

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE - PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE

EXTRATO DE LÚPULO NO CONTROLE BACTERIANO EM
USINAS DE ETANOL

Autor: Márcio André Gomes
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde – GO

Abril – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE - PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE

EXTRATO DE LÚPULO NO CONTROLE BACTERIANO EM
USINAS DE ETANOL

Autor: Márcio André Gomes
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde – Área de concentração Eficiência Energética e Sustentabilidade.

Rio Verde – GO

Abril – 2020

Ficha Catalográfica

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA APLICADA E SUSTENTABILIDADE**

**EXTRATO DE LÚPULO NO CONTROLE BACTERIANO
EM USINAS DE ETANOL**

Autor: Márcio André Gomes
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade – Área de
concentração em Eficiência Energética e Sustentabilidade

APROVADA em ____ de _____ de 2020

Prof. Dr. Édio Damásio da Silva Júnior
(Avaliador)

Prof. Dr. Rodrigo Braghioli
(Avaliador)

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir a realização deste sonho e por ter colocado pessoas especiais que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, pela oportunidade de realização do Mestrado. Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Frederico de Souza Castro, pelo “sim” a minha orientação, pela paciência, pois foram muitos os prazos descumpridos e acima de tudo, pelo comprometimento e disponibilidade que sempre teve para ajudar em minhas demandas. Agradeço ao meu coorientador Doutor Igor Cardoso Pescara pela ajuda e a disponibilidade em me atender.

À banca de qualificação, composta pelos professores Dr. Édio Damásio da Silva Júnior e Dr. Rodrigo Braghiroli.

Aos colegas João Paulo Almeida Lélis e Cleymison Queiroz da Trindade, pelo companheirismo e ajuda nos momentos mais difíceis.

Minha gratidão a minha esposa Máisa Mantelli, por suportar as perdas de finais de semana, dias e noites sem atenção, os desabafos acima de tudo, pelas palavras de encorajamento e pela ajuda durante estudos e trabalhos realizados durante o mestrado.

Agradeço a minha irmã Márcia Andrea Gomes, por tirar todas as minhas dúvidas nos momentos que precisei.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Sou Márcio André Gomes, tenho 39 anos. Filho de Cícero Gomes e de Ednilza Maria Gomes. A minha graduação foi em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em 2006. Conclui MBA em Gestão de Pessoas pela UNOPAR (Universidade Norte do Paraná) em 2016 e Pós-Graduação em Engenharia de Segurança pela UCAM (Universidade Cândido Mendes) em 2017. Em março de 2018, iniciei o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Aplicada e Sustentabilidade, no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde - GO, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, com previsão de conclusão em abril de 2020. Trabalho na área de agronegócios, no setor sucroalcooleiro como Gestor da Produção de Etanol.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Fermentação alcoólica	11
1.1.2 Leveduras.....	13
1.1.3 Bactérias e formas de contaminação.....	15
1.2 Controle da contaminação	19
1.2.1 Lúpulo.....	20
1.3 Referências	20
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. CAPÍTULO I	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	26
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1 Teste de sensibilidade.....	32
3.2.2 Método de contagem de bactérias.....	34
3.2.3 Cálculo da taxa de redução populacional (TRP)	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
3.4 CONCLUSÕES	38
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 1: Eficiência (%) de redução de bactérias em teste laboratorial variando a dosagem de lúpulo.....	Erro! Indicador não definido.	35
Tabela 2: Análise de variância – escala laboratorial.....		35
Tabela 3: Teste de agrupamento de médias.....		36
Tabela 4: População de bactérias antes e após a dosagem de lúpulo em escala industrial-		36
Tabela 5: Análise de variância – escala laboratorial.....		37
Tabela 6: Uso de lúpulo e antibiótico na safra 2018 e 2019.....		37
Tabela 7: Dosagem de lúpulo e antibiótico, valor em R\$/safra.....		38

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fermentação Alcoólica

Figura 1: Fluxograma geral da produção de etanol e açúcar. 3512

Figura 2: Fluxograma da produção de etanol.....12

3. CAPÍTULO 1

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1: Ponto de coleta da amostragem (dorna 5A e 5B) e dosagem do lúpulo (Cuba 2)
.....31

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

°C	Graus célsius	Degrees Celsius
g	Grama	Grass
mg	Miligramma	Milligram
mL	Mililitro	Milliliter
CO ₂	Gás Carbônico	Carbon dioxide
nm	Nanômetro	Nanometer
pH	Potencial Hidrogeniônico	Hydrogen potential
UFC	Unidade formadora de colônias	Colony forming unit
L	Litro	Liter
UI	Unidades Internacionais	International Units
cm	Centímetro	Centimeter
m ³	Metro cúbico	Cubic meter
h	Hora	Hour
IMC	Concentração Mínima Inibitória	Minimal Inhibitory Concentration
ppm	Parte por milhão	Part per million
%	Porcentagem	Percentage
TRP	Taxa de Redução Populacional	Population Reduction Rate
Δ	Diferença	Difference

RESUMO

GOMES, MÁRCIO ANDRÉ. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, abril de 2020. Controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica com aplicação de antimicrobiano derivado do lúpulo. Orientador Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro.

A produção de etanol no Brasil é feita por via fermentativa, podendo ocorrer a competição entre os microrganismos de processo (leveduras) com os contaminantes da fermentação alcoólica (bactérias) que utilizam o substrato (sacarose) para o seu metabolismo. As bactérias produzem substâncias indesejáveis, como ácidos orgânicos, sendo que o principal deles é o ácido lático, grupo mais importante no processo fermentativo, pelo fato de desviar a transformação de etanol em outras substâncias não desejáveis. Em virtude dos prejuízos que as bactérias causam no processo fermentativo, é necessária a utilização de antibióticos ou antimicrobianos para o seu controle. Os antibióticos, geralmente mais utilizados, causam resistência microbiana e deixam resíduos no fermento após a sua secagem, que é utilizado como matéria-prima no preparo de rações para animais ou ingrediente de alimentos para humanos. Para atender as inúmeras exigências do mercado, em alguns países não é admissível utilizar leveduras para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresentem resíduos de antibióticos, as usinas sucroalcooleiras iniciaram a eliminação do uso dos antibióticos convencionais em seu processo fermentativo. Por isso, é cada vez mais frequente o uso de antimicrobianos naturais que não causam resistência de bactérias e não deixam resíduos. Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência do antimicrobiano derivado do lúpulo em diferentes dosagens no controle de populações de bactérias durante o processo fermentativo de produção industrial de etanol. Concluiu-se que o antimicrobiano à base de lúpulo (LactoStab) possui eficiência na redução de bactérias em várias dosagens, porém em virtude do alto valor agregado do lúpulo a dosagem de 20 ppm é satisfatória no resultado da redução da população bacteriana.

Palavras-chave: Leveduras; Bactérias; Extrato de Lúpulo; Contaminantes.

ABSTRACT

GOMES, MÁRCIO ANDRÉ. Federal Goiano Institute - Rio Verde Campus - GO, April, 2020. Control of bacterial contamination in alcoholic fermentation with hop antimicrobial application. Advisor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro.

The ethanol production in Brazil is made by fermentation, and competition between the microorganisms of process (yeasts) and the alcoholic fermentation contaminants (bacteria) that use the substrate (sucrose) for its metabolism can occur. Bacteria produce undesirable substances, such as organic acids, the main one being lactic acid, which is the most important group in the fermentation process, by diverting the transformation of ethanol into other undesirable substances. Due to the damage caused by the bacteria in the fermentation process, the use of antibiotics or antimicrobials is necessary to their control. Antibiotics, most commonly used, cause microbial resistance and leave residues in the yeast after drying, which is used as feedstock in the preparation of animal feed or food ingredient for humans. To meet the numerous market requirements, in some countries it is not acceptable to use yeasts for animal feed or even human food that present antibiotic residues, the sugar and alcohol plants started eliminating the use of conventional antibiotics in their fermentation process. Therefore, the use of natural antimicrobials that do not cause bacterial resistance and leave no residues is becoming more frequent. This work aimed to verify the antimicrobial efficiency derived from hops in different dosages in bacterial populations control during the fermentation process of industrial ethanol production. It was concluded that the antimicrobial based on hops (LactoStab) has efficiency in reducing bacteria in several dosages, however due to the high added value of hops the 20 ppm dosage is satisfactory as a result of the bacterial population reduction.

Keywords: Yeasts; Bacteria; Hops Extract; Contaminants.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de energias renováveis (biocombustíveis) tem grande relevância, sobretudo o etanol. O uso deste biocombustível em grande escala é uma contribuição importante para a redução das emissões de gases de efeito estufa por oferecer uma alternativa renovável ao petróleo. Mas, a sustentabilidade ambiental não se limita à redução das emissões, aos avanços tecnológicos ou ao enquadramento legal da atividade de produção de biocombustíveis. É de grande importância o envolvimento de diversos profissionais num processo transformador pela adoção de melhores práticas socioambientais na produção do etanol da cana-de-açúcar.

O etanol é gerado a partir da fermentação do caldo, melão ou ambos, proveniente de uma fonte renovável e abundante no Brasil, cana-de-açúcar. O caldo de cana e o mosto são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias, pelo elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e temperatura ótima para o desenvolvimento de microrganismos (CHERUBIN, 2003).

A fermentação industrial do etanol é um processo não estéril e microrganismos contaminantes podem levar a diminuição na produtividade industrial e perda econômica significativa, pois utilizam diretamente os açúcares e nutrientes das matérias-primas da fermentação, e inibem o crescimento do fermento. Portanto, é crítico que a contaminação microbiana seja controlada nas etapas de processamento da fermentação. Atualmente, as indústrias de bioetanol usam diferentes antimicrobianos, incluindo antibióticos para controlar os contaminantes nos fermentadores. O surgimento de resistência a antibióticos entre bactérias contaminantes em fermentadores de bioetanol justificam a necessidade de antimicrobianos alternativos a um nível rentável. A implementação de alternativas com antimicrobianos poderiam ter impacto na melhoria da fermentação e aumento do valor da produção industrial de bioetanol. Por exemplo, agentes antimicrobianos podem representar escolhas alternativas baratas e muitos agentes já conhecidos ter eficácia suficiente no espectro amplo para garantir a

limitação da maioria dos contaminantes bacterianos que ocorrem na fermentação de levedura industrial (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2010).

As bactérias produzem substâncias indesejáveis, como ácidos orgânicos, sendo que o principal deles é o ácido láctico, grupo mais importante no processo fermentativo, pelo fato de desviar a transformação de etanol em outras substâncias não desejáveis. Em virtude dos prejuízos que as bactérias causam no processo fermentativo, é necessária a utilização de antibióticos ou antimicrobianos para o controle da infecção bacteriana.

Os antibióticos são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que inibem ou causam a morte de microrganismos específicos apresentando seletividade quanto aos alvos. Como os alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Os antibióticos deixam resíduos no fermento após a sua secagem, e este fermento pode ser utilizado como matéria-prima no preparo de rações para animais ou ingrediente de alimentos para humanos. Por questões de saúde pública, em muitos países, não é admissível usar levedura para ração animal ou até mesmo alimentação humana, que apresente resíduos de antibióticos (TAUBE, 2009), tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

Os antimicrobianos naturais (biocidas) são produtos extraídos da flor de lúpulo e se diferenciam dos antibióticos convencionais em sua função química e modo de ação. Estes antimicrobianos estão sendo empregados com amplo sucesso no controle de microrganismos contaminantes da fermentação, mas os resultados ainda 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. Além disso, a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol é de elevado custo, enquanto o controle exercido pelos antimicrobianos apresentam baixo custo de utilização.

Torna-se clara a necessidade de tornar os antimicrobianos naturais produtos padronizados para o emprego em larga escala na indústria de produção de etanol. Sendo assim, as indústrias produtoras de antimicrobianos naturais, com grau alimentício, estão se desenvolvendo ou adaptando seus produtos, antes utilizados em indústrias cervejeiras, para as indústrias sucroalcooleiras.

O presente estudo tem por finalidade fornecer dados para utilização de antimicrobianos derivados à base de lúpulo no controle da contaminação bacteriana nas fermentações alcoólicas. Discutindo a consequência da utilização dos mesmos, logo as empresas podem vislumbrar um

caminho de competitividade sustentável, sem esgotamento de recursos e mercados, enquanto a sociedade se beneficia da redução dos níveis de contaminação e da mitigação dos efeitos da atividade produtiva que são nocivos à sociedade.

A discussão sobre os impactos da utilização de antimicrobianos derivados do lúpulo para controle da contaminação bacteriana nas fermentações alcoólicas além de aspecto prático muito relevante, reveste-se de importância para o meio acadêmico, para o curso de engenharia química, engenharia de alimentos, engenharia de produção, química e a área de gestão da produção sucroalcooleira. Pesquisas e trabalhos sobre a contaminação bacteriana na fermentação alcoólica são cada vez mais necessários e pertinentes.

1.1 Fermentação alcoólica

No processo de moagem da cana-de-açúcar, têm várias operações unitárias para obtenção de etanol e açúcar, conforme figura 1 abaixo.

O processo de produção passa pelas seguintes etapas: moagem da cana-de-açúcar para a extração do caldo da cana com alto teor de sacarose; tratamento de caldo com objetivo de retirar as impurezas do caldo, em seguida vai para etapa de evaporação, em que o caldo da cana é dividido para produção de açúcar (cristalização) e para produção de etanol. Com a produção de açúcar, tem-se como subproduto o mel final que é usado para se produzir o álcool. O mel final é enviado para fermentação para ser misturado com o caldo da cana, obtendo o mosto fermentado (vinho), com cerca de 12% de etanol em volume.

Esse vinho é colocado em colunas de destilação, e, é separado do etanol, resultando no etanol hidratado. Para se obter o etanol anidro, que é misturado à gasolina, é preciso mais uma etapa de desidratação ou remoção de água.

O etanol pronto é armazenado em tanques de grande capacidade até a comercialização.

O bagaço que é resultado da moagem da cana-de-açúcar, é utilizado para a geração de bioeletricidade, que abastece a própria usina e a torna autossuficiente em relação ao consumo e venda de energia.

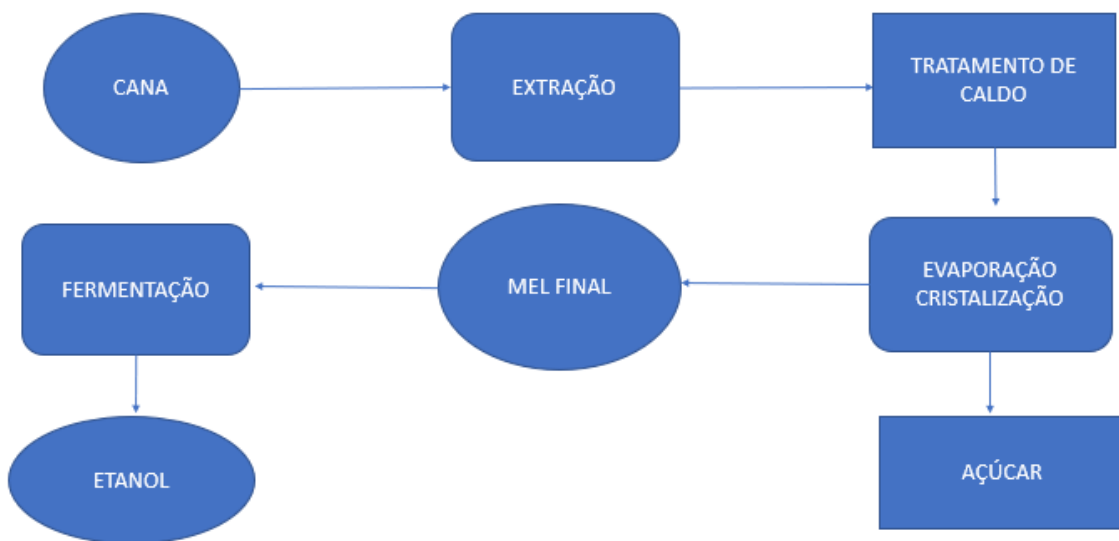


Figura 1. Fluxograma geral da produção de etanol e açúcar

Fonte: próprio autor

Toda produção de álcool ocorre por via fermentativa. A fermentação é um processo catabólico anaeróbico em que há a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de microrganismos (levedura), até a formação de etanol e gás carbônico (CO₂), havendo liberação de energia química e térmica. Conforme demonstrado na figura 2, após a fermentação, ocorre a etapa de centrifugação que tem como objetivo separar a levedura do vinho, que vai para destilação para produção do etanol hidratado e anidro. A levedura vai para as cubas e volta para a fermentação, iniciando novamente o processo. Após a destilação, o etanol é armazenado e posteriormente é realizada a etapa de carregamento em caminhões tanque.

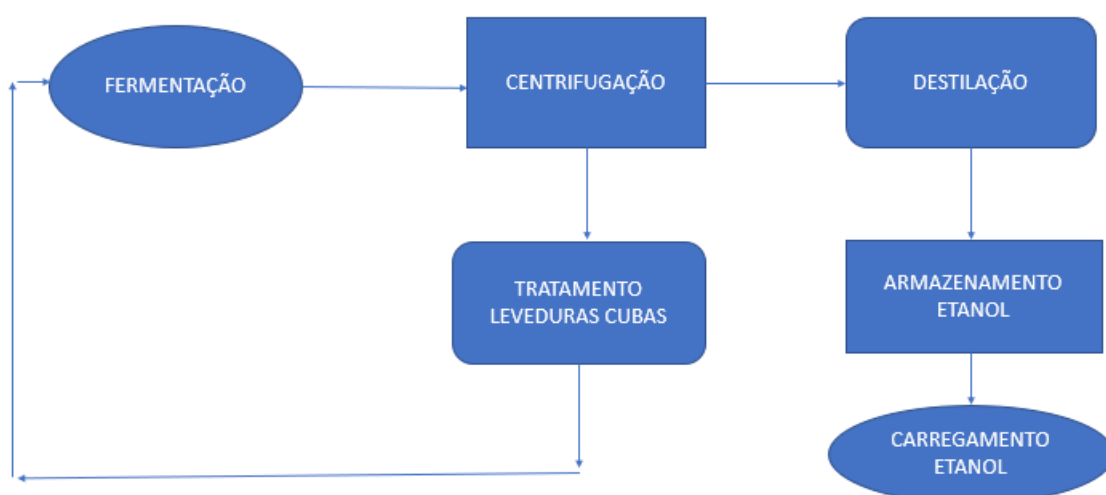


Figura 2. Fluxograma da produção de etanol

Fonte: Próprio autor.

O rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol é afetada por diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH,

oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) (LIMA et al., 2001). A ocorrência de fermentações paralelas reduz o rendimento fermentativo, modificando as características do vinho levedurado (mistura de levedura e etanol) quanto aos teores dos componentes secundários, que neste caso são mais elevados, caracterizando as perdas de açúcares no processo de deterioração microbiana (MUTTON, 2008).

A produtividade do etanol é estimulada quando a porcentagem de oxigênio na alimentação aumenta, pois, a aeração é um importante controle de fator de crescimento e produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. Condições de aeração também têm impacto na formação de subprodutos, como o glicerol, que tem importantes implicações em etapas posteriores do etanol industrial. (ALFENORE et al, 2003).

1.1.2 Leveduras

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

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

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

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

As leveduras, de modo geral, são capazes de sobreviver a condições mais restritas de umidade que as bactérias, porém são mais sensíveis que os bolores quanto à umidade necessária para seu desenvolvimento. Sua faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento é de 25°C a

30°C, seu crescimento é favorecido em meio ácido, multiplicando melhor em aerobiose, pois usam açúcar como fonte de energia (MAHAN; MYERS, 2002).

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa (VENTURINI FILHO; MENDES, 2008). A célula de levedura possui no citoplasma celular um aparato enzimático no qual ocorre a transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂, envolvendo 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica (LIMA, 2001).

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

Embora muitas espécies de leveduras tenham a capacidade para prosperar em ambiente de fermentação, *Dekkera bruxellensis* tem sido alvo e citado como uma das principais leveduras contaminantes na produção de etanol. Embora, amplamente estudado por seus efeitos prejudiciais sobre o vinho levedurado, as interações espécie-espécie entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* ainda são mal entendidas (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

Nos últimos anos, houve aumento de interesse em microorganismos termofílicos principalmente pelo aumento na maioria das taxas de reação, rendimento e resistência do produto à degeneração a temperaturas mais altas. A produção industrial de etanol depende de atividade microbiana, particularmente a de leveduras. Nisso, vantagens de alta temperatura de processo incluem economias de energia obtidas através da redução nos custos de refrigeração ou para evitar paradas frequentes na produção por problemas de superaquecimento, geralmente encontrados em áreas/estações de alta temperatura, ambiente em que resfriamento é indisponível. Duas outras vantagens do processamento em temperaturas mais altas incluem a restrição significativa de chances de contaminação e redução no volume de destilaria de resfriamento de águas residuais efluente. Existem várias vantagens do processo que podem ser exploradas através do uso de microorganismos termofílicos para a produção de etanol: economia de energia através de custos reduzidos de resfriamento, maiores taxas de fermentação, remoção contínua de etanol e contaminação reduzida (BANAT et al., 1998).

A tolerância ao etanol e a temperatura são características importantes para cepas comerciais de levedura. Ambas as características são interativas e geralmente diminuem com o aumento temperatura e concentração de etanol. Uma pesquisa considerável tem sido

direcionada para a investigação de ácidos graxos, composição que muda em resposta a estas tensões e o papel das proteínas de choque térmico nos mecanismos de tolerância. Se as leveduras termotolerantes forem usadas em processos comerciais, a configuração do biorreator terá importante parte na concepção de processos de produção. Várias técnicas de imobilização parecem oferecer um meio de apresentar e manter alta biomassa em reatores anaeróbios contínuos (BANAT et al., 1998).

Os biorreatores têm sido usados para modelar o processo de fermentação, pois permitem o controle do pH e alimentação de substrato, bem como monitoramento contínuo de vários parâmetros de fermentação, mas são caros para operar em termos de custos de equipamento e mão de obra e, não são passíveis de triagem de alto rendimento (KENNETH et al., 2008).

1.1.3 Bactérias e formas de contaminação

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

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

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

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

O fator mais crítico da contaminação bacteriana para as fermentações é a floculação, especialmente nas quais se extrai levedura para secagem. Esse fenômeno ocorre quando há interação entre os lactobacilos e a levedura, potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Estas condições fazem com que as bactérias se aderem nas paredes das leveduras, por

meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (VENTURA, [s.d.]).

Segundo Basso (2007), a floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol leva à decantação das leveduras no fundo das dornas e dificulta a conversão do açúcar em etanol porque, para a máxima conversão de açúcar em etanol e gás carbônico, é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas. Este fenômeno causa perda de células na centrífuga e a obrigatoriedade de reposição celular, trazendo gastos para o processo e proporcionando queda no rendimento alcoólico (LUDWIG; NETO; ANGELIS, 2001).

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

A contaminação bacteriana é uma preocupação significativa para fermentação de levedura industrial pois diminui os níveis disponíveis de carboidratos e nutrientes levando a rendimentos de produtos mais baixos e produção de orgânicos indesejados que juntos podem inibir o crescimento de levedura, e ácido láctico (SABEERA et al, 2018).

Ao contrário do álcool de bebidas, o etanol combustível não é produzido sob condições de cultura puras. Infecções crônicas são esperadas e toleradas, embora eles geralmente sejam acreditados ser deletério para produção de etanol. Contaminantes criam um dreno constante de carbono disponível para conversão ao etanol e competir por fatores de crescimento necessários por levedura. Eles também produzem subprodutos que são inibitórios para levedura, particularmente ácido láctico. As infecções agudas ocorrem de forma imprevisível e pode levar a fermentações "presas", exigindo que instalações sejam fechadas para limpeza, onerando custos. Acredita-se que bactérias do ácido láctico são as principais contaminantes bacterianas de fermentações de etanol combustível. Na primeira pesquisa sobre contaminantes bacterianos de combustível à base de milho para produção de etanol, descobriu-se que instalações tendem a exibir população com perfis característicos durante o período de nove meses. Estes resultados sugeriram ocorrência de infecções endêmicas persistentes típicas de biofilmes. Consequentemente, testou-se a capacidade desses contaminantes para formar biofilmes em condições de laboratório. Na produção comercial de etanol combustível em instalações foram previamente mostrados que as populações características de contaminantes bacterianos

reduzem o rendimento do produto e são difíceis de erradicar. (NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2006).

Fermentações contínuas apresentam inúmeras vantagens sobre processos em batelada para produção industrial por microrganismos. Estes incluem maior produtividade, menor tempo de inatividade do reator, mais fácil controle de processo, menores flutuações na qualidade do produto e redução dos custos energéticos. Além de suas vantagens tecnológicas, sistemas de cultura contínua, especialmente quimiostatos, oferecem ambiente estável e controlado para as células através da manutenção biomassa constante e concentrações de nutrientes e produtos (CLEMENT et al, 2011).

Muitas vantagens são ditas para acumular no uso de cultura contínua, incluindo maiores rendimentos de etanol, uso mais eficiente do substrato, e maiores produtividades do etanol. A principal desvantagem de fermentações de cultura contínua é o risco contínuo de infecções bacterianas ou contaminações de leveduras selvagens que levam a paradas não planejadas e perdas de rendimento. Na indústria de álcool combustível, o *Lactobacillus* é o mais comum encontrado contaminante bacteriano com sérias consequências para a produção. Bactérias que crescem mais rápido (álcool e tolerantes ao pH) ou fermento selvagem podem superar rapidamente o fermento da cultura e produzir rapidamente produtos finais indesejáveis. Os efeitos inibitórios no crescimento de leveduras de um número de produtos de fermentação foram avaliados em lotes e fermentações contínuas de cultura. Neste trabalho, *Lactobacillus paracasei* foi introduzido como contaminante em fermentação contínua de etanol em vários estágios e proporções com *Saccharomyces cerevisiae*, mas não conseguiu ultrapassar a levedura. Nenhuma das razões de inoculação permitiram que *L. paracasei* afetasse *S. Cerevisiae* e ambos os organismos persistiram no sistema multiestágios e confirma que, na produção contínua de etanol combustível, seria difícil eliminar essa bactéria. Somente quando o pH foi controlado em 6,0 foram observadas mudanças que afetariam o sistema multiestágio. (BAYROCK; INGLEDEW, 2001)

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

Diversos estudos são realizados para determinar a influência dos ácidos acético e láctico quanto à inibição do crescimento e a queda da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ao utilizar cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica,

observa-se que, ocorre queda no rendimento alcoólico significativamente ao obter contaminação bacteriana acima de 10^6 ou 10^7 células/mL no mosto (ALCARDE et al., 2007).

Os gêneros de microrganismos comumente encontrados no caldo no processo de fermentação, são: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Leuconostoc*. Todos esses microrganismos produzem quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos (butírico, acético, fórmico, láctico) (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Diversos autores verificaram influência dos ácidos acético e láctico na inibição do crescimento e na queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a 10^6 ou 10^7 células/mL de mosto, pode ocorrer significativa queda no rendimento alcoólico (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007).

O gênero *Leuconostoc* (bactérias produtoras do ácido láctico) tem papel importante como contaminante na produção do açúcar e do álcool, utilizando o açúcar do caldo para a produção de goma. *Klebsiella* e *Acetobacter* são outros microrganismos que formam goma, e são habitantes das linhas de condução de caldo na usina. Em extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo, os resultados obtidos revelaram que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo gram-positivo. O gênero *Lactobacillus* foi o mais frequente entre eles (59,75%) (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

As bactérias do ácido láctico, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, são contaminantes comuns da fermentação alcoólica de levedura e são frequentemente associadas a problemas de processo. O etanol combustível no Brasil é atualmente produzido por processo de fermentação contínua de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae* com reciclagem celular. Contaminantes microbianos também são reciclados com levedura e isso pode causar muitos problemas de competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato. *Lactobacillus* é adaptado as condições do processo alcoólico e nutricional, mas o *Leuconostoc* é mais sensível ao álcool e geralmente não persiste por longo período em fermentação alcoólica. Além da produção de ácido, o *Lactobacillus* causa sérios problemas de floculação de levedura na fermentação alcoólica. O antagonismo entre *Lactobacillus* e *Saccharomyces cerevisiae* é por causa dos ácidos orgânicos produzidos pelas células bacterianas. O ácido láctico pode inibir fortemente o metabolismo da levedura e diminuir o rendimento alcoólico. Fermentação alcoólica e viabilidade de levedura são fortemente reduzidas por *L. fermentum*, após alguns ciclos em um processo de lote alimentado com célula recicla, se um método de controle bacteriano é omitido. Os antibióticos e antimicrobianos são frequentemente utilizados para controle de contaminantes

bacterianos, porém os Biocidas podem afetar a levedura em concentração (NETO; YOKOYA, 2001).

Alguns estudos realizados mostraram que o ácido se mostrou muito eficiente na inibição do crescimento da bactéria gram-positiva *Lactobacillus*. O perfil de crescimento do *Bacillus*, bactéria classificada como gram-positiva, manteve-se inconstante, observando ligeiras variações conforme as diferentes concentrações de ácido. Concluiu-se que a concentração mínima inibitória (IMC) se encontra na faixa de 3 a 5mg/L de biocida, sendo o crescimento celular interrompido nesta faixa. O ácido também se mostrou eficiente nos experimentos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que não apresentou alteração no crescimento, visto que a inibição não seria conveniente ao processo fermentativo (OLIVEIRA, [s.d.]).

Lactobacillus sp. geralmente são predominantes e bem adaptados para sobrevivência sob alta concentração de etanol, baixo pH e baixas condições de oxigênio encontrado durante a fermentação. Os lactobacilos causam inibição de *Saccharomyces sp.* e limitam a produção de etanol através de dois métodos básicos: produção de ácido láctico e acético ou através de competição por nutrientes. No entanto, vários pesquisadores demonstraram que esses mecanismos podem não explicar completamente a quantidade de perda observada e sugeriram outros meios pelos quais as bactérias podem inibir crescimento de leveduras e produção de etanol. As fermentações de etanol são projetadas para serem realizadas na presença de contaminações microbianas crônicas e é até mesmo esperado que essas infecções ocorram. Enquanto as bactérias do ácido láctico são as principais contaminantes preocupante nas fermentações industriais de etanol, a levedura selvagem também pode afetar a produtividade destas fermentações (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

1.2 Controle da contaminação

Antissépticos e antibióticos podem ser utilizados para controlar o problema das contaminações, eles atuam de forma diferente, agindo sobre um ou mais grupos de microrganismos. Porém, existe a possibilidade de deixarem resíduos nos destilados. O pentaclorofenol foi usado durante alguns anos nas proporções de 0,01 a 0,05g/L de mosto, com bons resultados, porém seu uso é hoje proibido. O hexaclorofenol em dose de 4mg/L de mosto, segundo pesquisas, contribui para boas fermentações. São citados na literatura também sulfato de cobre e colofônia, embora o mais utilizado na indústria seja o ácido sulfúrico que se adiciona

nos mostos em fermentações para produção de álcool. Os antibióticos cloranfenicol e tetraciclina também são empregados, embora a penicilina seja economicamente mais vantajosa com o emprego de 500 a 1000UI (Unidades Internacionais) por litro de mosto (BREGAGNOLI, 2006).

O uso excessivo de antibióticos para controle da contaminação bacteriana levou a criação de bactérias multirresistentes. Com a resistência generalizada a antibióticos no processo de fermentação, a implementação de métodos alternativos de controle de contaminação e desenvolvimento de novos antimicrobianos inibitórios estão se tornando essenciais (SABEERA et al, 2018).

O uso de produtos proibidos em alimentação animal ou que contenham coadjuvantes inertes prejudiciais à levedura é frequente. Essa classe de produtos tem sido alvo de monitoramento e regulamentação em levedura seca por parte das autoridades regulatórias dos países compradores desse material, em função da detecção de residual de antibióticos acima do esperado em lotes exportados (VENTURA, [s.d.]). Além disso, o problema da resistência microbiana é crescente, e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

Os biocidas são produtos utilizados na desinfecção do mosto, tanques e equipamentos utilizados na fermentação. Vários desses, atendem as exigências de agências alimentícias de alguns países, embora alguns não sejam regulamentados para uso em alimentos por não atingirem padrões sanitários mínimos (VENTURA, [s.d.]).

1.2.1 Lúpulo

O lúpulo é uma inflorescência da família das Canabidáceas e não possui efeito entorpecente. Os seus compostos ativos estão presentes nas glândulas das flores femininas da planta, e essas geralmente apresentam de 4 a 5cm de comprimento. O lúpulo se constitui de óleos essenciais (0,2-3%), ácidos, também chamados lupulonas (1,5-9,5%) e de ácidos (2,0-16,0%), também chamados humulonas. As proporções de cada composto dependem da variedade da planta (SILVA; FARIA, 2008).

O lúpulo entra na composição das cervejas e serve para dar amargor, além de contribuir no aroma da bebida. Essa substância possui antioxidantes naturais potentes, além de apresentar alguns componentes de efeito bactericida. O lúpulo é um dos três fatores que tornam

a cerveja um ambiente hostil para a presença de bactérias causadoras de doenças, os outros são o álcool e o gás carbônico (NOGUEIRA, 2004).

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

O extrato de lúpulo ácido 45% foi lançado no setor sucroenergético brasileiro em 2007; o produto foi anteriormente testado em laboratório, com diversas dosagens, pela empresa Fermentec, procedente de Piracicaba-SP.

O fabricante ressalta que os produtos são derivados de fontes naturais, possuem grau alimentar, são seguros e de fácil aplicação (líquido), além de possuírem o Certificado Kosher (exigência de alguns países de cultura ortodoxa judaica) (CONTROLE, 2009).

Além do controle bacteriano, o lúpulo apresenta outras vantagens, como a redução do gasto de ácido sulfúrico no tratamento do levedo e incremento no rendimento de etanol. Por ser produto natural, sua utilização tem se mostrado crescente nas usinas que secam levedura comercializada como ração animal. Este produto se assemelha as antibióticos com relação aos custos para a usina (CONTROLE, 2009).

Controlar a infecção bacteriana e suas consequências no processo de obtenção de etanol é necessário ainda estudos para soluções práticas e viáveis que atenuem ou eliminem a contaminação e conseqüentemente a floculação do fermento nas destilarias, reduzindo assim o custo do etanol (LUDWIG; NETO; ANGELIS, 2001).

Ainda não há métodos totalmente eficazes no controle industrial para caracterização e monitoramento destes agentes, mesmo com todos os danos gerados (ROSE et al., 1995).

1.3 Referências

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

ALFENORE S. et al. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology.** Institut National des Sciences Appliquees, Departement de Genie Biochimique et Alimentaire, France, 2003.

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

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. In: MULTICIÊNCIA: CONSTRUINDO A HISTÓRIA DOS PRODUTOS NATURAIS, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2006. p.1-16.

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

BANAT I.M. et al. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I: Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Vol 14, 1998.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 1., PROJETO PROGRAMA DE PESQUISA EM POLÍTICAS PÚBLICA, 2007. **Anais**. São Paulo: ESALQ/USP. Disponível em: http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessão_2_Basso.pdf. Acesso em: 02 out. 2018.

BAYROCK, D.; INGLEDEW, W.M. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Department of Applied Microbiology and Food Science, University of Saskatchewan, Canada, 2001.

BECKNER, M.; IVEY, M.L.; PHISTER, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**. Departamento de Alimentos, Bioprocessamento e Ciências da Nutrição, Universidade Estadual da Carolina do Norte, Raleigh, EUA, 2011.

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

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

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

CLEMENT, T. et al. Use of a continuous multistage bioreactor to mimic winemaking fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. INRA, UMR Sciences pour, France, 2011.

CONTROLE natural. 2009. Disponível em: < www.energiamundo.com.br> Acesso em: 28 maio 2018.

EGUCHI, J. Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 2, n. 22, p. 35-39, 2007. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm>. Acesso em: 15 setembro 2018.

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

KENNETH M. et al. Modeling Bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. Wiley InterScience, EUA, 2008.

LIMA, et. al. **Biotecnologia industrial : processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. cap. 1, p. 1-40, v.3.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas , v. 21, n. 1, Jan. 2001.

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

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

MEIRELLES, A. J. A. Expansão da produção de etanol e melhoria tecnológica da produção alcoólica. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE PRODUÇÃO DE ETANOL, 2006. São Paulo: EEL/USP. Disponível em:<http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_4_Antonio_Meirelles.pdf>. Acesso em: 09 set. 2018.

MUTHAIYAN A.; LIMAYEM A.; RICKE C. S. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**. Department of Food Science and Center for Food Safety, Institute of Food Science & Engineering, University of Arkansas, USA, 2010.

MUTTON, M. J. R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica**. In: WORKSHOP SOBRE “PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIAPRIMA”, 2008. Lorena. Anais... Lorena, 2008. p.9-10. Disponível em: < http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position_paper_painel2_marcia.pdf>. Acesso em: 27 maio 2018.

NEMEC K. A. S.; NICHOLS N. N.; LEATHERS, D. T. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production . **Biotechnol Letters**. National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, USDA, Peoria, USA, 2006.

NETO P. DE O.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**. Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP, SP, Brasil, 2001.

NOGUEIRA, M. O que é lúpulo. **Revista Superinteressante**. n.197, fev. 2004. Disponível em: Acesso em: 28 de maio 2018.

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]. Acesso em: 25 maio 2018.

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

SABEERA, H. et al. "Natural antibacterial agents from aridregion pretreated lignocellulosic biomasses and extracts for the control of lactic acid bacteria in yeast fermentation." **AMB Express**, 2018.

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**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.28 n.4, p. 902-906, out./dez. 2008.

TAUBE, J.S. O negócio é ser natural. **Revista Canamix**, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <<http://www.canamix.com.br/revistas>>. Acesso em: 20 maio 2018.

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.

VENTURA, R. **Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica**, [s.d.] Disponível em: <http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra_ventura.pdf>. Acesso em: 25 maio 2018.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. **Fermentação alcoólica de raízes tropicais**. In: **VILA NOVA, M.X. Análise das leveduras do mosto da fermentação alcoólica de alambiques artesanais produtores de cachaça em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

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

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

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência do antimicrobiano derivado do lúpulo em diferentes dosagens no controle de populações de bactérias durante o processo fermentativo da produção industrial de etanol e encontrar a dosagem ideal levando em consideração a eficiência de redução da população bacteriana e a viabilidade financeira.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar população bacteriana antes e após a dosagem do antimicrobiano à base de lúpulo, realizando o cálculo da taxa de redução populacional para ambos.
- b) Evidenciar custo benefício na aplicação/resultados inerentes à utilização do antimicrobiano à base de lúpulo.
- c) Estabelecer um protocolo para o uso adequado do extrato de lúpulo no controle microbiano em usinas de etanol.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Engenharia sanitária e ambiental)

EXTRATO DE LÚPULO NO CONTROLE BACTERIANO EM USINAS DE ETANOL

RESUMO

A produção de etanol no Brasil é feita por via fermentativa, podendo ocorrer a competição entre os microrganismos de processo (leveduras) com os contaminantes da fermentação alcoólica (bactérias). As bactérias produzem substâncias indesejáveis que causam prejuízos no processo fermentativo, por isso é necessária a utilização de antibióticos ou antimicrobianos para o seu controle. Os antibióticos, geralmente mais utilizados, causam resistência microbiana e deixam resíduos no fermento após a sua secagem, o qual é utilizado como matéria-prima no preparo de rações para animais ou ingrediente de alimentos para humanos. Para atender às exigências do mercado, em alguns países não é admissível utilizar leveduras para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresentem resíduos de antibióticos, as usinas sucroalcooleiras iniciaram a eliminação do uso dos antibióticos convencionais em seu processo fermentativo. Por isso, é cada vez mais frequente o uso de antimicrobianos naturais. Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência do lúpulo em diferentes dosagens no controle de bactérias durante o processo fermentativo de produção industrial de etanol. Concluiu-se que o antimicrobiano à base de lúpulo possui eficiência na redução de bactérias em várias dosagens, porém em virtude do alto valor do lúpulo a dosagem de 20 ppm é satisfatória.

Palavras-chave: Leveduras, Bactérias, Contaminantes.

HOP EXTRACT IN BACTERIAL CONTROL IN ETHANOL PLANTS

ABSTRACT

The production of ethanol in Brazil is made by fermentation, and there may be competition between process microorganisms (yeasts) with alcoholic fermentation (bacteria) contaminants. Bacteria produce undesirable substances that cause losses in the fermentation process, so it is necessary to use antibiotics or antimicrobials for their control. Antibiotics, most commonly used, cause microbial resistance and leave residues in the yeast after drying, which is used as a raw material in the preparation of animal feed or food ingredient for humans. To meet market demands, in some countries it is not permissible to use yeast for animal feed or even human

food that contains antibiotics residues, so sugar and alcohol plants started to eliminate the use of conventional antibiotics in their fermentation process. Therefore, the use of natural antimicrobials is more and more frequent. This work aimed to verify the hops efficiency at different dosages in controlling bacteria during the fermentation process of industrial ethanol production. It was concluded that the antimicrobial based on hops has efficiency in reducing bacteria in various dosages, however due to the high value of hops the 20 ppm dosage is satisfactory.

Keywords: Yeasts, Bacteria, Contaminants.

3.1 INTRODUÇÃO

No mundo atual, os países têm buscado fontes de energia limpa por causa da mudança climática. Uma possibilidade de reduzir o lançamento de substâncias poluentes na atmosfera é a utilização de biocombustíveis. Além disso, o aumento no preço do petróleo impulsiona o uso do biocombustível, como opção de energia renovável e menos poluente (BIOBLOG, 2020).

Por isso, o uso de energias renováveis tem grande relevância, sobretudo o etanol. De acordo com dados da União de Indústrias de cana-de-açúcar (UNICA, 2019), a produção nacional de etanol na safra 2019/2020 foi de aproximadamente 35 bilhões de litros, um aumento de 7,49% com relação à safra anterior. O uso deste biocombustível em grande escala é uma contribuição importante aos esforços globais, mas a sustentabilidade ambiental não se limita à redução das emissões, à avanços tecnológicos ou ao enquadramento legal da atividade de produção de biocombustíveis. É de grande importância e ganha cada vez mais espaços o envolvimento de diversos profissionais num processo transformador pela adoção de melhores práticas socioambientais na produção do etanol da cana-de-açúcar.

A principal forma de extração de etanol no Brasil é a partir do processo fermentativo da cana-de-açúcar, tornando o Brasil o maior produtor mundial de cana (NOVA CANA, 2020).

A transformação da matéria-prima em álcool é efetuada por microrganismos, usualmente a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por meio da fermentação alcoólica. O sucesso de um processo fermentativo depende de vários fatores, sendo um deles a forma de condução do processo, para isso é extremamente importante que se inocule no mosto uma quantidade de leveduras capaz de converter os açúcares em álcool e gás carbônico, dentro de determinadas condições. Este conjunto de microrganismos recebe o nome de pé de cuba ou simplesmente fermento (AGEITEC, 2018). A fermentação produz também biomassa celular e outros produtos como o glicerol e ácidos orgânico (RODRIGUES et al., 2018).

Produzido pelas leveduras durante a fermentação, o etanol é um composto amplamente conhecido por suas propriedades antimicrobianas. Nas leveduras, os efeitos tóxicos do etanol,

envolvem queda de viabilidade celular, inibição do crescimento celular e inibição de vários sistemas de transporte (DE LA TORRE-GONZÁLEZ et al., 2016).

O etanol é gerado a partir da fermentação do caldo, melaço ou ambos. O caldo de cana e o mosto são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias, pelo elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e temperatura ótima para o desenvolvimento de microrganismos (CHERUBIN, 2003).

A fermentação industrial do etanol é um processo não estéril e microrganismos contaminantes podem levar a diminuição na produtividade industrial e perda econômica significativa, pois utilizam diretamente os açúcares e nutrientes das matérias-primas da fermentação, e também inibem o crescimento do fermento. As contaminações bacterianas, em níveis acima de 10⁵ células-mL, provocam redução da produção alcoólica e aumento da acidez, levando à diminuição da qualidade do produto final. Assim, considerando a importância do etanol no mercado nacional, conhecer os fatores interferentes da fermentação alcoólica bem como medidas que melhorem a eficiência de sua obtenção deve ser cada vez mais estudados a fim de contribuir para melhorias do processo industrial (GÓES-FAVONI, S. P. et al., 2018).

Portanto, é crítico que a contaminação microbiana seja controlada nas etapas de processamento da fermentação. Atualmente, as indústrias de bioetanol usam diferentes antimicrobianos, incluindo antibióticos para controlar os contaminantes nos fermentadores. O surgimento de resistência a antibióticos entre bactérias contaminantes em fermentadores de bioetanol justificam a necessidade de antimicrobianos alternativos para produção de bioetanol a nível rentável. A implementação de alternativas com antimicrobianos poderiam ter impacto tanto na melhoria da fermentação e aumento do valor da produção industrial de bioetanol. Por exemplo, agentes antimicrobianos podem representar escolhas alternativas baratas e muitos agentes já conhecidos ter eficácia suficiente no espectro amplo para garantir a limitação da maioria dos contaminantes bacterianos que ocorrem na fermentação de levedura industrial (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2010).

As bactérias produzem substâncias indesejáveis, como ácidos orgânicos, sendo que o principal deles é o ácido láctico, grupo mais importante no processo fermentativo, pelo fato de desviar a transformação de etanol em outras substâncias não desejáveis. Em virtude dos prejuízos que as bactérias causam no processo fermentativo, é necessária a utilização de antibióticos ou antimicrobianos para o controle da infecção bacteriana.

Os antibióticos são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que inibem ou causam a morte de microrganismos específicos apresentando seletividade quanto aos alvos. Como os

alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Os antibióticos deixam resíduos no fermento após a sua secagem, e este fermento pode ser utilizado como matéria-prima no preparo de rações para animais ou ingrediente de alimentos para humanos. Por questões de saúde pública, em muitos países, não é admissível usar uma levedura para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresente resíduos de antibióticos (TAUBE, 2009), tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

Os antimicrobianos naturais (biocidas) são produtos extraídos da flor de lúpulo e se diferenciam dos antibióticos convencionais em sua função química e modo de ação. Estes antimicrobianos estão sendo empregados com amplo sucesso no controle de microrganismos contaminantes da fermentação, mas os resultados ainda 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. Além disso, a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol é de elevado custo, enquanto o controle exercido pelos antimicrobianos apresentam baixo custo de utilização.

Torna-se clara a necessidade de tornar os antimicrobianos naturais produtos padronizados para o emprego em larga escala na indústria de produção de etanol. Sendo assim, as indústrias produtoras de antimicrobianos naturais, com grau alimentício, estão se desenvolvendo ou adaptando seus produtos, antes utilizados em indústrias cervejeiras, para as indústrias sucroalcooleiras.

O presente estudo tem por finalidade fornecer dados para utilização de antimicrobianos derivados à base de lúpulo no controle da contaminação bacteriana nas fermentações alcoólicas. Discutindo a consequência da utilização dos mesmos, logo as empresas podem vislumbrar um caminho de competitividade sustentável, sem esgotamento de recursos e mercados, enquanto a sociedade se beneficia da redução dos níveis de contaminação e da mitigação dos efeitos da atividade produtiva que são nocivos.

A discussão sobre os impactos da utilização de antimicrobianos derivados do lúpulo para controle da contaminação bacteriana nas fermentações alcoólicas, além de aspecto prático muito relevante, reveste-se de importância para o meio acadêmico, para o curso de engenharia química, engenharia de alimentos, engenharia de produção, química e a área de gestão da produção sucroalcooleira. Pesquisas e trabalhos sobre a contaminação bacteriana na fermentação alcoólica são cada vez mais necessários e pertinentes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica, que de acordo com Lima e Miotto (2007), é importante para a produção do conhecimento científico, pois ela gera e postula fundamentação teórica ao objeto de estudo, e subsidia a análise dos resultados que serão alcançados.

O estudo se caracterizou como uma pesquisa experimental, inicialmente avaliada em laboratório, tendo o controle das variáveis e simulações de situações que deverão ser observadas e avaliadas, com o antimicrobiano lúpulo em diversas concentrações, e foram realizadas a contagem de bactérias e a taxa de redução populacional, posteriormente foi testada em escala industrial por 2 vezes. O método utilizado foi pesquisa quantitativa, pois apresentou resultados que podem ser quantificados e facilmente traduzidos em gráficos e tabelas.

A pesquisa ainda se caracterizou como um estudo de caso. Pois, segundo Yin (2005), estudo de caso é uma estratégia de pesquisa abrangente que trata de planejamento, coleta de dados e análise desses.

Os testes experimentais foram realizados no Laboratório Industrial em Edéia, usina sucroalcooleira do Estado de Goiás, que opera com processo de fermentação contínua alimentada com duas linhas de fermentações. A planta de fermentação é constituída por 10 fermentadores com capacidade de 9.400 m³, três cubas pré-fermentadoras com capacidade 900 m³ e oito centrifugas para a separação do fermento com capacidade de 1.190 m³-h.

O mosto e a levedura são misturados na primeira dorna e passam de forma contínua para as demais dornas até que todos os açúcares tenham sido consumidos durante o processo. O vinho fermentado que sai da última dorna é enviado para a centrifuga, em que o leite de levedura é tratado (CNPEM, 2020). Esse tratamento passa inicialmente por diluição com água e após recebe a adição de ácido até atingir o pH de 2,0 a 3,0. Assim, o fermento tratado é enviado para a primeira dorna para iniciar uma nova fermentação (MAGALHÃES, 2007). Já o vinho centrifugado é enviado para a coluna de destilação.

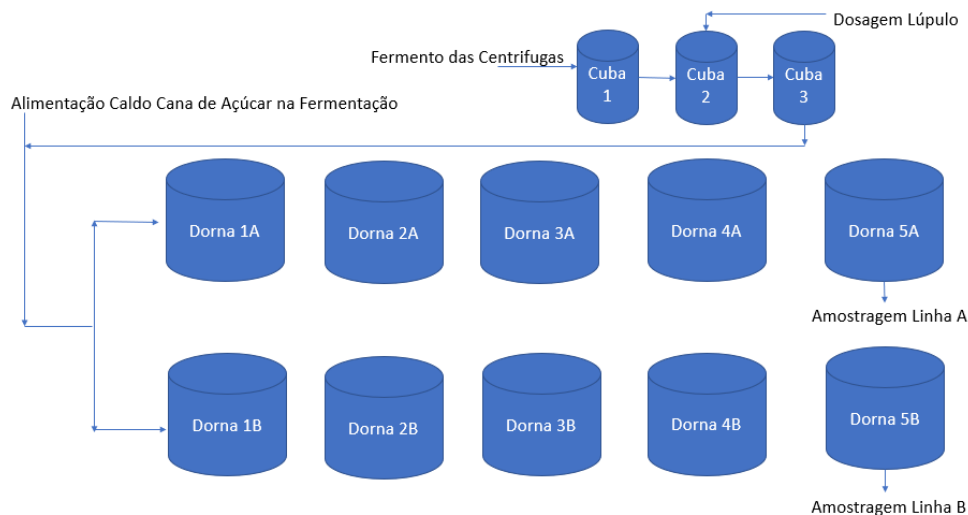
O tempo de fermentação dura aproximadamente 6 a 8 horas. Ao terminar a fermentação, o teor médio de álcool nestas dornas é de 7% a 10%, e a mistura recebe o nome de vinho fermentado (NOVACANA, 2020).

Este vinho fermentado é uma mistura hidroalcoólica, contendo além dos componentes principais – o etanol e a água – outras substâncias como dióxido de carbono em pequenas quantidades, células de leveduras, micro-organismos, sais minerais, açúcares não fermentados,

partículas sólidas em suspensão provenientes da matéria-prima, óleo fúsel, aldeídos, ésteres e ácidos orgânicos (PACHECO, 2010).

A condução do processo fermentativo contínuo alimentado possibilita o rastreamento das infecções que ocorrem ao decorrer da fermentação, realizando as coletas das amostras no final do processo fermentativo, ou seja, nas últimas dornas de fermentação, dornas 5A e 5B (figura 1). Para quantificar a população inicial de bactérias, foi coletada amostra no final do processo fermentativo (vinho), antes do tratamento com antimicrobiano e para determinar a população final de bactérias, a coleta das amostras foi ao final do processo fermentativo (vinho), após o tratamento com o lúpulo (cuba 2), conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1. Ponto de coleta da amostragem (dorna 5A e 5B) e dosagem do lúpulo (Cuba 2).



Fonte: Próprio autor.

Os dados utilizados foram coletados durante o processo de fermentação alcoólica, em que o controle da infecção bacteriana foi realizado por meio de antimicrobiano à base de extrato de lúpulo durante os meses de junho, julho, agosto, setembro, outubro e novembro da safra 2018. Avaliou-se o antimicrobiano LactoStab que tem alfa e beta ácidos obtidos do extrato de lúpulo (RUCKLE; SENN, 2006). Os experimentos foram realizados em escala laboratorial e industrial.

O experimento realizado em escala laboratorial contou com quatro replicatas em concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ppm do extrato de lúpulo, utilizando o teste de sensibilidade.

Em escala industrial, foram realizados três experimentos com a melhor eficiência de redução de bactérias (resultado do experimento em escala laboratorial) versus viabilidade

financeira, utilizando o método de contagem de bactérias e posteriormente realizando o Cálculo da taxa de redução populacional (TRP).

No projeto em questão, os recursos financeiros inerentes à execução do trabalho, foram: reagentes necessários para análises da população de bactérias (bastonetes-ml) e antimicrobianos à base de lúpulo (LactoStab). Estes recursos foram contemplados no planejamento financeiro/econômico da safra 2018 da usina. Todos os itens citados acima são de fundamental importância para a produção de etanol.

O laboratório de microbiologia é um ativo imobilizado da usina localizado no site industrial, em que foram realizadas todas as análises. Logo, todos os recursos estão disponíveis no site industrial, precisamente no laboratório de microbiologia e na fermentação alcoólica onde foi usado o antimicrobiano.

3.2.1 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade é uma análise que tem como objetivo determinar o perfil de sensibilidade e resistência de bactérias e fungos aos antibióticos ou antimicrobianos. Neste estudo, este teste foi realizado com antimicrobiano lúpulo, a fim de definir a melhor dosagem para se utilizar em escala industrial.

Para o teste de sensibilidade foi utilizado o Método Analítico de Microbiologia utilizado na usina e realizados os experimentos, evidenciado abaixo:

Solução de antimicrobianos a serem testados:

- a) Pesar em balança analítica $0,010 \pm 0,001$ g de antimicrobiano;
- b) Transferir para um balão volumétrico de 100 mL;
- c) Completar a dissolução com água esterilizada, completar o volume para 100 mL;
- d) Validade e conservação: preparar a solução no dia que realizar o teste ou no máximo um dia antes e armazenar sobre refrigeração. Após o uso descartar a solução, repetir o procedimento a cada teste realizado.

Preparo do Inóculo (Vinho Bruto Final)

- a) Coletar uma amostra de vinho bruto (dornas em final de fermentação);
- b) Homogeneizar a amostra e transferir 5,0 mL da amostra para tubo de ensaio sem tampa;
- c) Adicionar uma pequena quantidade de papaína (aproximadamente 5 mg)
- d) Homogeneizar em agitador de tubos;
- e) Aguardar 5 minutos;

- f) Transferir 1,0 mL da amostra de vinho bruto em tubo de ensaio com tanque rosqueável contendo 15 mL do meio de cultivo;
- g) Adicionar no tubo 0,15 mL de solução actidiona;
- h) Homogeneizar em agitador de tubos;
- i) Levar esta amostra para estufa de incubação por 12 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- j) Após 12 horas retirar o inóculo da estufa e adicionar novamente uma pequena quantidade de papaína (aproximadamente 5 mg);

Teste variando a concentração do antimicrobiano a ser analisado:

- a) Adicionar 0,15 mL do inóculo que foi preparado + 0,45 mL da solução antibiótico + 015 mL de solução de actidiona nos tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultivo esterilizado;
- b) Homogeneizar em agitador de tubos;

Leitura da Densidade Ótica

- a) Acertar o comprimento de onda do espectrofotômetro para 520 nm (para meios de cultivo sintético) e 800nm (mosto);
- b) Fazer a leitura em absorbância, zerando o espectrofotômetro com água desmineralizada/destilada ou ultrapura;
- c) Homogeneizar a amostra testemunha e testes e fazer a leitura instantaneamente;
- d) Anotar os resultados da primeira leitura (testemunha e teste);
- e) Colocar os tubos com a amostra testemunha e testes em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas;
- f) Retirar os tubos da estufa, homogeneizar em agitar de tubos e fazer a leitura (final);

Nota: Quanto menor a variação da absorbância, mais eficiente será o produto, no controle da microbiota presente na amostra testada.

Cálculos:

a) a Eficiência do produto testado por essa metodologia pode ser avaliada pela variação na absorbância (Δ ABS) da seguinte forma (equação 1):

$$b) \Delta \text{ ABS} = (\text{ABS final} - \text{ABS inicial}) \times 100 \quad (1)$$

c) Exemplo:

- i. 1° Leitura da Testemunha = 0,442 } Δ ABS da Testemunha = 1,030 – 0,442 = 0,558
- i. 2° Leitura da Testemunha = 1,030 }
- ii. 1° Leitura da Amostra (Teste) = 0,504 } Δ ABS da amostra = 0,610 – 0,504 = 0,106
- iii. 2° Leitura da Amostra (Teste) = 0,610 }

iv. % de redução = $(\Delta \text{ ABS da amostra} / \Delta \text{ ABS da testemunha}) \times 100$

v. % redução = $(0,588 - 0,106 / 0,588) \times 100$

vi. % redução = 81,97%

3.2.2 Método de contagem de bactérias

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

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

3.2.3 Cálculo da taxa de redução populacional (TRP)

A taxa de redução populacional para o antibiótico convencional e antimicrobiano à base de lúpulo foi calculada pela equação 2:

$$TRP = \text{População Inicial} / \text{População Final} \quad (2)$$

Sendo:

TRP = taxa de redução populacional

População inicial = contagem de bactérias contaminantes no vinho antes do tratamento com lúpulo (UFC-mL);

População final = contagem de bactérias contaminantes no vinho após o tratamento com lúpulo (UFC-mL).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com este trabalho foi possível observar que houve redução de bactérias em todas as dosagens utilizadas nos experimentos com extrato de lúpulo (LactoStab) em escala laboratorial. Segundo os resultados obtidos em testes laboratoriais demonstrados na tabela 1, a melhor

eficiência de redução de bactérias é de 100 ppm. Avaliando os dados do desvio padrão, podendo perceber que não houve diferença entre as dosagens de 40, 60, 80 e 100 ppm.

Tabela 1. Eficiência (%) de redução de bactérias em teste laboratorial variando a dosagem de lúpulo.

RESULTADOS ANALITICOS - ESCALA LABORATORIAL					
Dosagens	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Média ± Desvio padrão
10 ppm	61,49	73,31	74,09	67,24	69,03 ± 5,88
20 ppm	71,84	89,68	84,31	70,11	78,99 ± 9,53
40 ppm	87,36	93,95	91,61	90,23	90,79 ± 2,75
60 ppm	88,51	96,80	90,15	93,10	92,14 ± 3,64
80 ppm	95,98	97,51	92,70	95,98	95,54 ± 2,02
100 ppm	96,55	98,58	94,16	96,55	96,46 ± 1,80

Fonte: Próprio Autor.

De acordo com Lopes e Silva (2011), o antimicrobiano à base de lúpulo se iguala aos antibióticos convencionais ou os supera, e corrobora que os compostos à base de extrato de lúpulo foram eficazes, apresentando resultados de redução populacional bacteriana a partir de dosagens de 5 a 10 ppm, quantidade inferior às recomendadas pelo fabricante. A recomendação do fabricante do produto LactoStab é realizar a dosagem de 20ppm em relação ao volume total dos reatores da fermentação alcoólica.

A análise da soma dos quadrados (SQ), tabela 2 abaixo, nos mostra que a concentração do lúpulo é responsável por 83,66% dos dados de redução das cargas microbianas e outros fatores são responsáveis por 17%, indicando que a concentração do lúpulo é a grande responsável pela redução microbiana. A comparação entre o valor de F obtido (28,66) maior que o F crítico (2,90) indica existir diferenças entre os valores médias em relação as dosagens. O valor-P é igual a 3,61E-07 (menor que 0,05) e garante com 95% de confiança que a redução microbiana é causada pela concentração do lúpulo.

Tabela 2. Análise de variância – escala laboratorial

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Colunas	2360,61	5	472,12	28,66	3,61E-07	2,90
Erro	247,14	15	16,48			
Total	2821,79	23				

Fonte: Próprio autor

Por fim, a análise pelo teste de agrupamento de médias (Tukey) a 95% de confiança indica que nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 ppm de lúpulo, os resultados são estatisticamente equivalentes (tabela 3), ou seja, não tem diferença a partir de 40 ppm. Com

isso, a dosagem ideal para a redução de carga microbiana é de 40 ppm, devido ao custo-benefício.

Tabela 3. Teste de agrupamento de médias ¹

Concentração	Redução carga microbiana (%)
10	69,03 C
20	78,98 B
40	90,78A
60	92,14 A
80	95,54 A
100	96,46 A

Fonte: Próprio autor

A redução da carga microbiana de 78,99% apresentada na tabela 1 é satisfatória para o corpo técnico e unidade de produção da usina em questão. Com isso, utilizou-se a dosagem de 20 ppm para os testes realizados em escala industrial. Não é viável a utilização de 40 ppm nas condições atuais, pelo alto valor agregado do produto e a usina não está secando levedura para destinar para consumo humano e animal, e seria uma outra fonte de retorno financeiro e que justificaria o uso de uma dosagem maior de antimicrobiano.

Os testes em escala industrial foram realizados no laboratório de microbiologia de uma usina de produção de etanol de 1.600 m³-dia, que possui como configuração fermentação contínua com duas linhas, ou seja, 5 dornas cada linha. Os testes foram realizados com a concentração de 20 ppm, de acordo com as recomendações do fabricante, a fim de quantificar a população de bactérias das amostras, antes e após esta dosagem, observando a redução da população bacteriana nos dois testes realizados, conforme demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. População de bactérias antes e após a dosagem de lúpulo em escala industrial.

RESULTADOS ANALÍTICOS - ESCALA INDUSTRIAL			
	Amostra 1 (UFC)	Amostra 2 (UFC)	Média ± Desvio padrão
Antes da dosagem	7,85 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁸	9,92 x 10 ⁷ ± 2,93
Após a dosagem	6,45 x 10 ⁶	5,75 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁶ ± 0,78

Fonte: Próprio Autor

As amostras foram coletadas nas dornas 5A e 5B, conforme figura 1, antes da dosagem do lúpulo e após a dosagem do lúpulo.

Foram utilizados como premissas dias diferentes para coletas das amostras 1 e 2. Utilizando como premissas moagens de cana e produção de etanol constantes para não ter

¹ "Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05)"

interferências nos resultados. Nos dias de testes não houve paradas e reduções industriais e não houve paradas ou reduções em função de fatores climáticos (chuvas).

Nos dias que foram realizados os testes, para realizar as coletas das amostras 1 e 2, trabalhando com vazões constantes de caldo de açúcar (mosto) para alimentação da fermentação, com o tempo de fermentação a cerca de 9 horas e tempo de tratamento do fermento com valores em torno de 1 hora. Com isso, minimizando as variações e interferências para os resultados das amostras 1 e 2.

Os produtos à base de lúpulo oferecem diversas vantagens, inibem seletivamente os contaminantes, eliminam a formação de ácido láctico e acético oriundos de fermentações paralelas, substituem antibióticos e produtos químicos indesejáveis na fermentação e cumprem as regulamentações da União Europeia para aditivos em ração animal, podem aumentar o desempenho da levedura, acelerar a fermentação e ajudar a eliminar perdas de rendimento na produção de etanol.

A análise da soma dos quadrados (SQ), tabela 5 abaixo, indica que o tratamento foi responsável por 90% do efeito de redução microbiana e tendo confiança de 95% na eficiência do tratamento a 20ppm (Valor-p 0,046).

Tabela 5. Análise de variância – escala industrial.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	86,77	1,00	86,77	20,15	0,046	18,51
Dentro dos grupos	8,61	2,00	4,31			
Total	95,38	3				

Fonte: Próprio autor

Na tabela 6 abaixo, têm as quantidades de lúpulo e antibiótico utilizadas nas safras 2018 e 2019 na usina do estudo de caso. Identifica-se maior quantidade de lúpulo utilizado em ambas as safras comparando com a quantidade de antibiótico.

Tabela 6. Uso de lúpulo e antibiótico na safra 2018 e 2019.

	Safra 2018	Safra 2019
Lúpulo (kg)	2.560	2.500
Antibiótico (Kg)	808	1.130

Fonte: Próprio autor

Na tabela 7 (abaixo), segue comparativo de valores de lúpulo e antibiótico na safra. Foram consideradas como premissas dosagem de 20 ppm de lúpulo e 5 ppm de antibiótico, ambas as dosagens são recomendações dos fabricantes. Nesse comparativo foram considerados os valores para o lúpulo de 128,28 R\$-Kg e para o antibiótico 330,71 R\$-Kg, ambos os valores

são médios de safra e três dosagens mensais durante a safra (8 meses). É evidenciado nesse comparativo que se tem o ganho de R\$ 114.233,00 na safra, quando utilizado o lúpulo.

Tabela 7. Dosagem de lúpulo e antibiótico, valor em R\$/safra.

Lúpulo (R\$)	R\$ 354.052,00
Antibiótico (R\$)	R\$ 468.285,00
Economia (R\$)	R\$ 114.233,00

Fonte: Próprio autor

Após este estudo, foi possível definir um protocolo de dosagem do uso do extrato de lúpulo no controle microbiano em usinas de etanol, conforme abaixo:

1. Realizar amostragem de vinho nas dornas 5A e 5B e fazer análise de população de bactérias (bastonetes/ml).

2. Calcular a quantidade de lúpulo necessário no processo, utilizando como premissa 20 ppm em função do volume total de dornas e cubas de fermentação:

Cálculo: Volume total das dornas fermentação x (20/1000).

Exemplo:

Volume total das dornas fermentação = 7.900 m³;

Cálculo (7.900 x (20/1000)) = 158 litros de lúpulo;

Dividir o volume calculado de lúpulo em 20 horas,

158 litros de lúpulo / 20 = 7,9 litros-hora.

3. Dosar o volume encontrado (neste caso, 7,9 litros de lúpulo) na cuba de tratamento de fermento durante 20 horas

4. A dosagem será realizada com uma bomba dosadora com capacidade de 10 litros/horas, sendo a mesma regulada para obter o volume de lúpulo calculado, 7,9 litros-hora;

5. Após a dosagem de 20 horas, realizar análise de bastonetes-ml diárias, conforme plano de qualidade da usina em estudo, verificando a redução da população bacteriana (bastonetes-ml).

3.4 CONCLUSÕES

Dentro das condições que este estudo foi feito, considerando as limitações metodológicas do estudo de caso no interior de uma usina de produção de etanol, concluiu-se que o antimicrobiano à base de lúpulo (LactoStab) possui eficiência na redução de bactérias em várias dosagens de lúpulo. Logo, em virtude do alto valor agregado do lúpulo e avaliando o comportamento operacional da fermentação alcoólica, conclui-se que a dosagem de 20 ppm é

satisfatória no resultado da redução da população bacteriana. Além disso, poderá ter um ganho na qualidade do subproduto, pois o fermento oriundo dos ciclos fermentativos não terá resíduo de antibiótico em função da dosagem de lúpulo, em unidades que têm em seu portfólio a venda da levedura para consumo humano e animal.

A quantidade de lúpulo utilizado em ambas as safras comparando com a quantidade de antibiótico foi maior, considerando como premissas dosagem de 20 ppm de lúpulo e 5 ppm de antibiótico, ambas as dosagens recomendadas pelos fabricantes. Porém, houve ganho financeiro significativo por safra, com relação ao lúpulo, concluindo-se que ele possui melhor custo benefício quando comparado ao antibiótico. Após este estudo, foi possível definir um protocolo de dosagem do uso do extrato de lúpulo no controle microbiano em usinas de etanol.

Portanto, há necessidades da constante pesquisa sobre os biocidas naturais para que novas descobertas tragam vantagem no controle da contaminação, na preservação da qualidade dos subprodutos e menores custos e riscos que ainda hoje são ocasionados pelo uso de antibióticos químicos.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITEC. **Árvore do conhecimento: Cana de açúcar**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_22122006154841.html>. Acesso em: 09 jul. 2020.

BIOBLOG. **Diferenças entre o combustível fóssil e o biocombustível**. Disponível em: <<http://www.bioblog.com.br/diferencas-entre-o-combustivel-fossil-e-o-biocombustivel/>>. Acesso em: 09 jul. 2020.

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

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CNPEM. **Fermentação: contínua ou em batelada?**. Disponível em: <<http://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>>. Acesso em: 08 jul. 2020.

DE LA TORRE-GONZÁLEZ, F.J. et al. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. **LWT-Food Science and Technology**, v.67, p. 1-7, 2016.

EGUCHI, J. Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 2, n. 22, p. 35-39, 2007. Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm>. Acesso em: 15 set. 2018.

GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A. C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGEMATSU, E. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.4, p.285-296, 2018.

LIMA, T. C. S.; MIOTO, R. C. T. Procedimentos Metodológicos na construção do conhecimento científico: a pesquisa bibliográfica. **Rev. Katál.** Florianópolis v. 10 n. esp. p. 37-45 2007.

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.

MAGALHAES, A. C. M. **Processo fermentativo.** Disponível em: <<http://www.docsity.com/pt/>>. Acesso em: 08 de jul. 2020.

MUTHAIYAN A.; LIMAYEM A.; RICKE C. S. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**. Department of Food Science and Center for Food Safety, Institute of Food Science & Engineering, University of Arkansas, USA, 2010.

NOVACANA. **Curiosidades sobre o etanol.** Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/curiosidades/>>. Acesso em: 07 jul. 2020.

NOVACANA. **Processos de fabricação do etanol.** Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>>. Acesso em: 07 jul. 2020.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características flocculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Dissertação mestrado – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, K. C. S., SONEGO, J. L. S., CRUZ, A. J. G., BERNARDO, A., & BADINO, A. C. (2018). Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, 132, 77-88.

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

Disponível em: <http://www.betatechopproducts.com/literature/files/Hop_acids_natural_antibacterials.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2018.

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

TAUBE, J.S. O negócio é ser natural. **Revista Canamix**, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <<http://www.canamix.com.br/revistas>>. Acesso em: 20 maio 2018.

UNICA. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2019/2020**. Disponível em: <<http://unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>>. Acesso em: 08 jul. 2020.

YIN, R. K. **Estudo de caso: planejamento e métodos**. 3 ed. Porto Alegre: Brookman, 2005. 212 p.