves: Natural antimicrobials. Ethanol production. Nisin. Hop extracts

3.1 INTRODUÇÃO

O etanol é o biocombustível mais utilizado como substituinte aos combustíveis petro-derivados (ALI et al., 2013; CHUM et al., 2013). No Brasil, a produção de etanol foi estimulada com a criação do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) em 1975, que objetivou o aprimoramento e desenvolvimento tecnológico do setor sucroalcooleiro (ROSILLO-CALLE & CORTEZ, 1998; ABREU et al., 2014). Estima-se que sejam produzidos 28,66 bilhões de litros de etanol durante a safra brasileira de cana-de-açúcar 2014-2015, sendo os estados da região centro-sul responsáveis pela maior parte da produção nacional (CONAB, 2014).

O etanol pode ser obtido a partir da fermentação de diferentes fontes de açúcares simples e polissacarídeos (BALAT & BALAT, 2009; HANSEN & KYRITSIS, 2009; MUSSATTO et al., 2010). O micro-organismo mais utilizado para conduzir o processo fermentativo é a levedura, principalmente cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GHORBANI et al., 2011; LIMAYEM et al., 2011). Contudo, diversos fatores afetam a viabilidade das leveduras durante o processo de fermentação, sendo a contaminação bacteriana o fator mais preocupante para as indústrias sucroalcooleiras (NARENDRANATH et al., 1997; LUCENA et al., 2010; LEITE et al., 2013). Contaminações bacterianas em concentrações acima de 10^7 UFC/mL afetam significativamente a capacidade de fermentação etanólica das leveduras, podendo diminuir em até 30% o rendimento da produção (BISCHOFF et al., 2007; COMPART et al., 2013). Os contaminantes mais detectados são bactérias Gram positivas pertencentes à família *Lactobacillaceae* (BISCHOFF et al., 2007; TIUKOVA et al., 2014). Espécies do gênero *Leuconostoc* são conhecidas por serem formadores de goma a partir da conversão da sacarose em polímeros de dextrano, os quais podem levar ao entupimento de filtros e tubulações (LEATHERS et al., 2011). Enquanto algumas estirpes de *Lactobacillus fermentum* estão associadas a problemas como a floculação do fermento, onde células das bactérias se aderem às leveduras causando a sedimentação do fermento e queda do rendimento da taxa de conversão de açúcar em etanol (LUDWIG et al., 2001; CUNHA et al., 2006).

O controle das contaminações é extremamente importante, já que além de interferências na produtividade da levedura, a contaminação bacteriana pode levar à

corrosão das dornas de fermentação e outros equipamentos (MURPHREE et al., 2014). Diversos métodos são utilizados como medida de controle destas contaminações, sendo que os mais comuns são a aplicação de antibióticos nas dornas de fermentação e as desinfecções ácidas sobre a massa de levedura (LUCENA et al., 2010; DA SILVA-FILHO et al., 2005). Antibióticos como virginamicina, penicilina, eritromicina, estreptomicina, monensina e as combinações destes são utilizados no controle das contaminações bacterianas (NARENDRANATH et al., 2000; MURPHREE et al., 2014). Parte da massa de levedura gerada na produção de etanol pode ser reutilizada como suplementação na alimentação de animais, por ser uma excelente fonte de aminoácidos, proteínas e vitaminas (LANDELL et al., 1993; ZANUTTO et al., 2008). Porém, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Commission* (EC), demonstram preocupação em relação ao uso intensivo de antibióticos nos processos industriais de fermentação etanólica, já que alguns estudos demonstraram que resíduos destas substâncias podem permanecer no subproduto que é adicionado às rações animais (EC, 2003; COMPART et al., 2013). A presença de antibióticos na ração é proibido na Comunidade Europeia, e conseqüentemente, é vetada a utilização destes produtos em usinas sucroalcooleiras que comercializam levedura para este fim (KAKLAMANOS et al., 2013). Extratos de levedura brasileira já sofreram embargos ao serem exportados para a Europa devido a presença de monensina sódica (FEED INFO, 2008).

Antibacterianos de origem natural podem ser utilizados como substituintes aos antibióticos atualmente utilizados nas usinas sucroalcooleiras, fazendo com que não ocorra nenhum tipo de problema com a comercialização da massa de levedura derivada do processo fermentativo. Diversos estudos relacionados ao uso de compostos naturais nas indústrias sucroalcooleiras com a finalidade de reduzir a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação foram desenvolvidos (LIMAYEM et al., 2011; COMPART et al., 2013; LEITE et al., 2013). Um dos poucos produtos naturais comercialmente disponíveis para controlar as contaminações bacterianas na fermentação etanólica é o extrato de lúpulo, sendo que o seu uso em doses a partir de 3 mg/L causam redução significativa da carga bacteriana *in vitro* (LEITE et al., 2013). A atividade antibacteriana do lúpulo é atribuída aos compostos amargos presentes nas

flores femininas da planta conhecidas como humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos), que possuem atividade inibitória contra diversas bactérias Gram positivas (NATARAJAN et al., 2008; LEITE et al., 2013).

Produtos que apresentam ação contra *Lactobacillus* também já foram testados em processos de fermentação industrial, já que estes são os principais contaminantes da produção de etanol (LIMAYEM et al., 2011; NERIS et al., 2013). Entre estes compostos, pode-se destacar a ação da nisina que é uma bacteriocina sintetizada por algumas cepas de *Lactococcus lactis subs. lactis*, utilizada como conservante para alimentos desde a década de 60 (DELVES-BROUGHTON et al., 1996). A atividade antimicrobiana da nisina abrange grande parte das espécies Gram positivas, sem apresentar efeitos tóxicos às leveduras (RAYMAN et al., 1981; PENNA et al., 2006; BORDIGNON-JUNIOR et al., 2012). O uso de ácidos fenólicos é eficiente no controle de diferentes bactérias contaminantes das indústrias de alimentos, incluindo espécies de *Lactobacillus* (BALASUNDRAM et al., 2006; CUEVA et al., 2010; SÁNCHEZ - MALDONADO et al., 2011). Em avaliações da atividade antimicrobiana de 13 diferentes ácidos fenólicos contra diferentes espécies de *Lactobacillus*, foi possível observar que o ácido 4-hidroxibenzóico foi o composto mais ativo, sendo que doses $\geq 62,5$ mg/L foram inibitórias para *L. paraplantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis* (CUEVA et al., 2010). Estes ácidos são abundantes na natureza e possuem um baixo custo comercial. Contudo, não foi encontrado na literatura, até o presente momento, nenhum estudo que demonstre sua utilização em processos de produção de etanol. Outro composto com atividade bactericida contra bactérias Gram positivas e Gram negativas é a lisozima, que é uma enzima capaz de clivar as ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina presentes na camada de peptidoglicano de bactérias (MCKENZIE & WHITE, 1991; CHUNG & HANCOCK, 2000).

A aplicação de produtos naturais como substituintes aos antibióticos no setor sucroalcooleiro é, até o presente momento, limitado a produtos compostos por extrato de lúpulo. Tendo em vista o potencial na expansão do uso de compostos naturais neste setor, o objetivo geral da presente dissertação foi o desenvolvimento de fórmulas antibacterianas de origem natural capazes de eliminar ou reduzir significativamente a população contaminante de bactérias Gram-positivas (*Lactobacillus fermentum* e

Leuconostoc mesenteroides) isoladas de usinas brasileiras durante o processo fermentativo na produção de etanol.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Micro-organismos utilizados em testes laboratoriais

Para condução dos testes laboratoriais, utilizou-se as cepas bacterianas *Leuconostoc mesenteroides* (LM) CCT 0848 e *Lactobacillus fermentum* (LF) CCT 1629 e cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SC) CCT 0122. Todos os micro-organismos foram isolados de usinas de produção de etanol brasileiras e adquiridas da coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP, Brasil). Durante a realização de teste de inibição em ensaio fermentativo, optou-se pela utilização de cepa de levedura selvagem considerada mais efetiva para processos fermentativos, *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (CAT-1), cedida pela Usina Renuka Vale do Ivaí S/A, São Pedro do Ivaí, Paraná.

3.2.2 Meio de cultura para teste de ensaio fermentativo

Durante a realização dos testes fermentativos utilizou-se meio de cultura a base de caldo de cana suplementado (CSN). O caldo de cana foi adquirido de bancas de venda do comércio da cidade de São José dos Pinhais, Paraná. Logo após extração, o caldo de cana foi submetido ao processo de clarificação objetivando a retirada das sujidades presentes no líquido. Neste processo foi realizado a adição de 2 claras de ovo batidas em neve por litro de caldo e manteve-se o líquido em autoclave até atingir a temperatura de 121°C. Em seguida realizou-se a filtração do caldo com auxílio de gaze e algodão, para retirada da clara cozida juntamente com as sujidades presentes no caldo. Então, realizou-se a padronização dos sólidos solúveis totais (°BRIX), que foi ajustado para 10° com a adição de água deionizada. Posteriormente adicionou-se ao líquido 6 g de peptona bacteriológica e 3 g de extrato de levedura. O pH do meio foi regulado para 5,0 com adição de HCl 8M e em seguida o meio foi esterilizado em autoclave (15 min/121°C).

3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*

Avaliou-se a eficácia dos seguintes antimicrobianos naturais contra LM, LF e SC: extrato de lúpulo Betabio 45[®] (LUP) (Hopsteiner– S.S.Steiner, Inc, New York, EUA); nisina A e nisina Z (NISA e NISZ) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil); lisozima (LIS) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), ácido 4-hidroxibenzóico (ACPHB) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e monensina sódica (MON) (Quimica Real[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

Os antimicrobianos foram submetidos a testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) conforme descrito por Wikler (2006). Os testes foram realizados por diluições em tubos de tampa de rosca (8 mL) contendo caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Himedia, Mumbai, Índia) para as bactérias de estudo (LM e LF), ou caldo Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD, Difco[™] BD, EUA) para células de leveduras (SC). Os micro-organismos foram utilizados em fase exponencial intermediária (~10⁸ UFC/mL) equivalente à turbidez 0,5 da escala de McFarland para bactérias e 1 da escala de McFarland para células de leveduras.

Os antimicrobianos LUP, NISA, LIS e MON foram diluídos diretamente em caldo MRS. O ACPHB foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO – Synth, São Paulo, Brasil), sendo que a dose máxima do mesmo foi de 2% no caldo teste final, o qual não possui efeito antimicrobiano *per se*. Após inoculação de 1% v/v de inóculo dos micro-organismos de estudo, as amostras receberam diferentes doses dos antimicrobianos e foram incubados por 24 h a 35°C em estufa bacteriológica. Após incubação foi verificada a turbidez dos tubos, considerando como CIM a menor dose suficiente para inibir o crescimento visual dos micro-organismos.

3.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima da combinação de antimicrobianos e índice da concentração inibitória fracionada (ICIF)

Os antimicrobianos naturais que apresentaram os melhores valores de CIM e que não apresentaram efeitos tóxicos à levedura foram testados em combinação. Posteriormente, determinou-se o índice da Concentração Inibitória fracionada (ICIF) da combinação com objetivo de verificar o possível efeito sinérgico entre os antimicrobianos. A CIM da combinação foi determinada conforme descrito no item

3.2.3, porém as doses foram reduzidas fracionalmente. Primeiramente, realizou-se a combinação com valores equivalente a CIM de cada antimicrobiano (CIM produto A + CIM produto B). Na sequência os valores equivalentes a CIM de cada antimicrobiano foram fracionados pela metade ($\frac{1}{2}$ CIM produto A + $\frac{1}{2}$ CIM produto B) e assim subsequentemente até valores de $\frac{1}{16}$ CIM do produto A + $\frac{1}{16}$ CIM do produto B.

O valor de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) para cada antimicrobiano foi determinado da seguinte forma: CIFA = concentração do produto A na CIM em combinação / CIM do produto A; CIFB = concentração do produto B na CIM em combinação / CIM do produto B. Para determinar o ICIF realiza-se a soma entre os valores determinados de CIFs (CIFA+CIFB). Considera-se que há interação insignificante entre os compostos quando o ICIF > 0,5 ou < 4,0; sinergismo com ICIF ≤ 0,5; e antagonismo quando ICIF ≥ 4,0 (PALANIAPPAN & HOLLEY, 2010).

3.2.5 Teste de inibição em ensaio fermentativo

A montagem do ensaio fermentativo em escala laboratorial foi realizada da seguinte forma: erlenmeyers contendo caldo CSN estéril foram adicionados de 1 mL de cultura de LM e 1 mL de cultura de LF, ambos com turbidez equivalente à 5 da escala de McFarland 5 mL de cultura de levedura CAT-1 com turbidez equivalente à 10 da escala de McFarland. Realizou-se o tratamento com doses dos antimicrobianos de estudo conforme descrito na Tabela 3.1. O volume total trabalhado foi de 100 mL. As amostras foram encaminhadas à estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas. Após período de incubação, as amostras foram submetidas a testes microbiológicos e físico-químicos conforme descritos nas seções 3.2.6 e 3.2.7.

Tabela 3.1 – Doses e produtos avaliados com cultura mista em caldo CSN em teste de inibição em ensaio fermentativo.

Produtos	Doses
Extrato de Lúpulo Betabio 45 ®	1 mg/L até 1.000 mg/L
Nisina A	5 mg/L até 300.000 mg/L
Monensina sódica	3 mg/L até 20 mg/L
Combinação de nisina + extrato de lúpulo	3,75 mg/L NIS + 0,625 mg/L LUP

3.2.6 Análises microbiológicas

A viabilidade celular das leveduras foi determinada e calculada através de microscopia óptica em câmara de Neubauer espelhada, onde foi possível verificar a % de células viáveis, % de células não viáveis e % brotos viáveis presentes em 160 retículos da câmara. Foi utilizado solução de corante azul de metileno em tampão citrato nas proporções de 1:1 (1 mL de solução de corante em 1 mL de amostra contendo leveduras) para distinguir células viáveis, não coradas, das não viáveis, coradas em azul. A contagem de bactérias foi realizada por semeadura em superfície em meio ágar MRS adicionado de 5 mL/L de solução de actidiona para evitar o crescimento de leveduras (1mg/mL) e para contagem de leveduras utilizou-se Yeast Extract Chloramphenicol Ágar (YECA, Difco™ BD, EUA) que evita o crescimento de células de bactérias por conter cloranfenicol, permitindo apenas o crescimento de células de leveduras.

3.2.7 Análises físico-químicas

Durante o teste de inibição em ensaio fermentativo, as amostras foram submetidas a avaliações de teor de sólidos solúveis totais (°BRIX) com auxílio de refratômetro *Versatile clinical refractometer* (Kernco instruments Co. Inc; El Paso TX, EUA) e verificação do pH com a utilização do pHmetro HI99163N (Hanna, São Paulo, SP, Brasil), após período de fermentação.

3.2.8 Preparação de fórmula antimicrobiana

Após realização de teste de inibição em ensaio fermentativo, realizou-se o preparo de fórmula contendo extrato de lúpulo e nisina. Nesta etapa, o objetivo principal foi desenvolver um produto único de fácil utilização, contendo os dois melhores antimicrobianos encontrados neste estudo. A fórmula foi desenvolvida utilizando os produtos nas proporções referentes às doses de CIM encontrada para a combinação dos antimicrobianos, equivalente a 1g de lúpulo para cada 6g de nisina. Após pesados, os produtos foram misturados com auxílio de graal e pistilo, e foram armazenados em potes plásticos estéreis. A fórmula desenvolvida foi testada conforme

item 3.2.3 para validação de resultados obtidos anteriormente, bem como, para avaliações em testes fermentativos laboratoriais conforme item 3.2.5.

3.2.9 Avaliação de antimicrobianos naturais em teste com levedo industrial.

O teste foi realizado na usina Renuka Vale do Ivaí S/A, situada no município de São Pedro do Ivaí, Paraná. Os antimicrobianos foram testados conforme procedimento operacional padrão da usina adotado para seleção de novos antimicrobianos.

Nas avaliações industriais foram utilizados quatro diferentes tratamentos sendo dois de uso comercial, o LactoStab[®] (BetaTec Hop products, Washington EUA) e dióxido de cloro, e duas doses da formulação composta pela combinação de 85,71% de nisina e 14,29% de extrato de lúpulo. Os tratamentos foram realizados em amostras de levedo coletadas no tanque de descanso após centrifugação da massa de levedura.

Inicialmente foram avaliados os padrões de % viabilidade, % brotamento, população de leveduras (conforme item 3.2.6), contagem de bastonetes e quantificação de etanol. As amostras foram diluídas serialmente em água peptonada 1% para a contagem de bastonetes por microscopia. Em tubos previamente esterilizados foram misturadas alíquotas de 1 mL dos tubos das diluições com 1 mL de corante misto (azul do Nilo e azul de metileno 1:1). Estas amostras foram homogeneizadas e transferiu-se 3 µL para uma lâmina de microscopia que foi coberta por lamínula equivalente. A lâmina foi visualizada em microscópio óptico com objetiva de 100x, onde se observaram a presença de bastonetes vivos (não corados) e bastonetes mortos (corados em azul) presentes em um total de 50 campos da área da lâmina. Calculou-se o total de bastonetes por mL considerando o fator de aumento microscópio x 1 x (média de bastonetes vivos / número de campos contados) x diluição utilizada/volume total da amostra. O etanol foi quantificado após destilação de 25 mL de cada amostra em microdestilador de arraste de vapor TE-02 (Tecnal equipamentos para laboratório, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O líquido destilado foi transferido para densímetro digital DS7800 (Kruss optronic, Hamburg, Alemanha) apresentando resultados de concentração de etanol (°GL). Paralelamente a realização das análises iniciais, foram fracionadas 500 mL das amostras em frascos estéreis onde aplicaram-se diferentes doses da combinação de nisina e extrato de lúpulo (Betabio 45[®]), bem como, doses

dos compostos antimicrobianos rotineiramente utilizados conforme procedimento padrão da usina Renuka Vale do Ivaí, que utiliza 200 mg/L de dióxido de cloro ou 40 mg/L extrato de lúpulo (LactoStab[®], Beta Tec[®] Hop Products, Washington, EUA). As avaliações microbiológicas foram realizadas nos tempos 0, 2, 8 e 24 h. As avaliações físico químicas foram a medição dos sólidos solúveis totais (°BRIX, conforme item 3.2.7) após 8 e 24 h de incubação e quantificação de etanol após 0, 8 e 24 h de incubação.

3.2.10 Análises estatística

Os resultados dos testes fermentativos foram analisados pelo método de análise de variância simples (ANOVA one-way) e as diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos foram comparadas utilizando teste de Tukey. A análise estatística foi realizada com o auxílio do software STATGRAPHICS Centurion XVI versão 16.1.11.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 CIM para *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae*

Nas avaliações de concentração inibitória mínima (CIM), dois importantes critérios foram estabelecidos, a não toxicidade à levedura *S. cerevisiae* e valores inibitórios viáveis para utilização do produto para fins comerciais. Dois antimicrobianos foram reprovados nestes critérios, o ACPHB e a LIS. OACPHB apresentou efeitos inibitórios para levedura com doses a partir de 38 mM, enquanto que para inibição das bactérias em estudo são necessárias doses de 70 mM. A LIS não apresentou inibição aos micro-organismos com doses até 125 mg/L. Considerando que a LIS possui valores comerciais elevados, não foram realizados testes com doses maiores para determinação da CIM.

A NISA assim como NISZ, apresentaram menores resultados de CIM (30 mg/L). Tendo em vista que este antimicrobiano é comercializado com formulação contendo apenas 2,5% de nisina, pode-se considerar, portanto que a CIM é equivalente a 0,75 mg/L para inibição das bactérias.

O segundo antimicrobiano que apresentou menor CIM foi o LUP (BetaBio 45[®]) com 5 mg/L contra LM e LF (Tabela 3.2), não sendo observado inibição para as leveduras com doses de até 1000 mg/L. Diversos antimicrobianos a base de ácidos de lúpulo são utilizados no controle dos contaminantes da fermentação alcoólica e as doses recomendadas são >10 mg/L (SUZUKI et al., 2002; RÜCKLE & SENN, 2006)

Tabela 3.2 – Concentração inibitória mínima de diferentes antimicrobianos contra *Lactobacillus fermentum* CCT 1629, *Leuconostoc mesenteroides* CCT 0848 e *Saccharomyces cerevisiae* CCT 0122 *in vitro*.

Antimicrobiano	CIM		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Ácido 4-hidroxibenzóico	38 mM	70 mM	70 mM
Extrato de lúpulo	>1000 mg/L	5 mg/L	5 mg/L
Lisozima	>125 mg/L	>125 mg/L	>125 mg/L
Nisina A	>300.000 mg/L	30 mg/L	30 mg/L
Nisina Z	>300.000 mg/L	30 mg/L	30 mg/L
Monensina sódica	>20 mg/L	3 mg/L	3 mg/L

No trabalho realizado por Limayem et al (2011) foram avaliados a CIM da nisina A e da lisozima frente à 5 diferentes estirpes de *Lactobacillus*. A determinação da CIM foi realizada por microdiluição em placas de 96 poços utilizando caldo MRS para crescimento das espécies de *Lactobacillus*. Conforme descrição dos autores, a lisozima foi eficaz apenas contra *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC479 apresentando a CIM de 100.000 mg/L. Por sua vez, a NISA apenas não foi eficaz contra *L.casei* ATCC1157 com doses até 400 mg/L. A NISA apresentou CIM de 50mg/L contra *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 479, enquanto que contra *L. plantarum* WCFS1 e *L. sakei* 23K o valor de CIM foi de 12,5 mg/L. Frente à *L. plantarum* ATCC 8014 foi determinada CIM de 1,56 mg/L, sendo portanto, este o micro-organismo mais sensível à ação da NISA neste estudo (LIMAYEM et al., 2011). É importante ressaltar que as cepas dos micro-organismos utilizados nos estudos deste autor foram diferentes das estirpes utilizadas no presente estudo sendo, portanto, esta a possível diferença nos resultados determinados.

A nisina não apresenta efeitos inibitórios às leveduras por ter um mecanismo de ação que realiza interações hidrofóbicas ou eletrostáticas com componentes aniônicos presentes na parede celular das bactérias gram positivas, ocorrendo assim a formação de poros por onde há o extravasamento de moléculas essenciais como K^+ , aminoácidos e ATP (ABEE et al., 2003; COTTER et al., 2005; PUNYAUPPA-PATH et al., 2015).

Em relação à sensibilidade dos *Lactobacillus* e leveduras à ação da NISA, em um estudo realizado por Radler (1990) 83 diferentes cepas de *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* foram avaliadas. Observou-se então que o microorganismo mais sensível foi o *Leuconostoc oenos*, que teve seu crescimento inibido com doses de 5 UI/mL, enquanto que *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* não foram inibidos mesmo com doses de até 500 UI/mL. O autor também demonstrou que células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* permaneceram viáveis mesmo com a utilização de 500 UI/mL de nisina. Estes resultados corroboram com os dados observados no presente trabalho, sendo a nisina um antimicrobiano natural viável para a utilização em processos de fermentação etanólica, onde a *S. cerevisiae* é o microorganismo fermentador.

A realização de doseamentos entre 5 à 10 mg/L é recomendada pelo fabricante do Betabio45[®] para o controle dos contaminantes da produção de etanol. Alguns estudos utilizaram 10 mg/L de extrato de lúpulo como dose de partida para realização de controle de bactérias em processos fermentativos (LEITE, 2011; PRADO, 2014). O valor determinado como CIM para o LUP no presente estudo foi de 5 mg/L, conforme tabela 3.2, sendo equivalente a dose mínima recomendada pelo fabricante do produto testado (Hopsteiner– S.S.Steiner, Inc, New York, EUA). Atualmente, no mercado sucroalcooleiro, existe outros produtos comerciais a base de lúpulo ricos em α -ácidos, LactoStab[™] e IsoStab[™] (Beta Tec[®] Hop Products, Washington, EUA), estes foram avaliados frente a *L. fermentum* LTH 5298 e *L. brevis* LTH 5290, apresentando valores de CIM que variaram de 20 mg/L até 48 mg/L, sendo a cepa de *L. fermentum* mais suscetível à ação de ambos os produtos (RÜCKLE & SENN, 2006).

3.3.1.1 Concentração inibitória mínima da combinação de antimicrobianos

Após a obtenção de resultados de CIM dos antimicrobianos em estudo, realizou-se a combinação dos antimicrobianos que apresentaram melhores resultados de CIM. Assim o LUP e a NISA foram avaliados e apresentaram CIM combinada com valores de 0,625 mg/L (equivalente à 1/8 da CIM) e 3,75 mg/L (equivalente à 1/8 da CIM), respectivamente. Esta dose gerou um ICIF=0,25, que corresponde à um efeito sinérgico. O mesmo procedimento foi realizado com a utilização de LUP e NISZ, sendo observado o mesmo efeito obtido com a utilização de NISA.

Não foi encontrado na literatura resultados que apresentassem os efeitos bactericidas da combinação dos produtos LUP e NIS, sendo, portanto este o primeiro estudo, até o presente momento, que utiliza estes antimicrobianos contra contaminantes da indústria de etanol. No estudo realizado por Turgis et al (2012) foi verificado o efeito inibitório da combinação entre nisina e os óleos essenciais de canela da China (*Cinnamum cassia*), citronela (*Cymbopogon nardus*), mostarda branca (*Brassica hirta*), orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e satureja das montanhas (*Satureja montana*), contra *Listeria monocytogenes*; *Bacillus cereus*; *Escherichia coli* O157:H7; *Lactobacillus sakei*; *Pseudomonas putida*; *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*. Conforme descrito pelo autor, foi possível observar que a nisina em combinação com óleo essencial de orégano apresentou atividade sinérgica contra *L. monocytogenes*, enquanto que a combinação de nisina com óleo essencial de tomilho apresentou atividade sinérgica contra *Salmonella* Typhimurium (TURGIS et al., 2012). Porém, no presente estudo, optou-se por não utilizar óleos essenciais, pois geralmente estes são mais tóxicos às leveduras do que às bactérias, inviabilizando a sua utilização (D'AURIA et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2006; PINTO et al., 2014).

Acredita-se que os antimicrobianos nisina e extrato de lúpulo tiveram um efeito sinérgico porque possuem mecanismos de ação complementares contra bactérias. Ambos os antimicrobianos atuam principalmente contra bactérias Gram positivas. Enquanto a nisina realiza interações com a camada de peptidoglicano das bactérias ocasionando a formação de poros (ABEE et al., 2003; COTTER et al., 2005; PUNYAUPPA-PATH et al., 2015), o extrato de lúpulo age ocasionando interferências

no transporte de metabólitos e acidificação do citoplasma das células bacterianas (ZANOLI & ZAVATTI, 2008; DA SILVA & DE FARIA, 2008).

3.3.2 Teste de inibição em ensaio fermentativo

Realizou-se teste fermentativo em escala laboratorial com objetivo de verificar os efeitos sobre os contaminantes LM e LF, e a levedura CAT-1 com aplicação de diferentes doses de extrato de lúpulo, nisina e a combinação destes. Foi utilizado a monensina sódica (Química Real[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), que é o antibiótico mais utilizado para controle dos contaminantes da indústria sucroalcooleira, como produto controle. Os resultados assim como parâmetros obtidos nestes ensaios estão descritos nas Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6.

Tabela 3.3 - Resultados da utilização de diferentes doses de nisina A em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).

Concentração de nisina A (mg/L)	BAL (log UFC/mL)	<i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)	°BRIX	Viabilidade celular leveduras (%)
*Controle	9,923 ± 0,44 ^A	7,418 ± 0,54 ^A	7,66 ± 0,91 ^A	99,50 ± 0,83 ^A
5	9,783 ± 0,44 ^A	8,041 ± 0,55 ^{AB}	7,50 ± 1,41 ^A	97,00 ± 0,80 ^B
15	6,924 ± 0,95 ^B	7,716 ± 0,45 ^{AB}	7,52 ± 0,61 ^A	98,75 ± 0,95 ^{AB}
30	4,937 ± 0,52 ^C	8,888 ± 0,88 ^B	7,53 ± 0,56 ^A	98,33 ± 1,50 ^{AB}
300	4,101 ± 0,96 ^{CD}	8,183 ± 0,24 ^{AB}	7,45 ± 0,55 ^A	99,50 ± 1,00 ^{AB}
3.000	3,421 ± 0,92 ^{DE}	8,351 ± 0,81 ^{AB}	7,71 ± 0,60 ^A	98,66 ± 1,21 ^{AB}
30.000	2,410 ± 0,47 ^E	8,072 ± 0,98 ^{AB}	7,65 ± 0,51 ^A	99,00 ± 1,09 ^{AB}
300.000	<0,833 ± 0,0 ^F	7,853 ± 1,10 ^{AB}	7,60 ± 0,46 ^A	99,33 ± 1,03 ^{AB}

*Controle refere-se a amostras sem adição de tratamentos. Tabela com valores de média ± desvio padrão. Experimento realizado em triplicata com duas repetições (n=6). Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação das médias ± desvio padrão por coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

Conforme observado na Tabela 3.3, a utilização de 5 mg/L de nisina sob cultura mista em caldo CSN não apresentou diferenças significativas para diminuição da

população microbiana (*pool* de bactérias e leveduras), assim como redução de sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ BRIX) e viabilidade celular das leveduras, comparando com as amostras controle que não receberam adição de antimicrobianos. Porém, doses a partir de 15 mg/L apresentam redução da população bacteriana em 2,999 log UFC/mL e não apresentam redução da população e viabilidade das leveduras. A dose referente à CIM da nisina, 30 mg/L, apresentou redução de 4,986 log UFC/mL em comparação com as amostras sem adição de antimicrobiano. Mesmo com utilização de doses elevadas de nisina como 300.000 mg/L não foi observado inibição da população e viabilidade celular das leveduras. Nesta dose, a população bacteriana ficou abaixo do limite de detecção deste estudo (0,833 UFC/mL). Não houve diferença significativa nos valores de redução dos compostos sólidos solúveis totais ($^{\circ}$ BRIX) entre as amostras, sendo a média de redução de 2,425 $^{\circ}$ BRIX, em relação a valor inicial do meio (10 $^{\circ}$ BRIX), indicando desta forma que o consumo de glicose presente no meio CSN foi semelhante entre as amostras contendo ou não o antimicrobiano.

Em relação aos tratamentos de extrato de lúpulo sob culturas mista em caldo CSN (Tabela 3.4), pode-se observar que houve redução significativa da população bacteriana nas amostras com doses acima de 10 mg/L. Porém, valores de 1 mg/L de extrato de lúpulo, reduziram a população bacteriana em 0,199 log UFC/mL. Apesar de não ser um valor estatisticamente significativo, a dose referente à CIM (5 mg/L) apresentou redução de 1,583 log UFC/mL da população bacteriana. Mesmo com a utilização de doses extremas de extrato de lúpulo (1000 mg/L) a população de células de leveduras não foi reduzida e a viabilidade celular manteve-se acima de 98%, demonstrando que o produto não apresentou efeitos tóxicos às leveduras.

Tabela 3.4 - Resultados da utilização de diferentes doses de extrato de lúpulo em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).

Concentração de extrato de lúpulo (mg/L)	BAL (log UFC/mL)	<i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)	*BRIX	Viabilidade celular leveduras (%)
*Controle	10,494 ± 0,33 ^A	8,882 ± 0,41 ^A	8,3 ± 0,72 ^A	98,33 ± 1,36 ^{AB}
0,5	10,828 ± 0,11 ^A	9,342 ± 0,02 ^A	9,2 ± 0,14 ^A	99,00 ± 0,0 ^{AB}
1	10,295 ± 0,59 ^A	8,797 ± 0,32 ^A	8,2 ± 0,66 ^A	98,66 ± 1,32 ^{AB}
5	8,911 ± 1,22 ^A	9,122 ± 0,27 ^A	8,0 ± 0,71 ^A	100,00 ± 0,0 ^B
10	6,991 ± 1,27 ^B	9,047 ± 0,47 ^A	7,0 ± 1,15 ^A	99,33 ± 1,03 ^{AB}
100	3,287 ± 0,45 ^C	8,690 ± 0,62 ^A	7,0 ± 1,44 ^A	98,00 ± 0,0 ^A
1000	1,288 ± 1,44 ^U	8,476 ± 0,38 ^A	7,0 ± 1,54 ^A	99,66 ± 0,51 ^{AB}

*Controle refere-se a amostras sem adição de tratamentos. Tabela com valores de média ± desvio padrão. Experimento realizado em triplicata com duas repetições (n=6). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação das médias ± desvio padrão por coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

A Tabela 3.5 apresenta os resultados obtidos em teste fermentativo em meio CSN com adição de doses da CIM da combinação dos antimicrobianos nisina e extrato de lúpulo. Os antimicrobianos foram adicionados separadamente com valores referentes ao pré determinado na CIM da combinação entre eles. A dose utilizada nesta etapa do teste fermentativo foi eficaz na redução de 2,486 log UFC/mL da população bacteriana comparado ao controle. Levando em consideração os resultados obtidos nas avaliações anteriores (Tabelas 3 e 4), onde foram adicionados apenas doses de nisina ou apenas doses de extrato de lúpulo, obtivemos resultados muito satisfatórios ao uso de doses equivalente a CIM de cada antimicrobiano. É importante destacar que a combinação entre nisina e extrato de lúpulo se refere a 1/8 da CIM de cada antimicrobiano. No presente estudo observou-se que a nisina apresentou redução da população bacteriana apenas quando utilizada em doses >15 mg/L (Tabela 3), enquanto que o extrato de lúpulo apresentou redução significativa da população bacteriana com doses de >10mg/L (Tabela 3.4), a combinação destes antimicrobianos é equivalente à apenas 3,75 mg/L de NISA e 0,625 mg/L de LUP. Em

relação a população e viabilidade das leveduras CAT-1, não foram observadas interações negativas com o uso da combinação de nisina e extrato de lúpulo.

Tabela 3.5 - Resultados da utilização de doses de CIM da combinação de nisina A (3,75 mg/L) e extrato de lúpulo (0,625 mg/L) em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. São apresentados os dados sobre a população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).

Concentração de extrato de lúpulo + nisina A (mg/L)	BAL (log UFC/mL)	<i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)	°BRIX	Viabilidade celular leveduras (%)	pH
*Controle	8,575 ± 0,53 ^A	8,112 ± 1,32 ^A	7,6 ± 1,4 ^A	95,73 ± 1,86 ^A	3,66 ± 0,17 ^A
3,75 NISA + 0,625 LUP	6,089 ± 0,64 ^B	7,878 ± 0,88 ^A	8,2 ± 0,8 ^A	98,16 ± 1,89 ^A	3,85 ± 0,29 ^A

*Controle refere-se a amostras sem adição de tratamentos. Tabela com valores de média ± desvio padrão. Experimento realizado em triplicata com duas repetições (n=6). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação das médias ± desvio padrão por coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

O teste de inibição em ensaio fermentativo foi realizado também com o tratamento de monensina sódica por se tratar de um antimicrobiano utilizado em grande parte das usinas sucroalcooleiras. Para este produto optou-se em utilizar doses comercialmente aplicadas para controle de contaminantes no processo fermentativo da produção de etanol. Os valores encontram-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Resultados da utilização de diferentes doses de monensina sódica em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. São apresentados os dados sobre a população bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).

Concentração de monensina sódica (mg/L)	BAL (log UFC/mL)	<i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)	°BRIX	Viabilidade celular leveduras (%)
*Controle	10,390 ± 0,18 ^A	9,005 ± 0,51 ^A	8,5 ± 0,57 ^A	100 ± 0,0 ^A
3	6,393 ± 1,31 ^B	8,503 ± 0,35 ^A	6,0 ± 1,73 ^{AB}	97,7 ± 0,5 ^B
5	5,661 ± 0,64 ^B	8,371 ± 0,92 ^{AB}	6,3 ± 1,88 ^{AB}	95,0 ± 0,0 ^B
10	3,119 ± 0,23 ^C	7,647 ± 0,36 ^{BC}	5,5 ± 0,57 ^B	94,0 ± 1,41 ^B
20	<0,833 ± 0,0 ^D	7,258 ± 0,17 ^C	5,5 ± 0,57 ^B	92,0 ± 0,81 ^C

*Controle refere-se a amostras sem adição de tratamentos. *SC= Sem crescimento visual. Tabela com valores de média ± desvio padrão. Experimento realizado em triplicata com duas repetições (n=6). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação das médias ± desvio padrão por coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

Conforme a Tabela 3.6, pode-se observar que a utilização de 3 mg/L de monensina sódica (dose indicada pelo fabricante) reduziu em média 3,997log UFC/mL da contaminação bacteriana em relação ao controle. Os resultados obtidos com a adição de nisina foram superiores ao obtido com valores equivalente a CIM de monensina sódica (3 mg/L) se considerarmos que a nisina utilizada neste estudo está em uma formulação à 2,5%. Assim, a nisina se apresenta como um produto viável para a redução de BAL em processos de fermentação etanólica. Porém, seu alto valor comercial pode ser proibitivo para a utilização industrial caso seja aplicado como único antimicrobiano.

Nos experimentos realizados por Prado (2014), foi analisado a população bacteriana contaminante em um período de duas safras (2008 e 2009), onde o controle do crescimento destes micro-organismos foi realizado com aplicações de antibióticos convencionais, incluindo a monensina sódica. Avaliou-se também a população bacteriana determinada em outras duas safras (2011 e 2012), onde o controle foi realizado com antimicrobianos a base de lúpulo. Foram utilizados o BetaBio 45 (rico em β –ácidos) com doses a partir de 10 mg/L, e IsoStab (rico em α –ácidos) com doses a

partir de 30 mg/L, conforme indicações dos fabricantes. Neste estudo foram realizados cálculos de taxa de redução populacional (TRP), onde foi possível verificar que nenhum dos antimicrobianos utilizados foi eficiente na eliminação total dos contaminantes bacterianos. Contudo, os resultados obtidos com a adição de antimicrobianos à base de lúpulo foram semelhantes aos obtidos com a adição de monensina sódica (3 mg/L) (PRADO, 2014).

A comparação de diferentes antimicrobianos quanto à eficiência no controle de bactérias presentes em mosto de caldo de cana também foi verificada por Lopes & Silva (2011), onde foi possível observar que a penicilina seguida da virginiamicina e monensina sódica, apresentaram melhores atividades antimicrobianas se comparadas ao extrato de lúpulo. Estes resultados assemelham-se ao determinado no presente estudo, onde a adição de doses de 3 mg/L de monensina sódica apresenta maior redução da população bacteriana se comparado à doses de CIM obtida para o extrato de lúpulo (5 mg/L).

Em relação à população e viabilidade celular das leveduras, observou-se no presente estudo que a aplicação de 20 mg/L de monensina sódica reduziu a população de leveduras em 1,747 log UFC/mL em relação ao controle, e a viabilidade celular manteve-se acima de 92%. É importante destacar que a levedura seca resultante da produção de etanol pode ser utilizada na suplementação da alimentação de animais de produção (ZANUTTO et al., 2008; JOUANY et al., 2009). Contudo, desde 2003 as autoridades de segurança alimentar da Comunidade Europeia estabeleceram normas referentes à proibição do uso de antibióticos e aditivos como melhoramento de desempenho na alimentação de animais de produção (EC, 2003). Resíduos dos antibióticos utilizados no controle dos contaminantes da produção de etanol podem ser detectados na levedura derivada da indústria sucroalcooleira (MUTHAIYAN et al., 2011; COMPART et al., 2013) e por este motivo o Brasil já sofreu embargo no comércio de leveduras exportadas para a Europa por conter vestígios de monensina sódica (FEED INFO, 2008). Assim, é importante para o setor sucroalcooleiro brasileiro a adoção de diferentes métodos para controle dos contaminantes ou utilização de outros antimicrobianos que não ocasionem problemas na comercialização de seus subprodutos como levedura seca.

3.3.3 Utilização de fórmula antimicrobiana em teste fermentativo laboratorial

Após a obtenção dos resultados com a utilização de nisina e extrato de lúpulo de maneira individual e em combinação, deu-se início ao preparo de uma fórmula antimicrobiana única composta por estes antimicrobianos. Para tanto, foi dissolvida 1 g de extrato de lúpulo para cada 6g de nisina, o que é equivalente às proporções da CIM destes compostos em combinação. A fórmula obteve aspecto homogêneo, granulado, com odor característico de lúpulo. A dose de 4,37 mg/L da formulação resultou em uma redução de 1,04 log UFC/mL da população bacteriana, enquanto que 8,74 mg/L da formulação gerou uma redução de 1,29 log UFC/mL, sendo que ambas não são estatisticamente diferentes do grupo controle (tabela 3.7). Em relação as leveduras, a população bem como a viabilidade celular destas manteve-se acima de 8,16 log UFC/mL e 97%, respectivamente. Houve redução de 3,13 °BRIX em relação aos valores iniciais das amostras (10 °BRIX), indicando desta forma o consumo da glicose presente no meio CSN.

Tabela 3.7—Resultados da utilização de diferentes doses de formulação composta por nisina e extrato de lúpulo nas proporções de 6:1 em teste fermentativo em meio CSN contendo cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum* e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. São apresentados os dados da população de bactérias ácido lácticas (BAL), população e viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, e conteúdo de sólidos no meio (°Brix).

Concentração de formulação de nisina + lúpulo (mg/L)	BAL (log UFC/mL)	<i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)	°BRIX	Viabilidade celular leveduras (%)
*CONTROLE	10,28 ± 0,18 ^A	9,19 ± 0,70 ^A	7,0 ± 0,70 ^A	100 ± 0,0 ^A
2,18	10,13 ± 0,02 ^A	8,69 ± 0,26 ^A	5,5 ± 0,70 ^A	98 ± 0,0 ^B
4,37	9,24 ± 1,06 ^A	8,26 ± 0,22 ^A	7,5 ± 0,70 ^A	97 ± 0,0 ^C
8,74	8,99 ± 0,43 ^A	8,16 ± 0,37 ^A	7,5 ± 0,70 ^A	98 ± 0,0 ^B

*Controle refere-se a amostras sem adição de tratamentos. Tabela com valores de média ± desvio padrão. Experimento realizado em triplicata com duas repetições (n=6). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey para comparação das médias ± desvio padrão por coluna. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) na mesma coluna.

Comparando os resultados obtidos com o uso de doses da formulação composta pela combinação de nisina e extrato de lúpulo com valores obtidos com a adição dos antimicrobianos separadamente (Tabela 3.5) em teste de inibição em ensaios

fermentativos, observa-se que a ação dos antimicrobianos é alterada quando estes estão contidos em uma formulação única. O extrato de lúpulo possui aspecto de líquido viscoso com pH de $10 \pm 0,5$ quando diluído em 10% de água, enquanto a nisina utilizada possui aspecto de pó com pH de 3,47 em 10% de água. A formulação desenvolvida apresentou pH final de 4,26 após homogeneização. Sabe-se que a nisina apresenta melhor ação em solução ácida, e por se tratar de um peptídeo, esta pode ter sofrido alterações conformacionais ao ser misturada ao extrato de lúpulo. Assim, sugere-se a adição destes antimicrobianos separadamente para obter-se melhores resultados na redução de BAL em processos fermentativos.

3.3.4 Teste dos antimicrobianos utilizando massa de levedo industrial

Cientes que a microbiota presente no processo industrial é mais diversificada do que o avaliado em escala laboratorial, uma das doses (tratamento B) utilizadas nesta etapa foi superior ao utilizado nos testes laboratoriais. Os resultados obtidos em relação à população bacteriana durante os tratamentos estão descritas na Tabela 3.8. Não foram realizadas avaliações estatísticas para os resultados obtidos no teste fermentativo industrial devido a problemas enfrentados no primeiro dia de realização de testes. Observou-se um superaquecimento na estufa utilizada para incubação das amostras tratadas, ocorrendo a morte dos micro-organismos. Assim, foram obtidos resultados de um único dia de experimento, que não gerou um número de amostras suficiente para a análise estatística.

Pode-se observar que a redução da população de bactérias é mais notável após 24 h de ação dos diferentes tratamentos. O tratamento D (200 ppm de dióxido de cloro) apresentou uma redução mais rápida da população bacteriana, pois seu efeito oxidante é imediato. Contudo, é possível notar que este foi o único tratamento que apresentou aumento da população após 24 h. Após o período de 8 h, nota-se que a aplicação de dose três vezes maior do que a CIM da combinação de nisina e extrato de lúpulo reduziu a população de bastonetes em 1,058 log bactéria/mL em relação ao grupo controle, enquanto que o Tratamento A (3,75 mg/L nisina + 0,625 mg/L lúpulo) reduziu 0,862 log bactéria/mL. Após 24 h do tratamento, verificou-se que o tratamento B e C tiveram os melhores efeitos. Para a indústria, é muito importante que as fórmulas

antimicrobianas tenham efeito duradouro, capazes de reduzir a população de micro-organismos contaminantes durante o descanso da levedura e também durante o processo de fermentação. Neste sentido, a fórmula antimicrobiana desenvolvida apresentou ação semelhante ao produto comercial LactoStab[®], o qual é um dos líderes de mercado como substituto de antibióticos para usinas sucroalcooleiras no Brasil.

Tabela 3.8 – Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, LactoStab e dióxido de cloro em teste industrial sobre a população de bastonetes no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.

Tratamentos	População de bastonetes (log bactéria/mL)			
	População inicial (0 hora)	2 horas	8 horas	24 horas
Controle	7,255	7,398	7,516	6,693
Trat A (3,75 mg/L NISZ + 0,625 mg/L LUP)	7,255	7,193	6,654	6,009
Trat B (11,25 mg/L NISZ + 1,875 mg/L LUP)	7,255	7,041	6,458	5,614
Trat C (40 ppm Lactostab)	7,255	6,818	6,009	5,614
Trat D (200 ppm ClO ₂)	7,255	6,013	6,090	6,146

Controle refere-se à amostra sem adição de antimicrobiano; Tratamento A: 3,75 mg/L nisina Z + 0,625 mg/L lúpulo equivalente a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento B: 11,25 mg/L nisina Z + 1,875 mg/L lúpulo, equivalente a 3 vezes a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento C: 40 ppm Lactostab, equivalente a dose utilizada frequentemente pela usina de realização dos testes; Tratamento D: 200 ppm dióxido de cloro, equivalente a dose utilizada pela usina de realização dos testes. Tabela contendo resultados de amostras únicas avaliadas após períodos de 0, 2, 8 e 24 horas de ação.

Conforme informações repassadas pela usina de realização dos testes, o uso de dióxido de cloro apenas é realizado em situações de alta contaminação bacteriana, >7 log UFC/mL, pois este produto causa redução da viabilidade das leveduras e é extremamente corrosivo para as dornas e tubulações. Contudo, não foram observadas diferenças consideráveis na população de leveduras devido à presença dos tratamentos com antimicrobianos (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, LactoStab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a população de células de leveduras, no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.

Tratamentos	População de leveduras (log UFC/mL)			
	População inicial (0 hora)	2 horas	8 horas	24 horas
Controle	9,278	9,278	9,143	8,505
Trat A (3,75 mg/L NISZ + 0,625 mg/L LUP)	9,278	9,107	9,193	8,643
Trat B (11,25 mg/L NISZ + 1,875 mg/L LUP)	9,278	9,217	9,193	8,565
Trat C (40 ppm Lactostab)	9,278	9,274	9,100	8,688
Trat D (200 ppm ClO ₂)	9,278	9,245	9,045	8,748

Controle refere-se à amostra sem adição de antimicrobiano; Tratamento A: 3,75 mg/L nisina Z + 0,625 mg/L lúpulo equivalente a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento B: 11,25 mg/L nisina Z + 1,875 mg/L lúpulo, equivalente a 3 vezes a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento C: 40 ppm Lactostab, equivalente a dose utilizada frequentemente pela usina de realização dos testes; Tratamento D: 200 ppm dióxido de cloro, equivalente a dose utilizada pela usina de realização dos testes. Tabela contendo resultados de amostras únicas avaliadas após períodos de 0, 2, 8 e 24 horas de ação.

Os tratamentos foram realizados sobre as amostras retiradas do tanque de descanso das leveduras, após procedimento de reciclo de células. As leveduras permanecem nos tanques de fermentação por um período limitado, 8 à 12 h, e então são substituídas por células limpas (AMORIM, et al., 2011). Conforme valores descritos na Tabela 3.10, pode-se observar que a redução dos compostos solúveis totais, assim como a produção de etanol (°GL) permaneceram com valores semelhantes nas diferentes amostras no período entre 8 e 24 h. Foram observadas maiores diferenças nos resultados obtidos após as primeiras 8h de ação dos antimicrobianos se comparados aos valores determinados inicialmente. Nestas primeiras horas a amostra que recebeu a adição da combinação de 11,25 mg/L de NISZ com 1,87 mg/L de LUP apresentou um aumento de 0,56°GL de etanol em relação aos valores iniciais.

Tabela 3.10 – Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, Lactostab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a redução dos compostos solúveis totais e produção de etanol (°GL) após 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.

Tratamentos	Redução dos compostos solúveis totais (°BRIX)		Produção de etanol (°GL)		
	T(8 H)	T(24 H)	T(0 H)	T(8 H)	T(24 H)
Controle	3,79	5,61	4,82	5,52	5,22
Trat A (3,75 mg/L NISZ + 0,625 mg/L LUP)	3,95	5,53	4,82	5,24	5,02
Trat B (11,25 mg/L NISZ + 1,875 mg/L LUP)	3,9	5,53	4,82	5,38	5,72
Trat C (40 ppm Lactostab)	3,91	5,39	4,82	5,28	5,40
Trat D (200 ppm ClO ₂)	3,94	5,39	4,82	5,34	5,88

Controle refere-se à amostra sem adição de antimicrobiano; Tratamento A: 3,75 mg/L nisina Z + 0,625 mg/L lúpulo equivalente a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento B: 11,25 mg/L nisina Z + 1,875 mg/L lúpulo, equivalente a 3 vezes a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento C: 40 mg/L lactostab, equivalente a dose utilizada freqüentemente pela usina de realização dos testes; Tratamento D: 200 ppm dióxido de cloro, equivalente a dose utilizada pela usina de realização dos testes. Tabela contendo resultados de amostras únicas avaliadas após períodos de 0, 8 e 24 horas de ação dos antimicrobianos.

Avaliando os dados descritos na Tabela 3.11, pode-se observar que a viabilidade celular das leveduras, bem como a taxa de brotamento é reduzida drasticamente após 24 h para todos os antimicrobianos. Levando em consideração o tempo necessário para fermentação (8 à 12 h), pode-se destacar os valores obtidos após 8 h de ação dos antimicrobianos. Após este período a viabilidade das leveduras foi menor nas amostras não tratadas e na amostras com tratamento de 200 ppm de dióxido de cloro.

Tabela 3.11 – Resultados da utilização de tratamentos de diferentes doses de combinação de nisina e extrato de lúpulo, lactostab e dióxido de cloro em teste industrial. Foram avaliadas a % viabilidade e % de taxa brotamento de leveduras no tempo inicial (0 hora) e após 2, 8 e 24 horas de ação dos produtos sobre amostras de levedo após centrifugação.

Tratamentos	% Viabilidade celular de leveduras				% Taxa de brotamento de células de leveduras			
	T (0 hora)	T (2 horas)	T(8 horas)	T (24 horas)	T (0 hora)	T (2 horas)	T(8 horas)	T (24 horas)
Controle	73	68	61,7	13,6	8	9,6	12,64	2,5
Trat A (3,75 mg/L NISZ + 0,625 mg/L LUP)	73	67	70,14	18,77	8	8,12	5,64	11
Trat B (11,25 mg/L NISZ + 1,875 mg/L LUP)	73	67	62,61	15,28	8	10,14	6,63	10,87
Trat C (40 ppm Lactostab)	73	68	68,77	35,06	8	7,62	7,64	9,84
Trat D (200 ppm ClO ₂)	73	69	57,67	27,34	8	9,04	7,19	10

Controle refere-se à amostra sem adição de antimicrobiano; Tratamento A: 3,75 mg/L nisina Z + 0,625 mg/L lúpulo equivalente a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento B: 11,25 mg/L nisina Z + 1,875 mg/L lúpulo, equivalente a 3 vezes a CIM da combinação de nisina e lúpulo; Tratamento C: 40 mg/L lactostab, equivalente a dose utilizada freqüentemente pela usina de realização dos testes; Tratamento D: 200 ppm dióxido de cloro, equivalente a dose utilizada pela usina de realização dos testes. Tabela contendo resultados de amostras únicas avaliadas após períodos de 0, 2, 8 e 24 horas de ação dos antimicrobianos.

A realização de testes em ambiente industrial é de grande relevância para verificação da ação dos antimicrobianos, uma vez que a microbiota detectada nos tanques de fermentação e ao longo do processo de produção é muito diversificada se comparada aos micro-organismos utilizados nas avaliações laboratoriais. No teste fermentativo industrial, foi realizado contagem de bastonetes contaminantes por microscopia, conforme procedimento adotado pela usina. Esta metodologia é pouco precisa se comparada a metodologia utilizada laboratorialmente (contagem de micro-organismo em placa), porém tal procedimento é necessário para que a indústria entre com medidas de controle contra os contaminantes rapidamente, após detectar uma população muito elevada de bastonetes. A usina de escolha para realização destes testes fornece a massa de levedura seca para outras indústrias produtoras de ração para animais de produção e equinos. Por este motivo, o controle dos contaminantes somente é realizado com a adoção limpeza ácida sobre as leveduras e eventualmente, quando a contaminação atinge níveis acima de 10^7 UFC/mL, realiza-se o doseamento de dióxido de cloro ou de antimicrobianos naturais como o LactoStab[®]. Assim, a fórmula antimicrobiana desenvolvida neste trabalho vem como uma nova alternativa para o controle de contaminantes em usinas sucroalcooleiras que fazem uso de metodologias alternativas, podendo, o produto desenvolvido, ser utilizado em dose mais baixas que ao menos dois produtos utilizados atualmente como substitutos de antibióticos.

3.4 CONCLUSÃO

A combinação de nisina com extrato de lúpulo mostrou-se eficiente no controle de *Leuconostoc mesenteroides* (CCT 0848) e *Lactobacillus fermentum* (CCT 1629) em testes fermentativos de escala laboratorial. Até o presente momento, este é o primeiro estudo que observou a ação da combinação de nisina com extrato de lúpulo contra BAL. Ambos os produtos não interferiram na viabilidade das leveduras *S. cerevisiae* (CCT 012) e *S. cerevisiae* CAT-1, mesmo com aplicação de doses extremas, até 1000x CIM. Ao realizar a combinação de nisina e extrato de lúpulo foi possível reduzir a CIM de ambos os antimicrobianos em valores de 1/8 da CIM de cada um (3,75 mg/L de nisina + 0,625 mg/L de extrato de lúpulo), representando um efeito sinérgico conforme

valores de ICIF. Uma formulação desenvolvida com a mistura de extrato de lúpulo em nisina 2,5% com objetivo de criar uma formulação única, um único produto, resultou em reduções menos significativas de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum* durante o processo fermentativo se comparado a aplicação destes antimicrobianos adicionados separadamente no caldo de fermentação. Porém, a formulação desenvolvida, manteve os valores de contaminação bacteriana abaixo da contaminação presente nas amostras sem adição de tratamentos.

Em relação à aplicação industrial, faz-se necessário a realização de mais testes uma vez que a variabilidade da microbiota presentes nas usinas de produção de etanol é maior do que o testado no presente estudo. De qualquer maneira, a combinação de nisina e extrato de lúpulo apresenta um grande potencial como produto comercial por seu efeito sinérgico, podendo atingir resultados significativos na redução da microbiota contaminante de processos fermentativos com concentrações menores do que os produtos comerciais disponíveis no mercado.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSÃO GERAL

A utilização de alternativas ao uso de combustíveis petro-derivados é de extrema importância ao meio ambiente e o etanol é sem dúvidas o combustível mais utilizado nesta substituição. O controle dos contaminantes presente ao longo do processo de produção de etanol passa a ser uma obrigatoriedade ao setor para minimizar os prejuízos de produtividade, porém, o uso indiscriminado de antibióticos gera resistência microbiana e embargos para comercialização da massa de levedura em países europeus.

O uso de produtos de origem natural no setor sucroalcooleiro é de grande interesse ao setor para possibilitar o comércio da massa de levedura para suplementação da alimentação animal, sem trazer riscos ao consumo deste produto e sem a ocorrência de embargos para exportação. Diversos produtos a base de lúpulo são utilizados na produção de etanol e neste estudo verificamos que o extrato de lúpulo rico em β -ácidos (Betabio 45[®]) apresenta efeitos sinérgicos na combinação com nisina A ou Z.

Pelo conhecimento dos autores do presente estudo, não há até o momento, a utilização de nisina na indústria de produção de etanol, sendo comercializadas industrialmente, neste setor, apenas versões de extrato de lúpulo. Acredita-se que a combinação dos mecanismos de ação da nisina e extrato de lúpulo tenham proporcionado a efetividade no controle das bactérias. Esta combinação foi eficaz na redução de 2,486 log UFC/mL da população bacteriana presente nos testes fermentativos. Ressaltando que os valores necessários para utilização destes produtos em combinação são consideravelmente baixos se comparados a utilização de doses de nisina ou extrato de lúpulo separadamente.

Nas avaliações realizadas com levedo industrial pode-se concluir que o uso combinado de nisina e extrato de lúpulo apresentou resultados muito semelhantes aos antimicrobianos naturais utilizados na usina de realização dos testes, porém, é necessário a realização de demais testes já que a composição bacteriana presente ao

longo do processo industrial é mais variável do que ao estudado nas avaliações laboratoriais. Assim, as doses utilizadas industrialmente normalmente são superiores as doses laboratoriais. Também é necessário o desenvolvimento de uma fórmula antimicrobiana composta por nisina e extrato de lúpulo que apresente os mesmos valores encontrados na utilização da adição destes antimicrobianos separadamente. Isso se faz necessário no aspecto mercadológico, para facilitar a comercialização e aplicação na indústria sucroalcooleira.

5 REFERÊNCIAS

Abee T, Delves-Broughton J. Bacteriocins nisin. In Food preservatives. 2003;146-178.

Abbott DA & Ingledew WM. The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005; 69:16-21.

Abreu YV, Ávila RG, Gonçalves TS. The borders of sugar cane production in Brazil. *International Journal of Social Sciences and Entrepreneurship*. 2014; 01:210-217.

Alcarde AR. Árvore do conhecimento: cana-de-açúcar: fermentação. [Internet]. [Local Desconhecido]. Agência Embrapa de informação tecnológica (AGEITEC) 2005.[Citado em: 10 de novembro 2014]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG0110522122006154441.html>

Ali SS, Nugent B, Mullins E, Doohan FM. Insights from the fungus *Fusarium oxysporum* point to high affinity glucose transporters as targets for enhancing ethanol production from lignocellulose. *PloS One*. 2013; 08:54701.

Amorim HV, Leão RM. Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia. 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e comércio de Livros Ltda, 2005.

Amorim HV, Lopes ML, Oliveira JV. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 91:1267-1275.

Andrietta MGS, Andrietta SR, Steckelberg C, Stupiello ENA. Bioethanol-Brazil, 30 years of Proálcool. *International Sugar Journal*. 2007; 109:195-200.

Andrietta MGS, Andrietta SR, Stupiello ENA. Bioethanol what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane. Biofuel production-recent developments and prospects. InTech. 2011; 67-84.

Araújo FAD. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método da bicarbonatação. Revista Ciências e Tecnologia. 2007; 01:1-5.

Azzolini M, Tosi E, Veneri G, Zapparoli G. Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. South African Journal of Enology and Viticulture. 2014;31.

Bai FW, Anderson WA, Moo-young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology advances. 2008; 26:89-105.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry. 2006; 99:191-203.

Balat M, Balat H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Applied energy. 2009; 86:2273-2282.

Bartowsky EJ. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. Letters in Applied Microbiology. 2009; 48:49-156.

Basílio ACM, De Araújo PRL, De Moraes JOF, da Silva Filho EA, de Moraes Jr MA, Simões DA. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. Current Microbiology. 2008; 56:322-326.

Basso LC, De Amorim HV, De Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS yeast research. 2008; 8:1155-1163.

Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, de Amorim HV, Eggleston G, Basso LC. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014; 105:169-177.

Beckner M, Ivey ML, Phister TG. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in applied microbiology*. 2011; 53:387-394.

Betabio 45 ®. Especificações técnicas [Internet]. [Local Desconhecido]. [Citado em: 02 de fevereiro 2015]. Disponível em: http://hopsteiner.com/wp-content/uploads/2014/03/BetaBio45_e.pdf

Bischoff KM, Skinner-Nemec KA, Leathers TD. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2007; 34:739-744.

Bordignon-Junior SE, Miyaoka MF, da Luz Costa J, Benavente CAT, Couto GH, Soccol CR. Inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas em microdiluição por tratamento com nisina e EDTA. *Journal of Biotechnology*. 2012; 3:127-135.

Chang S, Kim BH, Shin PK. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and environmental microbiology*. 1997; 63:1-6.

Chung W, Hancock RE. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 60:25-32.

Chum HL, Warner E, Seabra JE, Macedo IC. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2014; 8:205-223.

Compart DP, Carlson AM, Crawford GI, Fink RC, Diez-Gonzalez F, DiCostanzo A, Shurson GC. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. *Journal of animal science*. 2013; 91:2395-2404.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento [Internet]. [Local Desconhecido]. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. V.1 SAFRA 2014/15. Terceiro levantamento. Dezembro 2014. [Citado em 16 de março de 2015]. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_2014-15.pdf

Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3: 777-788.

Cueva C, Moreno-Arribas M, Martín-Álvarez PJ, Bills G, Vicente MF, Basilio A, Bartolomé B. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in microbiology*, 2010; 161:372-382.

Cunha, A. F., Missawa, S. K., Gomes, L. H., Reis, S. F., Pereira, G. A. Control by sugar of *Saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production. *FEMS Yeast Research*. 2006; 6: 280-287.

Cunningham S, Stewart GG. Effects of high-gravity brewing and acid washing on brewers' yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1998; 56:12e8.

Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991; 57:3450-3455.

da Rosa SES & Garcia JLF. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *Revista do BNDES*. 2009; 32:118.

da Silva-Filho EA, Dos Santos SKB, Resende AM, De Moraes JOF, de Moraes Jr MA, Simões DA. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2005; 88:13-23.

da SILVA PHA & de FARIA FC. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008; 28:902-906.

D'auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical mycology*. 2005; 43:391-396.

Davis ME, Maxwell CV, Brown DC, De Rodas BZ, Johnson ZB, Kegley EB, Dvorak RA. Effect of dietary mannan oligosaccharides and (or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 2002, 80(11), 2887-2894.

de Oliveira Lima I, Oliveira RDAG, de Oliveira Lima E, Farias NMP, de Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006; 16:197-201.

de Paiva POR & Morabito R. Um modelo de otimização para o planejamento agregado da produção em usinas de açúcar e álcool. *Gestão e Produção*. 2007; 14:25-41.

de Paula Nobre T, Horii J, Alcarde AR. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2007; 27:20-25.

de Souza Liberal AT, Basílio ACM, Do Monte Resende A, Brasileiro BTV, Silva-Filho D, De Moraes JOF, De Moraes MA. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major

contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. Journal of applied microbiology. 2007; 102:538-547.

Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek. 1996; 69:193-202.

Dias MOS, Junqueira TL, Charles DFJ, Rossell CEV, Filho RM, Bonomi A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. Energy. 2012; 43:246-252.

Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? Applied and environmental microbiology. 2012 ;78:1-6.

Ebert J. Ethanol plants get sick too. Ethanol Producer Magazine, 2007. [Internet]. [Local Desconhecido]. [Citado em: 25 de Novembro, 2014]. Disponível em: http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id¼3331

European Commission (EC) n° 1831/2003 do parlamento europeu e do conselho de 22 de setembro de 2003. [Internet]. [Local desconhecido]. [Citado em 02 novembro, 2014]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32003R1831>

Feed Info News Service. Antibiotic-Contaminated Yeast Sparks Review of European Feed Safety System. [Internet]. [Local Desconhecido]. Food & Feed Safety, 08 setembro 2008. [Citado em 02 de março, 2015]. Disponível em: <http://www.feedinfo.com/console/PageViewer.aspx?page=1031231&public=yes>.

Furtado CE, Barboza ED, Brandi RA, Bueno L. Uso de levedura em equinos alimentados com dietas compostas de fenos de diferentes qualidades nutricionais. Revista Brasileira de Zootecnia. 2010; 39:2194-2199.

Ghorbani F, Younesi H, Esmaeili Sari A, Najafpour G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. Renewable Energy. 2011; 36:503-509.

Godoy A, Amorim HV, Lopes ML, Oliveira AJ. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. International sugar journal. 2008; 110:1311.

Graves T, Narendranath NV, 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. 2007; 73:1190-1196.

Hansen AC, Kyritsis DC. Characteristics of biofuels and renewable fuel standards. Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries. 2009; 1-26.

Holt SM, Al - Sheikh H, Shin KJ. Characterization of dextran - producing *Leuconostoc* strains. Letters in applied microbiology. 2001; 32:185-189.

Ingram LC. Synthesis of the antibiotic nisin: Formation of lanthionine and β -methyl-lanthione. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1969; 184:216-219.

Jouany JP, Medina B, Bertin G, Julliand V. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. Journal of animal science. 2009; 87:2844-2852.

Jozala AF, Silva DP, Vicente AA, Teixeira JA, Júnior AP, Penna TC. Processing of by products to improve nisin production by *Lactococcus lactis*. African Journal of Biotechnology. 2013; 10:14920-14925.

Kaklamanos G, Vicent U, Von HC. Multi-residue method for the detection of veterinary drugs in distillers grains by liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013; 1322:38-48.

Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 1993; 12:39-85.

Landell LC, Kronka RN, Lima GJMM, Thomaz MC. Utilização de levedura de centrifugação da vinhaça *Saccharomyces cerevisiae* como fonte protéica para suínos em crescimento e terminação. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 1993; 22:961-963

Leathers TD, Bischoff KM. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology letters*. 2011; 33:517-523.

Leite IR. Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista (Dissertação de mestrado). Uberlândia MG: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de engenharia química; 2011

Leite IR, Faria JR, Marquez LDS, Reis MHM, Resende MM, Ribeiro EJ, Cardoso VL. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology*. 2013; 106:611-618.

Limayem A, Hanning IB, Muthaiyan A, Illegghems K, Kim JW, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Alternative antimicrobial compounds to control potential *Lactobacillus* contamination in bioethanol fermentations. *Journal of Environmental Science and Health*. 2011; 46:709-714.

Lopes MB & Silva TMB. Teste de Sensibilidade in Vitro aos antibióticos do processo de fermentação de uma usina sucroalcooleira no interior do Paraná. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*. 2011; 4.

Lucena BTL, Santos BM, Moreira JLS, Moreira APB, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi A, Thompson FL, Junior MAM. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC microbiology*. 2010; 10:298.

Ludwig KM, Oliva-Neto P, Angelis DD. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e tecnologia de alimentos*. 2001; 21:63-66.

Lushia W, Heist P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. *Ethanol producer magazine*. 2005; 80-82.

Mckenzie HA & White Jr FH. Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in protein chemistry*. 1991; 41:173-315.

Manitchotpisit P, Bischoff KM, Price NPJ, Leathers TD. *Bacillus spp.* produce antibacterial activities against lactic acid bacteria that contaminate fuel ethanol plants. *Current microbiology*. 2013; 66:443-449.

Meneghin SP, Reis FC, Almeida PGD, Ceccato-Antonini SR. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008; 39:337-343.

Macedo IC. Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos avançados*. 2007; 21:157-165.

Marques TA, Serra GE. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2004; 24:532-353.

Messetti MA, Dos Santos AM, Angelis DF, Chierice GO, Neto SC. Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis L.* (mamona) como agente biocida e redutor da

viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. Arquivos do Instituto Biológico. 2010; 77:301-308.

Moreno I, Lerayer AL, Vera Lúcia S, Baldini MF. Efeito e modo de ação das bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. Ciência Tecnologia Alimentos. 1999; 19:23-28.

Mussatto SL, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JA. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnology advances. 2010; 28:817-830.

Murphree CA, Heist EP, Moe LA. Antibiotic Resistance Among Cultured Bacterial Isolates from Bioethanol Fermentation Facilities Across the United States. Current microbiology. 2014;1-9.

Muthaiyan A, Ricke SC. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. Bioresource technology. 2010; 101:5033-5042.

Muthaiyan A, Limayem A, Ricke SC. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. Progress in Energy and Combustion Science. 2011; 37:351-370.

Narendranath NV, Hynes SH, Thomas KC, Ingledew WM. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. Applied and environmental microbiology. 1997; 63:4158-4163.

Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. Applied and environmental microbiology. 2000; 66:4187-4192.

Natarajan P, Katta S, Andrei I, Ambati VBR, Leonida M, Haas GJ. Positive antibacterial co-action between hop *Humulus lupulus* constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*. 2008; 15:94-201.

Neris DJG, Bordignon-Junior SE, Baratto CM, Gelinski JMLN. Nisin in the biopreservation of Bordô (Ives) and Niágara table wines from Santa Catarina, Brazil. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*.2013;4.

Palaniappan K & Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International journal of food microbiology*, 2010; 140:164-168.

Penna TCV, Jozala AF, Gentile TR, Pessoa Jr A, Cholewa O. Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2006; 129, 334-346.

Peng J, Zhang L, Gu ZH, Ding ZY, Shi GY. The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology*, 2012; 55:128-134.

Pinto E, Gonçalves MJ, Oliveira P, Coelho J, Cavaleiro C, Salgueiro L. Activity of *Thymus caespititius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. *Industrial Crops and Products*. 2014; 62:107-112.

Piper C, Hill C, Cotter PD, Ross RP. Bioengineering of a Nisin A - producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial biotechnology*. 2011; 4:375-382.

Pippo WA, Luengo CA, Alberteris LAM, Garzone P, Cornacchia G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. *Waste and Biomass Valorization*. 2011; 2:1-16.

Prado JL. Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica (Dissertação de mestrado). Botucatu SP. Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp; 2014.

Punyaappa-path S, Phumkhachorn P, Rattanachaikunsopon P. Nisin: Production and mechanism of antimicrobial action. International Journal of Current Research and Review. 2015;7:47-53.

Radler F. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. American journal of enology and viticulture.1990; 41:1-6.

Rayman MK, Aris B, Hurst A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. Applied and Environmental Microbiology.1981; 41:375-380.

Rich JO, Leathers TD, Nunnally MS, Bischoff KM. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. Bioresource technology, 2011; 102:1124-1130.

Rosillo-Calle F, Cortez LAB. Towards Proálcool II—a review of the Brazilian bioethanol programme. Biomass and Bioenergy.1998; 14:115-124.

Rozalski M, Micota B, Sadowska B, Stochmal A, Jedrejek D, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B. Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus L.* derived products: new pharmacological properties. BioMed research international, 2013.

Rückle L & Senn T. Hop acids can efficiently replace antibiotics in ethanol production. International sugar journal. 2006; 108:139-147.

Sánchez-Maldonado AF, Schieber A, Gänzle MG. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology*. 2011; 111:1176-1184.

Schneider N, Werkmeister K, Pischetsrieder M. Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food chemistry*. 2011; 127:847-854.

Schillinger U. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In *Biotechnology and Food Safety: Proceedings of the Second International Symposium*. Elsevier; 2014:55.

Silva JB, Sauvageau D. Bacteriophages as antimicrobial agents against bacterial contaminants in yeast fermentation processes. 2013. (Tese de Doutorado). University of Alberta.

Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004;31:401-408.

Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE. The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*. 2000, 79(2), 205-211.

Srinivasan V, Goldberg D, Haas GJ. Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents. *Economic botany*. 2004; 58:S230-S238.

Suzuki K, Sami M, Kadokura H, Nakajima H, Kitamoto K. Biochemical characterization of horA-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. *International journal of food microbiology*, 2002; 76:223-230.

Suzuki K, Iijima K, Sakamoto K, Sami M, Yamashita H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*. 2006; 112:173-191.

Tiukova I, Eberhard T, Passoth V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol - producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2014; 61:40-44.

Turgis M, Vu KD, Dupont C, Lacroix M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*. 2012; 48:696-702.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Segundo relatório de sustentabilidade. [Internet]. [Local Desconhecido]. [acesso em 11 de setembro de 2014]. Disponível em <http://www.unica.com.br/gri/>

Vriesekoop F, Krahl M, Hucker B, Menz G. 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*. 2012;118:335-345.

Wikler MA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006.

Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, Tagg JR. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and environmental microbiology*. 2006; 72:1148-1156.

Zanoli P & Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116:383-396.

Zanutto CA, Moreira I, Furlan AC, Scapinello C, Murakami AE. Utilização da levedura de recuperação *Saccharomyces* sp., seca por rolo rotativo ou por spray-dry, na alimentação de leitões na fase inicial. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 2008; 21:705-710.