



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

Josimara Lacerda Prado¹ & Waldemar Gastoni Venturini Filho²

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de antibióticos convencionais em relação aos antimicrobianos à base de lúpulo, em escala de produção industrial de bioetanol. A comparação foi feita por meio de cálculo da redução populacional de bactérias lácticas em dois ciclos consecutivos de fermentação. O experimento teve cinco tratamentos (três antibióticos convencionais: Kamoran WP, Corstan e Alcapen 1030, e dois antimicrobianos à base de lúpulo: BetaBio e IsoStab). As amostras foram coletadas na dorna de fermentação. Para quantificar a população inicial de bactérias lácticas, foi coletada amostra no final do processo fermentativo (vinho) antes do tratamento com antibióticos ou lúpulo, e para determinar a população final, a coleta das amostras foi realizada ao final do processo fermentativo (vinho) após o tratamento com esses produtos. O experimento foi inteiramente casualizado e a análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) para as variáveis transformadas pela equação $y' = \sqrt[3]{\log(y + 1)}$. Após a transformação dos dados foi aplicado o teste de Levene para verificar a aderência dos dados à distribuição normal, e as médias comparadas por meio do teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Os resultados mostraram que os antimicrobianos a base de lúpulo (IsoStab e Beta Bio) podem substituir os antibióticos convencionais (Kamoran, Alcapen e Corstan), pois não houve diferença estatística entre os tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Álcool, cana, bactérias lácticas, contaminantes.

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

ABSTRACT: The aim of this work was to compare the efficiency of conventional antibiotics in relation to hop-based antimicrobials, in industrial-scale bioethanol production. The comparison was made by calculating the lactic acid bacteria population reduction in two consecutive fermentation cycles. To conduct the experiment, it was used five treatments (three conventional antibiotics: Kamoran WP, Corstan and Alcapen 1030, and two hop-based antimicrobials: BetaBio and IsoStab). The samples were collected in the fermentation vat. In order to quantify the initial lactic acid bacteria population, a sample was collected at the end of the fermentation process (wine) before the treatment with antibiotics or antimicrobials, and to determine the final population, another sample was collected at the end of the fermentation process (wine) after the treatment with antibiotics or antimicrobials. The experiment was completely randomized and the statistical analysis was performed through analysis of variance (ANOVA) for data processed using the equation $y' = \sqrt[3]{\log(y + 1)}$. After the data transformation, the Levene's test was applied to verify data adherence to normal distribution, and the averages were compared through Tukey's test at 5% probability. The results showed that the hop-based antimicrobials (IsoStab and BetaBio) can be used to substitute the conventional antibiotics (Kamoran, Alcapen and Corstan), since there was no statistical difference between the treatments.

KEYWORDS: Alcohol, sugar cane, lactic acid bacteria, contaminants.

¹ E-mail: prado_bio@hotmail.com

² Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP Departamento de Horticultura Laboratório de Bebidas. E-mail: venturini@fca.unesp.br

O Brasil detém uma tecnologia única no mundo para utilização em grande escala de um combustível

renovável (etanol) que não depende do petróleo. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2010/2011, mais de 660 milhões de toneladas de cana foram processadas em açúcar, álcool e derivados, sendo 28,5 bilhões de litros de álcool (BRESSAN; ANDRADE, 2013).

O conhecimento do processo fermentativo é fundamental para o aperfeiçoamento das técnicas de produção do etanol, que no Brasil ocorre essencialmente por via biológica (OLIVEIRA; SERRA; MAGALHÃES, 2012).

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

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

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

Os antimicrobianos são agentes químicos que inibem o crescimento de microrganismos e são muito utilizados na tentativa de proteger o processo fermentativo (FOOD INGREDIENTS, 2010).

Segundo Caetano e Madaleno (2011) os antibióticos convencionais podem deixar resíduos no creme de levedura, o qual é utilizado por algumas empresas como matéria-prima na produção de levedura seca. Este produto é usado na fabricação de ração animal ou ingrediente para produtos de consumo humano. Por esse motivo, há a necessidade de desenvolvimento de substâncias para o controle de bactérias contaminantes, não prejudiciais à saúde de animais e seres humanos, que consigam a mesma eficiência de controle microbiano nas dornas de fermentação.

O cloreto de sódio (sal de cozinha) é considerado o mais antigo agente antimicrobiano. Atualmente, são utilizados como agentes antimicrobianos em alimentos com baixo valor de pH, ácidos orgânicos como o acético, benzóico,

propanóico e sórbico. Para inibir o crescimento da bactéria *Clostridium botulinum* em alimentos que contenham carne crua como, por exemplo, linguiça, presunto, bacon e salame, são utilizados nitratos e nitritos. Em frutas secas, sucos e vinhos, dióxido de enxofre e sulfitos são usados para controlar o crescimento de microrganismos. Para inibir o crescimento de bactérias e fungos, utiliza-se nisina e natamicina (FOOD INGREDIENTS, 2010).

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

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

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

O ácido beta é extraído com gás carbônico supercrítico que mantém suas propriedades naturais. É dissolvido em propileno glicol de grau alimentício. O beta ácido possui propriedades antimicrobianas e são particularmente ativos contra bactérias Gram-positivas, sendo que a sua atividade contra bactérias Gram-negativas é insignificante. O produto não produz efeito maléfico ao metabolismo ou fisiologia da levedura (ALCOOLBRAS, 2007).

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

Os testes experimentais foram realizados em usina sucroalcooleira do Estado de São Paulo que opera com processo de fermentação descontínua alimentada. A planta de fermentação é constituída por 14 fermentadores com capacidade de 800 m³, seis pré-fermentadores (60 m³) e seis centrífugas para a separação do fermento. A condução do processo fermentativo por batelada alimentada possibilita o rastreamento das infecções que ocorrem em cada fermentador.

2.1 Planejamento Experimental

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

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

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

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

O experimento foi conduzido com cinco tratamentos (três com antibióticos convencionais e dois com antimicrobianos à base de lúpulo), com 17 repetições para Kamoran WP (3 ppm), 17 repetições para Alcapen 1030 (3 ppm) e 13 para Corstan (3 ppm), enquanto que para o IsoStab (20 ppm) 28 repetições e para o Beta Bio (20 ppm) 17 repetições.

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

2.2 Método De Contagem De Bactérias Lácticas Em Placas

O método de contagem total de bactérias lácticas foi realizado através da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) utilizando a técnica *pour plate* (SILVA et al., 2007).

Essa análise microbiológica foi realizada em câmara de fluxo laminar devidamente desinfetada. As amostras de vinhos foram inoculadas em placas de Petri separadas, esterilizadas, com diluições adequadas. Às placas de Petri foi adicionado meio de cultura MRS esterilizado com sobrecamada. A incubação das placas foi feita de forma "invertida" em estufa com temperatura controlada de 30°C por 48h. Após o período de incubação, com o

auxílio do contador, efetuou-se a contagem das colônias e obtenção dos resultados (SILVA et al., 2007).

2.3 Cálculo Da Taxa De Redução Populacional (Trp)

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

$$TRP = \frac{\text{População inicial}}{\text{População final}}$$

Sendo:

TRP = taxa de redução populacional

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

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

Após a determinação da taxa de redução populacional, calculou-se a média para cada tratamento e em seguida os valores foram utilizados na análise estatística.

Foi constatado em todos os tratamentos que, para algumas contagens, a população cresceu após o tratamento com os antimicrobianos. Em função disso, resolveu-se calcular a taxa de redução populacional (TRP), como demonstrada na Equação no item 2.3 (Cálculo da taxa de redução populacional), para evitar os valores negativos quando se trabalha com TRP expressa em percentagem.

2.4 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA). Em função da elevada variabilidade dos resultados de contagem de bactérias lácticas, os dados originais foram transformados ($\sqrt[3]{\log(Y + 1)}$) e submetidos ao teste de Levene para verificar a sua distribuição normal. Após isso, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (VIEIRA, 2006).

O software utilizado foi o SAS 9.1 (SAS INSTITUTE INCORPORATION, 2003).

A análise de variância (Tabela 1) foi significativa ao nível de 5% de probabilidade, indicando que há diferença estatística entre os tratamentos. O teste de Tukey realizado ao nível de 5% de probabilidade mostrou que os produtos de lúpulo (IsoStab e BetaBio) foram superiores e/ou equivalentes aos antibióticos, porém, nunca inferiores (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise de variância para as taxas de redução populacional dos antimicrobianos convencionais (Kamoran WP, Alcapen 1030, Corstan) e antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e BetaBio.

Causa de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p>F
-------------------	----	-------------------	----------------	---	-----

Tratamento	4	2,9699	0,7425	3,03	0,0218*
Resíduo	87	21,3368	0,2452		
Total	91	24,3067			

*significativo ($p < 0,05$)

Tabela 2 - Teste de Tukey da taxa de redução populacional (TRP) de bactérias lácticas, durante a fermentação alcoólica na safra de 2008/2009, para antimicrobianos convencionais (Kamorán WP, Alcapen 1030, Corstan) e na safra 2011/2012, para os antimicrobianos a base de lúpulo: IsoStab e Beta Bio.

Tratamento	Nº Repetições	Média TRP \pm Desvio Padrão
Kamorán WP	17	1,51 \pm 0,60 a
Alcapen 1030	17	1,01 \pm 0,43 b
Corstan	13	1,50 \pm 0,43 ab
IsoStab	28	1,45 \pm 0,47 a
BetaBio	17	1,45 \pm 0,53 ab

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

Segundo os resultados obtidos na Tabela 2, a TRP não foi totalmente eficiente para nenhum dos antimicrobianos utilizados, pois não houve eliminação das bactérias contaminantes e sim, redução da população. Esta informação está de acordo com os resultados de Nobre, Horii e Alcarde (2007). Quanto à comparação da TRP do antimicrobiano BetaBio em relação ao Kamoran, o presente trabalho mostrou resultados diferentes em relação aos publicados por Leite et al. (2012), para quem o antibiótico foi superior ao lúpulo.

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

Os resultados expostos na Tabela 2 mostraram que a eficiência da dosagem do antibiótico Kamoran não foi total ao ponto de eliminar as bactérias contaminantes com dosagens de 3 ppm. Este fato foi relatado por Lopes e Silva (2011) que obtiveram melhores resultados com dosagens de 6 ppm, o dobro da recomendada pelo fabricante.

Pela análise dos resultados mostrados na Tabela 2, observou-se que os antimicrobianos a base de lúpulo se igualaram aos antibióticos convencionais ou os superaram o que corrobora com Lopes e Silva (2011) que relataram que os compostos a base de extrato de lúpulo foram eficazes, apresentando resultados de redução populacional bacteriana a partir de dosagens de 5 a 10 ppm, quantidade inferior às recomendadas pelo fabricante.

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

É possível afirmar, a partir da análise da Tabela 2, que estatisticamente o antibiótico convencional Kamoran apresentou resultado semelhante aos antimicrobianos naturais à base de lúpulo, comportamento semelhante ao observado por Caetano e Madaleno (2011).

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

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

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

Dentro das condições em que este estudo foi feito, considerando as limitações metodológicas do estudo de caso no interior de uma usina sucroalcooleira em safras diferentes, concluiu-se que os antimicrobianos a base de lúpulo (IsoStab e Beta Bio) podem substituir os antibióticos convencionais (Kamorán, Alcapen e

Corstan), pois os estudos demonstraram que sua eficácia é igual ou superior aos convencionais.

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

BRESSAN, A.; ANDRADE, R. A. **Perfil do setor do açúcar e do etanol no Brasil: Safra 2010/2011**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_30_11_58_18_perfil_setor_sucroalco_edicao_10-11.pdf>. Acesso em: 23 maio 2013.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e tecnologia**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D. S.; REIS, M. H. M.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. I. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 611-618, 2012.

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

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

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

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

OLIVEIRA, L. M.; SERRA, J. C. V.; MAGALHÃES, K. B. Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **Revista eletrônica do curso de geografia do campus de Jataí**, Jataí, v.19, p. 1-23, 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/geoambiente/artic le/view/26058>>. Acesso em: 22 ago. 2014.

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

INIMIGO natural. **Revista Alcoolbras**, São Paulo, n. 110, maio 2007. Disponível em: <http://www.revistaalcoolbras.com.br/edicoes/ed_110/mc_2.html>. Acesso em: 22 out. 2012.

AGENTES antimicrobianos. **Revista Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 15, p. 36-42, set/out/nov. 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2012.

OLIVEIRA, L. M.; SERRA, J. C. V.; MAGALHÃES, K. B. Estudo comparativo das diferentes tecnologias utilizadas para produção de etanol. **Revista eletrônica do curso de geografia do campus de Jataí**, Jataí, v.19, p. 1-23, 2012. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/geoambiente/artic le/view/26058>>. Acesso em: 22 ago. 2014.

MANUAL Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca. **Revista Química Real**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, mar. 2009. Disponível em: <http://www.quimicareal.com.br/hp/paginanoticias2.php?area=Linha%20Industrial&cod_info=116&codigo=32&subarea=Elanco>. Acesso em: 20 de out. 2012.

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: 1 fev. 2013.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007. 544 p.

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