

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

BIOCIDAS NATURAIS NO CONTROLE BACTERIANO DO PROCESSO FERMENTATIVO DO ETANOL

ALINE JULIANA JORGE

Orientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia
Nilo De Stéfani - Jaboticabal, para obtenção do
título de Tecnólogo em Biocombustíveis.**

**Jaboticabal – SP
1º Semestre/2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Jorge, Aline Juliana

J82b Biocidas naturais no controle bacteriano do processo fermentativo do etanol / Aline Juliana Jorge.— Jaboticabal : Fatec Nilo De Stéfani, 2014. 28p.

Orientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani - Jaboticabal, 2014.

1. Antimicrobianos.. 2. Lúpulo. 3 Beta-ácidos. I. Salaro, M. C. F. II. Título.

CDU 663.13

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BIOCIDAS NATURAIS NO CONTROLE BACTERIANO DO PROCESSO FERMENTATIVO DO ETANOL.

AUTOR: ALINE JULIANA JORGE

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à Fatec-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

LAÍS POSTAI SACCO

BIANCA DE MELLO SILVEIRA

Data da apresentação: 03 de junho de 2014.

BIOCIDAS NATURAIS NO CONTROLE BACTERIANO DO PROCESSO FERMENTATIVO DO ETANOL

NATURAL BIOCIDES IN THE BACTERIAL FERMENTATION PROCESS CONTROL OF ETHANOL

Aline Juliana Jorge⁽¹⁾

Resumo

Durante a produção do bioetanol das indústrias sucroenergéticas é comum o desenvolvimento de diferentes tipos de micro-organismos contaminantes no decorrer do processamento das matérias primas. Podendo ocorrer o desenvolvimento de produtos indesejáveis, provocando perdas no rendimento da fermentação. Com o intuito de evitar grandes perdas, o controle microbiológico é necessário. As práticas usualmente utilizadas nas usinas é com tratamento ácido do creme da levedura e a aplicação de antibióticos. Porém o uso de antibióticos deixam resíduos no produto final, além de favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes tendo um custo elevado para o setor. antimicrobiano natural tem ganhado cada vez mais espaço no setor, por possui eficácia e baixo custo quando comparado com os antibióticos sintéticos. O extrato da própolis e o extrato da flor do lúpulo por exemplo apresentam bons resultados. É possível concluir que o antimicrobiano natural é tão eficaz quanto o antimicrobiano convencional, possuindo a vantagem de não deixar resíduos no produto final e apresentam baixo custo. O extrato de própolis pode vir a substituir os antibióticos mesmo que ainda estes apresentem uma eficiência maior em relação ao extrato etanólico da própolis. Os β - ácidos do lúpulo podem substituir os antibióticos sintéticos ou convencionais com segurança, pois apresentam resultado semelhante aos antibióticos de uso convencional

Palavras-chave: antimicrobianos; flor do lúpulo, beta-ácidos; extrato de própolis.

¹ Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis pela Fatec Nilo De Stéfani - Jaboticabal. Endereço eletrônico: alinejjorge@hotmail.com

Abstract

During the production of bioethanol in the sugar-energy industries, the development of different types of contaminant microorganisms during the processing of raw materials may occur, causing losses of fermentation yield. In order to avoid heavy losses, the microbiological control is necessary. The practices usually used in mills are the yeast cream acid treatment and the application of antibiotics. The use of antibiotics leaves residues in the final product, as well as encourages the growth of resistant strains, thus causing a high cost for the sector. The natural antimicrobial has increasingly gained space, for its effectiveness and low cost when compared to synthetic antibiotics. For example, the propolis extract and of the hops flower extract have shown good results. It can be concluded that the natural antimicrobial is as effective as the conventional antimicrobial, having the advantage of not leaving residual in the final product, not causing bacterial resistance and having low cost. The propolis extract could replace antibiotics even if these still present a greater efficiency in relation to the alcoholic extract of propolis. The β -hop acids can replace synthetic or conventional antibiotics safely, because they feature similar result to conventional usage antibiotics.

Keyword: antimicrobials; hopsflower, beta-acids; propolis extract.

1 Introdução

A produção de etanol da indústria sucroenergética ocorre por via fermentativa e é muitas vezes processado em condições adversas. Neste processo as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol, gás carbônico e compostos secundários, podendo gerar vários problemas, dentre eles a contaminação bacteriana, que consiste em uma das principais preocupações das indústrias sucroenergéticas (CHERUBIN, 2003).

O controle da contaminação bacteriana no processo de fermentação etanólica é uma etapa fundamental para assegurar resultados positivos na produção de etanol, sendo necessário adotar medidas eficazes que incluam desde a realização de uma boa assepsia do sistema até a escolha de bactericidas ou bacteriostáticos adequados. A utilização de antibióticos apresenta-se como uma alternativa para o controle (LEITE, 2011).

A contaminação bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo, tais como: perdas de açúcar, formação de goma, aumento da floculação do fermento, redução e inibição da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade do etanol (CAETANO, 2010).

O controle e o monitoramento da fermentação alcoólica são de extrema importância (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007). As práticas usualmente utilizadas nas indústrias para reduzir, conter ou inibir a contaminação bacteriana são principalmente o tratamento ácido do creme de levedura e a aplicação de antibióticos durante a fermentação. Porém o uso contínuo destes produtos pode favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes, tornando-as cada vez menos sensíveis à sua ação, gerando um alto custo do processo de produção, além de possibilitar a incorporação de resíduos no produto final obtido (BADIN, 2010).

Segundo Viegas (2011) uma possível solução para diminuição do resíduo de antibióticos nos destilados e nas leveduras é o uso de biocidas naturais que possivelmente não deixam resíduos no processo e consequentemente no produto final. Estes compostos bioativos com função antimicrobiana além de isentar os resíduos de antibióticos ou produtos químicos, não geram resistência às bactérias e não afetam a qualidade da levedura. Geralmente, é utilizado um único produto, podendo reduzir em paralelo o consumo de outros insumos, como o ácido sulfúrico. A toxicidade apresentada pelos biocidas naturais sobre alguns microrganismos podem ser atribuídas a alta complexidade de sua fórmula química.

Na indústria sucroenergética o uso de antibióticos é bastante comum, dentre os antibióticos mais utilizados estão a penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, cefalosporina, macrolídeos, monensina dentre outros. As indústrias vem usando usinas buscando aditivos naturais com propriedades antimicrobiana e antioxidante que possuam um efeito igual ou superior aos antibióticos sintéticos com menor custo (VIEGAS, 2011).

De acordo com Viegas (2011) entre os produtos naturais, a própolis é definida como uma resina natural produzida pelas abelhas, tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, assim utilizados como ingrediente na formulação de vários produtos. A própolis apresenta composição química bastante complexa, sendo constituída por flavonóides, ácidos fenólicos, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas, considerados os mais importantes agentes antimicrobianos (BADIN, 2010). Sendo utilizada pela população, pelas suas propriedades biológicas, incluindo processos inflamatórios e infecções bacterianas. Estudos realizados da atividade antibacteriana do extrato de própolis contra os gêneros bacterianos gram-positivos demonstram sensibilidade ao extrato.

Em paralelo à própolis, o mercado tem alternativa para esta eficácia antimicrobiana, o lúpulo (*Humulus lupulus Linneus*) uma flor da família das Canabidáceas que entra na composição das cervejas, conferindo a ela o amargor residual. Embora seja da mesma família da maconha a planta não apresenta o efeito entorpecente, serve para dar à cerveja seu amargor, além de contribuir no aroma da bebida. Sendo um potente antioxidante natural, além de apresentar alguns componentes de efeito bactericida. O lúpulo é um dos três fatores que tornam a cerveja um ambiente hostil à presença de bactérias causadoras de doenças, os outros são álcool e o gás carbônico (NOGUEIRA, 2004). Em um estudo realizado por OLIVEIRA, [s.d.] o uso do extrato de lúpulo tem mostrado que o beta-ácido possui propriedades antimicrobianas e são particularmente ativos contra bactérias gram-positivas se mostrando eficiente na inibição do crescimento dos micro-organismos, obtendo maior eficiência em *Lactobacillus*, usualmente a de maior ocorrência na contaminação de processos fermentativos.

Diante de várias alternativas de biocidas naturais para o controle da contaminação em processos fermentativos para obtenção do etanol, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atual utilização de biocidas no processo fermentativo e assim propor alternativas naturais para o setor sucroenergético baseados em dados bibliográficos.

2.Desenvolvimento

2.1 Histórico da produção da cana-de-açúcar e do bioetanol no Brasil

O setor sucroalcooleiro, após a decadência no período colonial, voltou a ser privilegiado nos anos 30, posteriormente à crise do café de 1929, onde foi criado o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) pelo Governo Vargas. Este Instituto tinha por função regulamentar o mercado açucareiro no Brasil, principalmente através de leis que normatizavam a produção nacional do açúcar e seus derivados de acordo com a demanda do mercado interno e externo, através de cotas de produção, com uma política rígida sobre as exportações, assumindo assim o monopólio sobre o comércio exterior do açúcar e seus derivados (CONAMA, 2006).

Com a crise do petróleo na década de 70, devido aos altos preços alcançados pelo barril e ao grande interesse de muitos governantes foi necessário buscar fontes alternativas de combustíveis. O impulso foi dado após o governo retomar as pesquisas e os investimentos para o desenvolvimento do álcool como combustível (CONAMA, 2006).

A criação do Programa Nacional do Alcool – Proálcool em 1975 foi um grande momento deste período e visava estimular a produção do álcool pelos empresários do setor, a juros favorecidos e a garantia de altos preços de vendas. O estímulo foi estabelecido até a implantação do parque industrial e do alcance da produtividade em níveis consideráveis. Este programa ajudou o Brasil a conquistar uma tecnologia única no mundo para uso em larga escala de um combustível renovável que não dependeria do mercado internacional do petróleo (CAVALCANTI, 2007).

O etanol brasileiro vem despertando a atenção de todo o mundo por ser uma fonte de energia renovável e economicamente viável. O Brasil tem a seu favor alguns pontos fundamentais, como clima, área de cultivo e tecnologia, capazes de fazer com que este biocombustível se torne um dos pilares do mercado nacional e internacional de combustíveis renováveis. Tamanho potencial colocou o país e esta promissora atividade em foco, atraindo constantes investimentos e, claro, elevando o grau de exigência para o retorno sobre o capital investido. Nesse contexto, a procura por novas tecnologias capazes de aumentar a rentabilidade e eficiência em todas as etapas inseridas nesse processo entrou em pauta no universo acadêmico e nos bastidores do setor sucroenergético (LEITE, 2011).

Diante desse contexto o etanol brasileiro vem se destacando no cenário mundial de biocombustíveis, pois apresenta impactos ambientais mínimos e já se encontra tecnologicamente desenvolvido a ponto de ser produzido em escalas suficientes para substituir combustíveis fósseis, além de fazer parte da solução do aquecimento global um grave problema ambiental que vem assolando as nações e a humanidade, e também para o cumprimento do Protocolo de Kyoto.

2.2 Panorama atual com dados da última safra

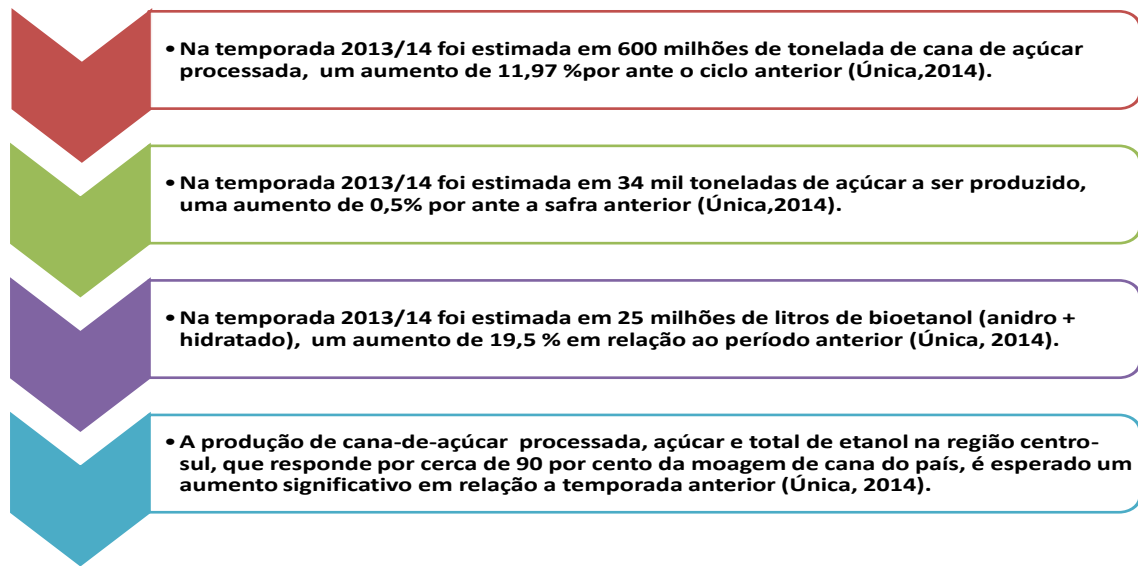
A posição do Brasil no que se refere à produção de biocombustíveis pode ser classificada como privilegiada, em virtude da conjugação de dois fatores: a grande extensão territorial e o clima tropical. Isso é particularmente verdadeiro no que diz respeito à produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar, na qual a liderança do país, estabelecida há décadas, foi consolidada em 2003 durante o governo de Luis Inácio Lula da Silva com a introdução dos veículos com motor flexível, e com isso o aumento do interesse pela biomassa brasileira foi evidenciado (MILANEZ *et al*, 2008).

A participação do etanol na matriz energética brasileira, no que se refere ao transporte rodoviário, registrou um crescimento acentuado nos últimos anos. Tal participação deverá intensificar-se a médio e longo prazo, em virtude de múltiplos fatores, entre os quais se destacam a provável manutenção dos preços do petróleo em patamares elevados e a crescente percepção da necessidade de deter ou, no mínimo, atenuar o aquecimento global (MILANEZ *et al*, 2008).

Cabe ao governo estimular o desenvolvimento de diferentes tecnologias que possam impulsionar a produtividade do setor sucroenergético. A viabilização do etanol de segunda geração pode incrementar a produção de etanol, ajudando as usinas a atenderem a demanda em 2020. Mas pesquisas também precisam ser incorporadas, inclusive na área agrícola (CLIVONEI, 2014).

Segundo os dados divulgados na segunda quinzena do mês de fevereiro de 2014 pela União da Indústria da Cana de açúcar (UNICA). O volume total de cana-de-açúcar processada ao final da safra 2012/13 foi de 535,7 milhões de toneladas. Patamar superior ao que os especialistas previam no início do ciclo. A produção tende a ser maior ainda na temporada 2013/14. Maiores dados encontramos abaixo na Figura 1.

Figura 1: Posição acumulada até a 1ª quinzena de fevereiro de 2014, dados da safra 2013/2014. Fonte:(UNICA,2014).



Fonte: Única (2014).

2.3 Fermentação do Etanólica

A fermentação etanólica é um processo químico e biológico de transformação dos açúcares em álcool, desencadeado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um micro-organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, e que permite alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações do meio, com grande impacto no rendimento do processo. A transformação da sacarose em etanol e gás carbônico (CO₂) por essas leveduras envolvem 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático se encontra confinado em seu citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação se processa (LEITE, 2011).

O processo fermentativo pode ser afetado pela ação de diversos fatores sofridos por estas enzimas glicolíticas, como quantidade de nutrientes, presença de inibidores, vitaminas, pH, temperatura, entre outros. Por gerarem ATP, as rotas produtoras de energia necessitam de diversas coenzimas para realização das diferentes reações de biossíntese. O ácido pirúvico, um produto final importante em todas as rotas, em anaerobiose é precursor dos ácidos, alcoóis e outros produtos (WARD, 1991 *apud* SILVA, 2010).

Para o processo de fermentação do mosto de caldo de cana de açúcar e melaço para produção de açúcar e etanol são empregadas cepas selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA, 2010). A população microbiana natural do caldo de cana composta por bactérias e leveduras que interagem no decorrer do processo fermentativo. As leveduras envolvidas na fermentação do caldo de cana incluem principalmente, os gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e diversas espécies de *Candida*. Dentre as leveduras que participam do processo fermentativo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a utilizada para realizar a fermentação. Isto ocorre, principalmente, pela capacidade desta levedura de produzir e tolerar altas concentrações de etanol (LIMA, 2001 *apud* BREGAGNOLI, 2006).

Nas destilarias do Brasil o processo de fermentação mais utilizado é o Melle-Boinot, cuja característica principal é a recuperação das leveduras do vinho mediante sua centrifugação. Assim, após a fermentação, as leveduras são recuperadas e tratadas para novo uso, enquanto o vinho é enviado para as colunas de destilação (VIEGAS, 2011).

O processo fermentativo que ocorre nas dornas de fermentação para a produção de etanol, acontece em três etapas distintas: A pré-fermentação se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após cinco a seis horas, com pouca espuma, inicia-se a 2ª etapa da fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando as espumas desaparecem, durando de nove a dez horas. Temos também a 3ª fase complementar que leva de quatro a seis horas, caracterizando-se pela diminuição do desprendimento de dióxido de carbono e diminuição da temperatura. Nesta fase a concentração de açúcar chega ao fim e obtemos então o etanol.

2.4 Comprometimento da produção de Etanol

A indústria sucroenergética tem um papel relevante na economia brasileira assim sendo um considerável gerador econômico. Como toda a produção de etanol ocorre por via

fermentativa, é fundamental o conhecimento de todo o processo que tem sido constantemente aprimorado. A presença de micro-organismos no processamento de cana-de-açúcar ocorre desde a lavoura até o setor de fermentação, estando presente no caldo de cana e no melaço pode refletir na qualidade do mosto, pois os nutrientes orgânicos e inorgânicos presentes no mosto são ótimos substratos para o aparecimento de microrganismos devido a alta atividade de água, pH, além das variações de temperatura que ocorrem nos processos industriais (GALLO, 1990; GALLO & CANHOS, 1991 *apud* CHERUBIN, 2003).

Uma das principais preocupações na indústria sucroenergética é combater os micro-organismos contaminantes do processo fermentativo do etanol, representados pelas bactérias e leveduras selvagens que se instalam no processo. As leveduras selvagens quando se tornam resistentes podem dominar o processo fermentativo, tendo uma queda considerável no rendimento etanólico através da produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos, os quais, em quantidades superiores são responsáveis pela queda do rendimento da fermentação.

Estes contaminantes são causadores de problemas como: aumento do consumo de açúcar, queda de viabilidade celular da levedura devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento que acarreta perda de células de levedura depositadas no fundo da dorna ou na centrífuga e queda do rendimento industrial. Outro problema presente no processo fermentativo é o aumento da viscosidade do caldo provocada pela formação de gomas, como a dextrana que desencadeando contaminação, podem causar inúmeros problemas operacionais na fábrica (CHERUBIN, 2003).

2.4.1 Contaminação bacteriana e seu controle durante o processo de fermentação

Durante o processo de fermentação etanólica, as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico. Nesta fase podem ocorrer vários problemas, entre os principais a contaminação bacteriana. Devido à temperatura, acidez, concentração de açúcares e nutrientes, entre outros fatores, que ocorrem durante a fermentação alcoólica, há o desenvolvimento de muitos micro-organismos como bactérias e várias espécies de leveduras, além da *Saccharomyces cerevisiae* que passam a ser considerados contaminantes (CHERUBIN, 2003).

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana é a degradação da sacarose e o acúmulo de ácidos láctico e acético, que ocasiona perda de açúcar fermentescível e intoxicação por leveduras, podendo levar a morte das mesmas. Uma elevada contaminação bacteriana inicial pode acarretar a inibição de crescimento da levedura responsável pelo processo fermentativo, reduzindo a produção de etanol e consequentemente perda na eficiência da destilaria causando prejuízo a indústria (CAETANO, 2010).

A redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias produtoras de ácidos láctico é considerável, pois, quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico resulta em duas moléculas de etanol que deixaram de serem produzidas pela levedura no processo. Além disso muitos nutrientes são utilizados pelas bactérias para sua multiplicação bacteriana e deixam ser aproveitados pela levedura (CHERUBIN, 2003).

2.4.2 Controle da Contaminação

O controle da contaminação bacteriana no processo fermentativo etanólico é uma etapa fundamental para assegurar resultados positivos na produção de etanol. Para isto, é necessário adotar medidas adequadas que incluam desde a realização de boa assepsia do sistema até a escolha de bactericidas ou bacteriostáticos eficazes. Industrialmente, a aplicação de ácido sulfúrico, como antisséptico no preparo do pé-de-cuba é a prática mais utilizada para descontaminação do inóculo. Porém, na maioria das vezes, esta medida é insuficiente, e a recorrência aos antibióticos químicos para controle da contaminação se faz necessária (LEITE, 2011).

2.5 Antibióticos

Segundo Eguchi (2007) os antibióticos são compostos orgânicos naturais ou sintéticos, que causam a inibição ou destruição de micro-organismos específicos, apresentando uma seletividade quanto a seus alvos. A sua aplicação é usualmente em dosagens muito baixas. Como os seus alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz a seleção de microrganismos resistentes.

Os antibióticos também são considerados agentes quimioterapêuticos especiais, comumente obtidos a partir de metabólitos de micro-organismos e geralmente mofo e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Bacillus* e *Paenibacillus spp* que, em quantidades muito pequenas, podem matar ou inibir outros micro-organismos. Os antibióticos englobam uma grande diversidade de substâncias que podem ser classificadas segundo o mecanismo de ação de cada uma (SILVA, 2010).

O antimicrobiano sintético mais utilizado pela indústria sucroalcooleira no Brasil são a penicilina e antibióticos a base de monensina, os dois agem de maneira eficiente em bactérias gram-positivas. A monensina é uma substância rigorosamente monitorada em países europeus que importam levedura seca brasileira, devido o residual encontrado no produto final.

A utilização de antibióticos apresenta-se como uma das possibilidades para controle da contaminação, em virtude de suas propriedades bactericidas e/ou bacteriostáticas. Porém, o uso contínuo destes produtos pode favorecer o desenvolvimento de linhagens resistentes, como citado acima, tornando-as cada vez menos sensíveis à sua ação, gerando elevado custo do processo de produção, além de possibilitar a incorporação de resíduos no produto final obtido.

Essa resistência fundamenta-se nas modificações genéticas sofridas constantemente por esses micro-organismos, gerando descendentes com características diferentes e muitas vezes favoráveis a resistência a ação daquele antibiótico. Uma vez que a reprodução celular desses micro-organismos acontece rapidamente, uma simples bactéria resistente surgida em meio a tantas outras susceptíveis a ação do antibiótico consegue gerar milhões de outras bactérias resistentes em poucas horas (LEITE, 2011).

2.6 Biocidas

Uma rota alternativa aos antibióticos vem sendo apresentada ao setor sucroenergético. Produtos naturais que prometem agir como antibióticos, mas sem deixar resíduos na levedura, estão entrando no mercado de insumos químicos para destilarias. Os antibióticos naturais, como são chamados, passaram a ser uma opção para aquelas usinas que têm interesse na comercialização de leveduras íntegras (LEITE, 2011).

Para exercerem sua função, os biocidas agem, nos componentes celulares funcionais principalmente na parede celular, nos componentes da membrana citoplasmática e no citoplasma.

O acesso a estes alvos é determinado pela composição química e propriedades físico-químicas que cada biocida apresenta, bem como pelas interações com o material extracelular, pela composição química e morfológica das células (DENYER; STEWART, 1998 *apud* CAPELLETI, 2006).

Os biocidas não-oxidantes, que englobam uma enorme variedade de compostos orgânicos, exercem atividade antimicrobiana atuando sobre os micro-organismos por interferência em seu metabolismo e/ou pela desintegração da parede celular. Porém, contrariamente aos biocidas oxidantes, os micro-organismos podem se adaptar aos biocidas não-oxidantes, principalmente se estes forem aplicados em dosagens abaixo da concentração mínima requerida e por longos períodos. Portanto, sua aplicação tem requerido melhoria nos critérios de seleção dos compostos para o tratamento de contaminações.

Segundo Capelleti,(2006) a escolha de um agente antimicrobiano com ampla atividade se faz necessária quando o alvo é constituído por distintos tipos de micro-organismos. Por vezes, princípios ativos em associação apresentam sinergismo na erradicação de comunidades de micro-organismos e/ou quando estes são resistentes a tratamentos convencionais.

2.6.1 Emprego dos produtos naturais

Os biocidas naturais estão sendo empregados com amplo sucesso no controle de micro-organismos contaminantes da fermentação, mas os resultados são demonstrados de forma isolada. A aplicação das principais formas de controle com biocidas naturais pode auxiliar na tomada de decisão para um tipo de controle que entra em acordo com as exigências atuais de redução de resíduos aplicados ao meio ambiente. Além disso, a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol é de elevado custo, enquanto que o controle exercido pelos biocidas apresenta baixos custos de utilização. Torna-se claro a necessidade de tornar os biocidas produtos padronizados para o emprego em larga escala na indústria de produção de etanol (CAETANO, 2010).

Os antimicrobianos naturais são substâncias que agem sobre os micro-organismos, incluindo bactéria, vírus e fungos inibindo seu crescimento ou causando a sua destruição, constituí cada vez mais uma forma segura e eficaz de eliminar esses micro-organismos. O uso desses compostos na indústria de alimento começa a crescer no mercado europeu, em

combinação com outras técnicas modernas de controle, como a análise de riscos e o controle de pontos críticos (REVISTA FOOD INGREDIENTS, 2010).

Na maioria dos casos, os antimicrobianos são usados principalmente para inibir o crescimento de fungos e leveduras, e sua ação depende, em grande parte, do pH, quanto mais ácido maior seu potencial biocida. Os sistemas antimicrobianos naturais presentes nas plantas, animais ou micro-organismos estão cada vez mais ganhando adeptos, especialmente em atividades antimicrobianas a partir de extratos de vários tipos de plantas que são usadas como agente saborizantes em alguns alimentos (REVISTA FOOD INGREDIENTS, 2010).

O emprego dos recursos naturais como mecanismos auxiliar no controle bacteriano durante o processo fermentativo

2.6.2 Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera* pela transformação de diferentes exudatos secretados pelas árvores, folhas e flores. Utilizam esta substância para proteção da colméia contra proliferação de micro-organismos, incluindo fungos e bactérias e também para selar aberturas e eliminar insetos invasores (BADIN, 2010). A própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar diversos grupos químicos, podendo variar dependendo da biodiversidade da região que for coletada (VIEGAS, 2011).

Os flavonóides, juntamente com os ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. Outros compostos são os óleos voláteis e ácidos aromáticos, ceras, resinas, bálsamo e pólen que são uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco. O mecanismo de atividade antimicrobiana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (FERNANDES et al., 2004).

A levedura é um micro-organismo que se adapta facilmente ao meio, dependendo onde é inoculada. Esta ocorre, sobretudo, em condições que favoreçam suas atividades metabólicas, que é afetado em condições adversas ocasionando então o estresse. O extrato de própolis não causa o estresse das leveduras. Estudos demonstram que o extrato de própolis é tão eficiente quanto a

ampicilina podendo ser utilizado no controle de bactérias contaminantes, em testes realizados em laboratório (BREGAGNOLI, 2006).

Em um estudo realizado por Grange & Davey, 1990 *apud* Bregagnoli, (2006) com o extrato etanólico da amostra de própolis originária da França foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana “in vitro” contra algumas linhagens de bactérias gram positivas e gram negativas. O extrato inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*. Houve inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não houve efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*. As propriedades antimicrobianas e os efeitos benéficos da própolis foram atribuídos à presença de flavonóides em sua composição.

Conforme o estudo realizado por VARGAS *et al*, (2004) o extrato de própolis demonstrou atividade antibacteriana por inibir o crescimento de 67,7% das bactérias testadas dentre elas *Nocardia asteroides* demonstraram-se sensíveis ao extrato, seguido do *Staphylococcus sp.* (97,83%), *Streptococcus sp.* (80,95%) e *Rhodococcus equi* (80%). As bactérias Gram positivas demonstraram percentual de sensibilidade bem mais elevado quando comparadas às Gram negativas, sendo o maior percentual de sensibilidade apresentado pela *Pseudomonas aeruginosa* (72,41%), seguido da (33,3%) de sensibilidade para *Proteus mirabilis*, (2,5%) para *Escherichia coli* e para *Salmonella sp*(22,72%).

Nas analise realizadas por Bregagnoli, 2006 a própolis mostrou inibição de 100% para isolados de *Staphylococcus aureus*, *Prototheca zopfii*, *Corynebacterium bovis*, *Rhodococcus equi* e *Enterobacter aerogenes*. Para os demais gêneros, os pesquisadores encontraram sensibilidade de 91% para *Escherichia coli*, 90% para *Streptococcus agalactiae*, 87,50% para *Klebsiella pneumoniae*, 85,70% para *Pseudomonas aeruginosa* e 81,30% para *Salmonella sp.*. Até o presente,; 92,6% dos isolados Gram positivos e 42,5% dos Gram negativos foram sensíveis ao extrato. O extrato alcóolico de própolis a 50% avaliado foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados.

Na avaliação da ação bactericida dos extratos de própolis em comparação a um antimicrobiano sintético Viergas, 2011 utilizou linhagens comerciais de *S. cerevisiae* e isoladas bactérias *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus fermentum*. Apesar do antimicrobiano comercial apresentar uma maior eficiência na redução da contaminação, o extrato de própolis tem potencial

significativo para ser utilizado no controle dos contaminantes bacterianos presentes nas fermentações etanólicas.

Tanto nos estudos realizados por Vargas et al, 2004, Bregagnoli, 2006 e por Viegas, 2011 o extrato da própolis demonstrou se eficaz contra bactérias gram positivas não sendo tão eficaz contra bactérias gram negativas. Segundo Caetano, 2010 esse fato deve-se a composição química complexa da parede celular dessas bactérias, que possui um maior teor lipídico que as gram positivas.

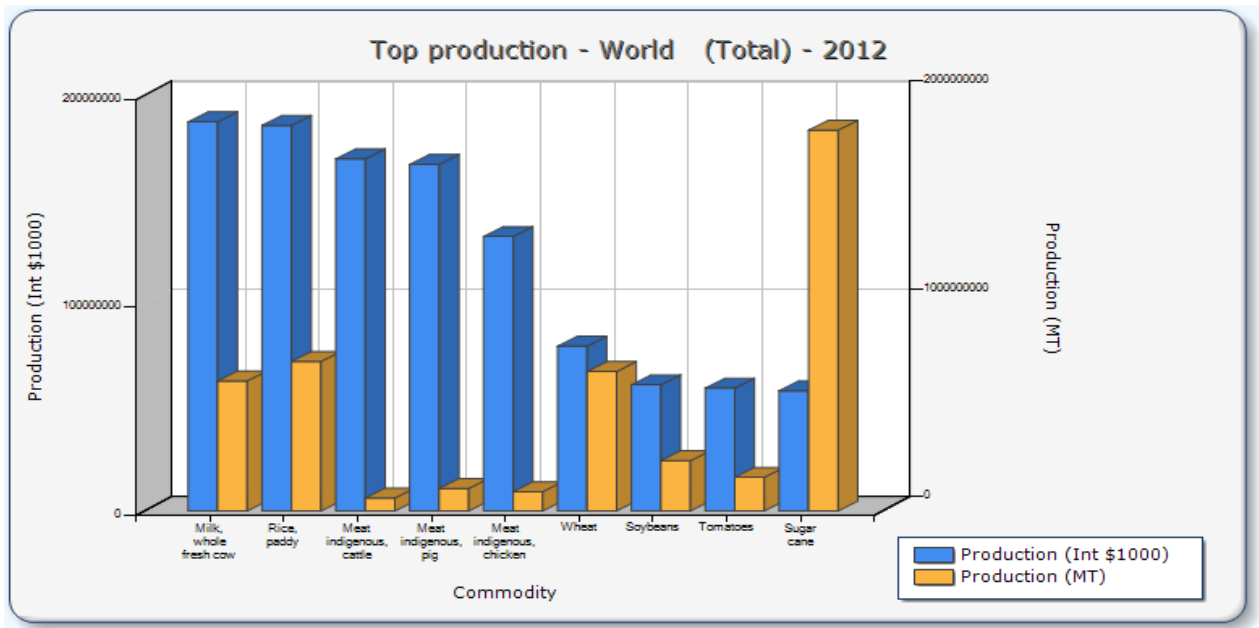
2.6.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus Linneus*) uma flor da família das Canabidáceas que entra na composição das cervejas, conferindo a ela o amargor residual. Embora seja da mesma família da maconha a planta não apresenta o efeito entorpecente, permitindo o amargor da cerveja, além de contribuir no aroma da bebida. O lúpulo possui antioxidantes naturais potentes, além de apresentar alguns componentes de efeito bactericida. Na produção de cerveja o lúpulo é um dos três fatores que tornam um ambiente hostil à presença de bactérias causadoras de doenças, os outros dois são álcool e o gás carbônico (NOGUEIRA, 2004).

O cultivo de lúpulo teve início no século IX, entre os anos de 859 e 875, na Alemanha, de onde se estendeu para outras regiões da Europa e do mundo. No ano de 2012 como mostra o gráfico 1, Alemanha, Estados Unidos e Etiópia foram os principais produtores de lúpulo do mundo, responsáveis por aproximadamente 75% da produção mundial (FAOSTAT, 2012).

Depois de colhido, o lúpulo é secado artificialmente para reduzir sua porcentagem de água em sua massa. Por ter origem lipofílica uma grande quantidade de solventes tais como alcoóis, clorofórmio, acetona e hexano, são aplicados para obtenção do extrato de lúpulo, tendo a possibilidade de deixar resíduos químicos provenientes desses solventes, fato esse que levou a substituição desses solventes orgânicos pela extração por dióxido de carbono líquido ou supercrítico (ZANOLI *et al.*, 2008 *apud* LEITE, 2011).

Gráfico 1: Produção mundial de lúpulo no ano de 2012



Fonte: (FAOSTAT, 2012).

Os compostos ativos de aroma de lúpulo estão presentes nas glândulas das flores fêmeas da planta e estas geralmente apresentam de 4 a 5 cm de comprimento. O lúpulo constitui-se de óleos essenciais (0,2 -3%), β -ácidos, também chamados lupulonas (1,5-9,5%) e de α -ácidos (2,0-16,0%) também chamados humulomas. As proporções de cada composto dependem da variedade da planta (SILVA; FARIA, 2008).

O extrato do lúpulo atua principalmente sobre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, limitando seus metabolismos e melhorando as condições fermentativas para as leveduras. Isso proporciona melhores condições para o crescimento das leveduras que irão fermentar mais rapidamente o mosto e com maior produção de etanol (PRADO, 2014).

Em 2007, o extrato de lúpulo 45% foi difundido pelo setor sucroenergético brasileiro. O uso desse extrato no controle da contaminação bacteriana mostrou vantagens, como redução no gasto com ácido sulfúrico no tratamento do levedo e aumentou o rendimento do etanol. Contando com a vantagem de ser um produto natural que as empresas produtoras de leveduras seca pode aderir ao uso, pois não deixa residual químico em alimento. O custo desse produto para as usinas é semelhante aos antibióticos (CAETANO, 2010).

Os α -ácidos são isomerizados através de calor produzindo os iso- α -ácidos, que são constituídos principalmente por isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona. Em vários trabalhos, os iso- α -ácidos têm sido relacionados com a intensidade do amargor em cervejas. Estes são considerados

mais amargos que os ácidos originais não isomerizados, sendo responsáveis por mais de 70% do amargor detectado sensorialmente em cerveja (SIVIA; FARIA, 2008). Os ácidos do lúpulo interferem no transporte de metabólitos na membrana celular e modificam o pH intracelular o que provoca a morte das bactérias por meio de insuficiência nutricional. Sua ação mais eficiente em bactérias Gram-positivas (SIVIA; FARIA, 2008). Em outro contexto, o lúpulo é utilizado com objetivos medicinais, como no tratamento de distúrbios do sono e problemas estomacais, podendo também ser utilizado como sedativo, bactericida e fungicida (ZANOLI; ZAVATTI, 2008 *apud* LEITE, 2011).

2.6.2.2.1 β - lúpulo

Os β -ácidos possuem ação bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular alterando o pH intracelular. A pronunciada ação bacteriostática sobre bactérias gram-positivas parece estar relacionada à interferência do grupo prenil, presentes nas cadeias laterais dos β -ácidos, sobre a membrana plasmática das células, inibindo fortemente o seu crescimento (SILVIA; FARIA, 2008, *apud* CAETANO, 2010).

Figura 2: Flores do Beta-ácidos do lúpulo



Fonte: (REVISTA ALCOOBRAS, 2007).

Segundo dados da Revista Alcoobras (2007), o ácido beta é extraído com gás carbônico supercrítico que mantém suas propriedades naturais. É dissolvido em propilenoglicol de grau

alimentício. As pesquisas também revelaram que a atividade contra bactérias Gram-negativas é insignificante. Outra descoberta indica que o produto não produz nenhum efeito maléfico na levedura. A Figura 2 mostra a flores do beta-ácidos do lúpulo.

A Fermentec, empresa brasileira que presta assistência e consultorias em fermentações alcoólicas, realizou alguns testes com o produto natural, BETABIO 45, fabricado pela empresa HOPSTEINER, originário do lúpulo, contendo aproximadamente 45% de β -ácidos (Colupulona, Lupulona, Adlupulona), no controle da contaminação bacteriana de fermentação alcoólica em escala industrial. Com uma dosagem de 10 ppm (partes por milhão), a redução da população microbiana na primeira rodada foi significativa, pois reduziu a contaminação de níveis de 10^7 para 10^6 , o que representa uma redução acima de 90% (BETABIO, *apud* LEITE, 2011).

Segundo o fabricante do produto testado pela Fermentec, os beta ácidos (Colupulona, Lupulona, Adlupulona) são os principais compostos bactericidas encontrados no lúpulo. Menos de 2 ppm do produto para inibir o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas em testes de laboratório. O mesmo produto pode inibir também o crescimento de algumas algas se dosado em concentrações próximas a 20 ppm (HOPSTEINER, *apud* LEITE, 2011).

De acordo com estudos realizados por LOPES; SILVA, (2011), OLIVEIRA, [S.D.], PRADO, (2014) o uso do extrato de lúpulo tem mostrado que o beta ácido possui propriedades antimicrobianas e são particularmente ativos contra bactérias gram-positivas se mostrando eficiente na inibição do crescimento dos micro-organismos, obtendo maior eficiência em *Lactobacillus*, usualmente a de maior ocorrência na contaminação de processos fermentativos.

Pela análise dos resultados mostrados em LOPES; SILVA (2011) observa-se que os antimicrobianos a base de lúpulo se igualaram ou superaram aos antibióticos convencionais pois os antimicrobianos a base de beta-ácidos apresentou eficácia mesmo sendo utilizados uma dosagem menor do que a recomendada pelo fabricante.

3 Agradecimentos

Agradeço,

À Deus, pois sem a presença e o auxílio divino minha vida não teria o mesmo sentido. Nada seria possível.

Aqueles que estiveram do meu lado desde os primeiros dias de vida - meus pais José Roberto e Aparecida, meu irmão Márcio pelos ensinamentos, incentivo e principalmente pelo carinho e amor recebidos diariamente.

À Bianca Mello, Maria Rita e João Ricardo pela conquista de uma amizade sincera durante os anos de graduação.

À Prof^a. Dra. Mariana Carina Frigieri Salaro, pelo tempo que se disponibilizou na construção deste trabalho, pela sua preciosa ajuda, pela honra de tê-la como orientadora.

À Prof^a. Dra. Eliana Macedo Lemos que me abriu a porta de estágio juntamente com a Bianca M. Silveira.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Tecnologia “Nilo Stéfani” de Jaboticabal (FATEC – JB) pela convivência e pelo conhecimento adquiridos ao decorrer dos anos.

Referências

ALCARDE, A.R.; HORRI, J.; NOBREL, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v27,n.1,p.20-25,jan./mar.2007.

BADIN, F. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

BETABIO, In: LEITE, I. R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Engenharia Química, Uberlândia, 2011.

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

CAETANO, A. C.G.; Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: FATEC-Jb**, Jaboticabal, v.2,n.1,p.27-37, 2010.

CAPELLETI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 31f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARDOZO, R.M.D.; MARTINS, J.F.P.; FRANÇA JUNIOR, A. **Microbiota láctica no processamento de cachaça**. In: JORNADA NACIONAL DA AGROINDUSTRIA, 3., 2008, Bananeiras. Anais.Bananeiras, 2008. p. 1-2: In: CAETANO, A. C.G.; Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais.Ciência e Tecnologia: FATEC-Jb, Jaboticabal, v.2,n.1,p.27-37, 2011.

CAVALCANTI, G.A.A. A dinâmica econômica do proálcool: acumulação e crise 1975 -1989. **Revista Brasileira de Energia**, v.2, n.1, 2007. Disponível em: <www.sbpe.org.br>. Acesso em: 23 nov. 2013

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 124f. 2003. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CLIVONEI, R. O Desafiador cenário canavieiro. O volume total de cana-de-açúcar processada ao final da safra 2012/13 foi de 535,7 milhões de toneladas. Patamar superior ao que os especialistas previam no início do ciclo. A produção tende a ser maior ainda na temporada 2013/2014. **Revista Panorama Rural**. Disponível em: <http://www.panoramarural.com.br/popimprime.aspx?id=2894> Acesso em: 14 mar. 2014.

CONAMA. **A Produção brasileira de etanol**, 2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/item_6.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2014.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B.; **Mechanisms of action of disinfectants**.In: CAPELLETI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 31f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

EGUCHI, S.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, n.22, p. 35-39, 2007. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/sumario_22.html> . Acesso em: 15 nov. 2012.

FAOSTAT, Food and agriculture organization of the United Nations. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: 24 mar. 2014.

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI,V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis Mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 54, p. 243-250, 2004.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. In: CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação**

bacteriana na fermentação alcoólica. 124f. 2003. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GALLO, C.R.;CANHOS, V.P. **Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica** – revisão In: CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 124f. 2003. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003..

HOPSTEINER, In: LEITE, I. R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista.**2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Engenharia Química, Uberlândia, 2011.

LEITE, I. R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista.**2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Engenharia Química, Uberlândia, 2011.

LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial:** In: BREGAGNOLI, F.C.R **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica.** 2006. 80 f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

LOPES, M. B.; SILVA, T. M. B. Teste de sensibilidade in vitro aos antibióticos do processo de fermentação de uma usina sucroalcooleira no interior do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.4, n.3, p.445-465, set/dez. 2011. Disponível em: < <http://www.cesumar.br/pesquisa/periodicos/index.php/rama/article/download/1774/1296>>. Acesso em: 08 mai. 2014.

MILANEZ, A.Y.; FAVERET FILHO, P.S.C.; ROSA. S.E.S. Perspectivas para o Etanol Brasileiro. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n 27, p 21 – 38, mar.2008. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2702.pdf> Acesso em: 12 março 2014.

NOGUEIRA, M.O que é lúpulo. **Revista Superinteressante**. N.197, fev. 2004. Disponível em: <http://super.abril.com.br/superarquivo/2004/conteudo_313532.shtml>. Acesso em: 29 mar. 2014.

OLIVEIRA, M.A.S.; **Avaliação do poder biocida de beta-ácidos do lúpulo como controladores da contaminação na fermentação alcoólica.** Lorena: Escola de Engenharia de Lorena/USP, [s.d]. Disponível em:<<https://uspdigital.usp.br/siicusp/3993.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2012.

PRADO, J. L. **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de Lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica.** 2014. 55f. Dissertação (Mestrado)

– Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

REVISTA ALCOOBRAS: **Inimigo natural**. São Paulo: Valet, n. 110, maio 2007. Disponível em: < http://www.revistaalcoobras.com.br/edicoes/ed_110/mc_2.html>. Acesso em: 08 mai. 2014.

REVISTA FOOD INGREDIENTS BRASIL: Agentes antimicrobianos. São Paulo: Insumos, v.15, set/out/Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SILVA, G.K.C.. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para a obtenção do etanol**. 2010. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010. Disponível em: <<http://www.fatecaraçatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2013.

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

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. **Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais**. In: CAETANO, A. C.G.; Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia: FATEC-Jb**, Jaboticabal, v.2,n.1,p.27-37, 2011.

UNICA, **Acompanhamento quinzenal: Posição até 16/02/2014**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/arquivos/pdfs/2014/02/4d8cf000be38bad7587c5191ed849ae1.pdf>> Acesso em: 14 mar. 2014.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, jan/fev. 2004.

VIEGAS, E.K.D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WARD, O.P.. **Biotecnologia de La fermentaction: principios, procesos y productos**. In: SILVA, G.K.C.. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para a obtenção do etanol**. 2010. 50 f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Centro de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, 2010. Disponível em: <<http://www.fatecaraçatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO%2017701020001.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2013.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. **Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus Lupulus*, L.** 2008. In: LEITE, I. R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista.** 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Engenharia Química, Uberlândia, 2011.