**EFEITO DE ALGUNS HERBICIDAS SOBRE A FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA REALIZADA POR LEVEDURAS**

Saccharomyces cerevisiae

**LILIAN APARECIDA FERRO
BIÓLOGA**

Orientador: LUIZ EDUARDO GUTIERREZ

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
dezembro - 1994**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

U⁴ F395e Ferro, Lillian Aparecida
Efeito de alguns herbicidas sobre a fermentação
alcoólica realizada por leveduras *Saccharomyces*
cerevisiae. Piracicaba. 1994.

82p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fermentação alcoólica 2. Herbicida em cana-de-
açúcar - Efeito residual 3. Levedura - Metabolismo +
Alteração 1. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Piracicaba

**EFEITO DE ALGUNS HERBICIDAS SOBRE A FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA REALIZADA POR LEVEDURAS
*Saccharomyces cerevisiae***

LILIAN APARECIDA FERRO

Aprovada em: 28 de dezembro de 1994.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

LCT - ESALQ

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho

LCT - ESALQ

Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti

LCT - ESALQ

Prof. Dr. LUIZ EDUARDO GUTIERREZ
Orientador

À minha família

José Jair, Ana Lídia e irmãos

Dedico

Ao meu namorado

Fábio Secamile Vieira

Ofereço

AGRADECIMENTOS

- . Ao Departamento de Química da ESALQ/USP, pelo apoio oferecido;
- . Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez, pela constante atenção e incentivo durante o trabalho;
- . Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti pelo apoio e colaboração;
- . Aos Técnicos e estagiários do Departamento, em especial ao Luiz Lucatti, pelo auxílio em parte das análises químicas;
- . Ao Departamento de Horticultura pelo fornecimento dos herbicidas para as análises;
- . As bibliotecárias Kátia M. A. Ferraz, Eliana M. G. Sabino e Beatriz Helena Giongo, pela contribuição por parte das dificuldades durante a revisão de literatura;
- . Ao Marcelo Corrêa Alves, pelo auxílio em parte das análises estatísticas;
- . A Sylvania Machado, pela colaboração técnica oferecida durante o trabalho;
- . A Vera Quecini, pela amizade e contribuição em parte da tradução do summary;
- . A Rita de Cássia Marin, pela colaboração nas correções;
- . A equipe Técnica do Ciagri, pelo auxílio em partes das dificuldades de digitação;

- . Aos companheiros de trabalho pelo estímulo e confiança;
- . Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela atenção e amizade;
- . A Ana Cláudia Chesca e Denise Alcântara pela amizade e entusiasmo;
- . A CAPES, pelo auxílio financeiro concedido;
- . E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a minha realização profissional.

Índice

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Formação de alguns produtos durante o processo fermentativo.....	04
2.2. Fatores que afetam a fermentação alcoólica	05
2.2.1. Álcoois Superiores	05
a. conceito.....	05
b. Biossíntese dos alcoóis superiores	05
c. Fatores que afetam a síntese de álcoois superiores e sua importância na fermenta- ção alcoólica	06
2.2.2. Glicerol	07
2.2.3. Ácido succínico	09
2.2.4. Ácido acético	10
2.2.5. Nitrito	11
2.2.6. Nitrogênio.....	12
2.2.7. Sulfito	12
2.2.8. Outros fatores que afetam a fermentação alcoólica	13
2.3. Herbicidas	16
2.3.1. Aspectos Gerais sobre alguns herbicidas	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Microrganismos	26
3.2. Meios para fermentação	26
3.3. Solução dos Herbicidas	26
3.4. Suspensão de células.....	27
3.5. Procedimento dos experimentos	27
3.6. Análises microbiológicas	28
3.6.1. Matéria seca	28
3.6.2. Viabilidade celular	29

	Página
3.7. Análises bioquímicas	29
3.7.1. Açúcares redutores residuais (AR)	29
3.7.2. Glicerol	29
3.7.3. Alcoóis superiores	29
3.8. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Efeito de diferentes herbicidas sobre a fermenta- ção alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
4.1.1. Metisulfuron	31
4.1.1.1. Matéria Seca	31
4.1.1.2. Alcoóis superiores	32
4.1.1.3. Açúcar redutor e CO ₂	34
4.1.1.4. Glicerol	39
4.1.2. 2,4-D	39
4.1.2.1. Matéria Seca	39
4.1.2.2. Alcoóis superiores	41
4.1.2.3. Açúcar redutor e CO ₂	41
4.1.2.4. Glicerol	41
4.1.3. Diuron	42
4.1.3.1. Matéria Seca	42
4.1.3.2. Alcoóis superiores	43
4.1.3.3. Açúcar redutor e CO ₂	44
4.1.3.4. Glicerol	44
4.1.4. Triclopyr, Metolachlor e Glyphosate	44
4.1.4.1. Matéria Seca	44
4.1.4.2. Alcoóis superiores	45
4.1.4.3. Açúcar redutor e CO ₂	46
4.1.4.4. Glicerol	48
4.1.5. Atrazine, Paraquat e Alachlor	49
4.1.5.1. Matéria Seca	49
4.1.5.2. Alcoóis superiores	52
4.1.5.3. Açúcar redutor e CO ₂	54
4.1.5.4. Glicerol	54
4.2. Análise geral de todos os meios testes aplicados nos experimentos	55

	Página
4.2..1. Matéria seca	55
4.2.2. Álcoois superiores	56
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Biossíntese dos álcoois superiores.....	77
2. Perfil cromatográfico dos álcoois superiores presentes nos meios de fermentação. 1 = etanol, 2 = n-propílico, 3 = isobutílico, 4 = desconhecido (somente para as amostras contendo metisulfuron, 5 = isoamílico	78
3. Croqui do experimento	79

LISTA DE QUADROS

1. Meio Sintético básico (MS).....	81
2. Meio Xarope básico (MX).....	81
3. Características dos herbicidas utilizados nos ensaios.....	82

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Efeito dos herbicidas na produção de massa celular (mg/100 ml), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate	32
2. Efeito dos herbicidas na produção de n-propílico (mg/L), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate	33
3. Efeito dos herbicidas na produção de isobutílico (mg/L), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate	34
4. Efeito dos herbicidas na produção de ismamílico (mg/L), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate	35
5. Efeito dos herbicidas na produção CO ₂ (g) em Meio Sintético (12 % de sacarose), contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, durante 96 h de fermentação	36
6. Efeito dos herbicidas na produção CO ₂ (g) em Meio Xarope (13,5 % de ART), contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, durante 72 h de fermentação	37
7. Efeito dos herbicidas na produção CO ₂ (g) em Meio Sintético (16 % de sacarose), contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, durante 96 h de fermentação	38

Página

8. Efeito dos herbicidas na produção CO ₂ (g) em Meio Xarope (17,5 % de ART) contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, durante 96 h de fermentação	40
9. Efeito dos herbicidas na produção de massa celular (mg/100ml) em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor	46
10. Efeito dos herbicidas na produção de n-propílico (mg/L) em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor	47
11. Efeito dos herbicidas na produção de isobutílico (mg/L) em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor	48
12. Efeito dos herbicidas na produção de isoamílico (mg/L) em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor	49
13. Efeito dos herbicidas na produção de CO ₂ (g) em Meio Sintético (12 % de sacarose), contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação	50
14. Efeito dos herbicidas na produção de CO ₂ (g) em Meio Xarope (9,1 % de ART), contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação	51
15. Efeito dos herbicidas na produção de CO ₂ (g) em Meio Sintético (16 % de sacarose), contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação	52
16. Efeito dos herbicidas na produção de CO ₂ (g) em Meio Xarope (16,6 % de ART), contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação	53
17. Média dos valores de glicerol (%) obtidos nos experimentos	54

18. Média dos valores de AR (%) obtidos nos experimentos	55
19. Análise geral de todos os experimentos, quanto a produção de matéria seca (mg/100ml) e os teores de álcoois superiores (mg/L)	57
a. Ensaio 1, 2, 3 e 4	57
b. Ensaio 5, 6, 7 e 8	57

**EFEITO DE ALGUNS HERBICIDAS SOBRE A FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA REALIZADA POR LEVEDURAS
*Saccharomyces cerevisiae***

Autora: LILIAN APARECIDA FERRO

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito de alguns herbicidas sobre o metabolismo da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®), na produção dos álcoois superiores: n-propílico, isobutílico e isoamílico, durante a fermentação alcoólica.

As fermentações foram conduzidas, utilizando-se meio sintético e xarope, com diferentes concentrações de açúcares, na presença dos herbicidas Metisulfuron, 2,4- D, Diuron, Metolachlor, Atrazine, Triclopyr, Paraquat, Alachlor e Glyphosate.

Como parâmetros foram avaliados os teores de álcoois superiores, biomassa, formação de glicerol, açúcares redutores residuais e liberação de CO₂.

A partir dos experimentos realizados foi possível observar que durante o processo fermentativo houve uma grande variação nos resultados obtidos das análises. Este fato ocorreu devido ao tipo de cepa utilizada nos ensaios e as condições nutritivas dos meios oferecidos as

mesmas, que interferiu no comportamento da levedura de panificação *S. cerevisiae*, alterando o seu metabolismo. Com isso notou-se que a maioria dos herbicidas não apresentou efeitos significativos sobre o microrganismo. No entanto herbicidas inibidores da fotossíntese também interferiram na fermentação, o que indica que esses compostos químicos devem apresentar outros modos de ação, os quais estariam agindo sobre enzimas responsáveis por outras vias de biossíntese. Porém, o meio xarope propiciou melhores condições para o desenvolvimento da levedura, enquanto nos meios sintéticos houve uma maior sensibilidade desses microrganismos à ação dos herbicidas.

Dos resultados obtidos, verificou-se que o Metisulfuron um herbicida do grupo das sulfoniluréia, apresentou efeitos marcantes sobre o metabolismo celular em todos os meios utilizados, interferindo na produção de álcoois superiores, o que sugere um desvio na via biossintética para a produção de n- propílico, enquanto houve uma diminuição acentuada para os teores de isobutílico.

Constatou-se também que o herbicida Metisulfuron inibiu o desenvolvimento celular, provocando uma menor produção de massa celular pela levedura durante o processo fermentativo, em todos os testes. Enquanto o Diuron, um composto pertencente ao grupo das uréias substituídas, por possuir em sua estrutura química radicais nitrogenados, quando presente no meio de fermentação estimulou o desenvolvimento celular, refletindo numa maior produção de álcoois isobutílico e isoamílico.

Entretanto, o herbicida Atrazine afetou de modo geral a biossíntese dos álcoois superiores, provocando um aumento nos teores desses álcoois e na produção de massa celular. Enquanto o Paraquat provocou uma redução nos teores dos álcoois superiores analisados.

EFFECT OF SOME HERBICIDES ON ALCOHOLIC FERMENTATION THROUGH YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

Author: LILIAN APARECIDA FERRO

Adviser: Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

SUMMARY

This research work has aimed to verify the effects of some herbicides on baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, (Fleischmann®) the metabolism on its high alcohols production: n-propilic, isobutyllic and isoamyllic, during alcoholic fermentation.

The fermentations were carried out on synthetic media and syrup with different sugar concentrations, using the commercial herbicides Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Triclopyr, Atrazine, Paraquat, Alachlor and Glyphosate.

High alcohol contents, glycerol formation, residual reducing sugars, biomass production and CO₂ were measured as parameters.

From the assays it was possible to observe that during the fermentation process there was a great variation in the results this was due to the kind of strain and to the nutritional conditions of the media used in the experiments, interfering on yeast baker's *S. cerevisiae* behaviour and altering its metabolism. It was noted that most herbicides did not show significant effect on the microorganism. Although, photosynthesis inhibitor herbicides also interfered on fermentation, which indicates that these chemicals showed

to have other ways of action that interfered on other biosynthetic pathway enzymes. However, the syrup media provided the best conditions for yeast development, while on synthetic media the microorganism showed higher sensibility to herbicides.

According to the results, it was verified that Metisulfuron, a sulfonylurea herbicide, had significant effects on cell metabolism for all assayed media, interfering on high alcohol production, which suggests a deviation in biosynthetic pathway to n-propilic alcohol production, with a significant reduction on the isobutyl alcohol content.

It was observed that Metisulfuron inhibited cell development, inducing a smaller production of cell mass of yeast during the fermentation process at all assays. While Diuron, a chemical belonging to the substituted ureas, improved the cell development due to nitrogen radicals in its chemical structure, which lead to a higher production on isobutyl and isoamyl alcohols.

Thereafter, the herbicide Atrazine affected, in a general way, the biosynthesis of high alcohols and the cell mass production. While Paraquat decreased the high alcohol contents assayed.

1- INTRODUÇÃO

De acordo com a literatura, a cana-de-açúcar é originária da Nova Guiné, onde era apenas uma planta silvestre ornamental. A sua disseminação ocorreu em várias partes do Sul do Pacífico, na Indonésia, no Arquipélago da Málasia e em Bengala. Foi a Índia Tropical que se começou a processar a cana-de-açúcar para a produção de açúcar. Só mais tarde, ela chegou ao Brasil, para ser industrializada, através de mudas vindas da Ilha da Madeira. A sua industrialização hoje é mais relevante, pois o Brasil apresenta um consumo vultoso e crescente, quer para a fabricação de bebidas alcoólicas, como o aguardente ou para a produção de álcool como carburante ou para a mistura na gasolina, além de constituir uma notável fonte de divisas como produto de exportação, na forma de açúcar para o consumo humano.

A produção de etanol via fermentação, utilizando-se leveduras, existe há mais de 2 mil anos. No entanto, somente no final do século XIX e início do século XX, a via glicolítica foi estabelecida graças aos estudos feitos por Pasteur, Buchner, Harden, Young, Meyerhoff, Parnas e Warburg, de acordo com a revisão de GUTIERREZ (1991b).

A matéria prima é um requisito básico que deve ser considerado durante a fermentação, pois sua qualidade pode ser causa de contaminações microbianas, bem como contribuir para a flora microbiana que acompanha a cana-de-açúcar, podendo agir como competidoras durante o processo fermentativo e desta maneira podem levar ao comprometimento dos

rendimentos, por estarem degradando os açúcares ou por produzir substâncias tóxicas ao meio.

A fermentação de açúcares por leveduras tem como principal objetivo a produção de álcool etílico. HERRAIZ (1990), afirma que o álcool é produzido a partir de aminoácidos e aldeídos presentes no mosto durante as etapas da fermentação alcoólica. Além da formação de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, o açúcar presente no mosto de cana-de-açúcar é usado também para a produção de outros subprodutos que podem apresentar efeitos benéficos, ou podem afetar processos bioquímicos das leveduras, contribuindo para o decréscimo na produção de etanol durante a fermentação alcoólica (MAIORELLA et al., 1983), como é o caso de alguns inibidores da fermentação: ácido acético, glicerol, gás carbônico, óleo fúsel, ácido succínico, ésteres, etc. Entre os inibidores, alguns podem ser úteis como o anidrido carbônico, ou indesejáveis como o furfural, os ácidos graxos, e o gás sulfídrico. Os ésteres, os ácidos e o óleo fúsel, em pequenas quantidades servem para compor o buquê de bebidas alcoólicas fermentadas. Contudo, estes continuam sendo impurezas indesejáveis na produção exclusiva de álcool etílico.

Desta forma, a Biotecnologia está favorecendo trabalhos genéticos e bioquímicos, no que diz respeito ao melhoramento da matéria prima (cana-de-açúcar), de microrganismos como leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces* e, bactérias das espécies *Zimomonas mobilis* e *Escherichia coli* participantes do processo fermentativo, a fim de serem obtidos maiores rendimentos do produto final. Entretanto, as leveduras encontradas naturalmente no campo oferecem algumas vantagens sobre outros microrganismos por serem eucariontes unicelulares, viverem em condições de aerobiose e anaerobiose, nas fases haplóides e poliplóides e por terem ciclo vital curto e simples.

A atividade microbiana é um dos fatores relacionados à fertilidade do solo e esta população quantitativamente exerce influência nas interações entre plantas e microrganismos. Havendo alguma interação na composição, limitação de alguns grupos ou favorecimento de outros, será afetado o equilíbrio microbiano no solo e, conseqüentemente as condições para o crescimento da planta (DROZDOWICZ, 1971).

Os herbicidas são defensivos agrícolas largamente empregados na agricultura, já existindo trabalhos a fim de verificar o seu modo

de ação sobre o metabolismo das plantas e sobre a flora microbiana que acompanha a cana-de-açúcar para a fermentação.

Como efeitos diretos, os herbicidas podem influenciar na densidade e na composição das populações microbianas tanto no solo como no crescimento de espécies individuais em cultura pura; as atividades da microflora, especialmente com respeito à decomposição da matéria orgânica, à fixação de nitrogênio, às transformações do nitrogênio (amonificação, nitrificação, oxidação do nitrito, desnitrificação), à decomposição da celulose e outras atividades enzimáticas. As interações entre microrganismos e plantas superiores que podem ser afetadas diretamente pelos herbicidas são as seguintes: associações simbióticas (fixação de nitrogênio, micorriza) e associações patogênicas (GROSSBARD, 1985).

Por estas razões, este trabalho tem como objetivo principal, verificar o efeito de alguns herbicidas sobre o metabolismo da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, Fleischmann®, na produção de massa celular, de álcoois superiores como n-propílico, isobutílico e isoamílico, além de outros parâmetros como: glicerol, açúcares redutores residuais e evolução de CO₂, durante a fermentação alcoólica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formação de alguns produtos durante o processo fermentativo.

Durante o processo fermentativo são produzidos, juntamente com o etanol, uma grande variedade de compostos, resultados do metabolismo das leveduras na fermentação, como por exemplo álcoois superiores, glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácidos graxos, gás carbônico, óleo fúsel e ésteres. Entretanto, alguns destes compostos podem apresentar efeitos benéficos para o rendimento, enquanto outros podem interferir no processo bioquímico da levedura, prejudicando a fermentação.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de minimizar os possíveis efeitos considerados prejudiciais durante o processo fermentativo, ou de aumentar o rendimento industrial da fermentação. MAIORELLA et al. (1983), observaram que alguns subprodutos resultantes do metabolismo da *S. cerevisiae*, inibe o crescimento da própria levedura, diminuindo a síntese do etanol. A grande variedade de compostos formados durante a fermentação, dependendo da concentração em que se encontram no meio, podem exercer efeitos benéficos ou prejudiciais, sobre o processo fermentativo.

Entretanto, além desses subprodutos da fermentação, o melaço utilizado como matéria prima para a produção de etanol pode apresentar substâncias inibidoras, como é o caso do furfural, dos biocidas e de outros compostos que podem estar acompanhando a cana-de-açúcar desde a colheita.

2.2. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

2.2.1. Álcoois Superiores

a- Conceito

Durante a fermentação alcoólica são formados além do etanol, outros álcoois em menores quantidades e que apresentam um ponto de ebulição bem mais elevado (90 - 150° C), daí essa denominação. Essa mistura de álcoois superiores, denominada também óleo fúsel, representa uma fração de apenas 0,05 a 1,15 % do açúcar consumido, durante a fermentação alcoólica (HARRISON & GRAHAM, 1970), e é composta principalmente pelo álcool isoamílico (3 metil butanol-1), álcool isobutílico (2 metil propanol 1) e álcool n-propílico, sendo que a maior quantidade de álcool superior produzida corresponde aos álcoois isoamílico e amílico opticamente ativo (RIZZON, 1987).

b- Biossíntese dos álcoois superiores

O óleo fúsel, provavelmente, é sintetizado a partir de aminoácidos, por transaminação, descarboxilação e redução (Fig. 1). Os resultados sugerem decididamente que os componentes do óleo fúsel sejam subprodutos do metabolismo anaeróbico do nitrogênio da levedura.

EHRlich em 1904, isolou e caracterizou a isoleucina e verificou uma semelhança entre o álcool isoamílico e a leucina, e entre o álcool amílico ativo e a isoleucina, sugerindo uma relação metabólica entre estes aminoácidos e álcoois alifáticos. Em 1907, ele mesmo mostrou que a produção do álcool isoamílico é estimulada pela adição da leucina ao meio de fermentação e é reprimida pela adição de nitrogênio inorgânico, conforme revisão feita por INGRAHAM & GUYMON (1960). Além do mais, CACHOT et al. (1991), confirmaram que com a adição de certos aminoácidos ao meio, como leucina, valina, isoleucina e treonina, ocorre uma intensa transformação destes em álcoois superiores.

NEUBAUER & FRONHERZ (1910), mostraram que os ceto ácidos são intermediários na conversão de aminoácidos para álcoois superiores e propuseram um esquema de reações onde o aminoácido é oxidativamente desaminado para formar um ceto ácido o qual é subsequentemente descarboxilado e reduzido, produzindo um álcool superior, conforme revisão dos autores INGRAHAM & GUYMON (1960).

HARRIS (1958), sugere que a biossíntese do n-propílico seja a partir de α -cetobutírico, um intermediário da via biossintética da isoleucina, ainda considera este álcool o mais volátil, podendo o mesmo ser perdido em água de lavagem. Entretanto, AYRAPAA (1967), sugere que a produção dos álcoois superiores ocorre através da descarboxilação pela piruvato descarboxilase de cetoácidos intermediários da biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina e redução dos aldeídos pela desidrogenase alcoólica.

c- Fatores que afetam a síntese dos álcoois superiores e sua importância na fermentação alcoólica

RANKINE, (1967) e SUOMALAINEN (1971) citam em seus trabalhos que os álcoois superiores desempenham importante papel no que diz respeito ao aroma e palatabilidade de bebidas alcoólicas fermentadas. Porém dificultam o processo de obtenção de álcool etílico por destilação.

Entretanto SUOMALAINEN (1971), já recomendava leveduras que produzissem menores teores de álcoois superiores durante a fermentação na fabricação de bebidas alcoólicas e também para a obtenção de álcool etílico de maior pureza nas destilarias, pois facilitam o processo de destilação.

VOLLBRECHT & RADLER (1974), observaram que a produção de álcool superior acompanha o crescimento do microrganismo em questão, no processo fermentativo; enquanto, NORDSTRÖM & CARLSSON (1965), não encontraram tal correlação.

Porém, diversos fatores podem interferir na síntese dos álcoois superiores por leveduras durante a fermentação alcoólica, alterando assim os teores dos mesmos, durante o processo. GUTIERREZ (1993c) afirma que os resultados obtidos variam conforme o experimento, isto é, depende das condições do meio destacando-se a espécie bem como a linhagem da levedura

(RANKINE, 1967), assim como a composição do meio (AYRAPAA, 1967 e 1971); a temperatura, que conforme GUTIERREZ (1993), com o aumento da mesma ou da concentração de sacarose do meio ocorre um aumento na produção de álcool isoamílico, em levedura *S. cerevisiae* do tipo Fleischmann®, devido ao aumento na demanda de nitrogênio; entre outros fatores como nutrientes, pH, aminoácidos, etc.

SUOMALAINEN & KERANEN (1967), verificaram que ao adicionar valina num meio de fermentação houve um aumento na síntese do álcool isobutílico, com a adição de leucina houve um aumento na síntese do isoamílico, e com a adição da isoleucina aumentou-se o amílico opticamente ativo. Isso explica a relação existente entre a produção de álcoois superiores e o metabolismo dos aminoácidos.

GUTIERREZ (1993), apresentou alguns resultados que mostraram que a *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A requer as vitaminas tiamina, ácido pantotênico e pirodoxal de origem exógena e que não é necessário biotina para o crescimento e produção de álcoois superiores. Também constatou que a levedura Fleischmann® foi a que apresentou maior produção de álcoois superiores em todas as concentrações de sacaroses estudadas, enquanto os teores de álcool isobutílico e isoamílico acompanham o aumento da sacarose, nada acontecendo para o n-propílico. A presença dos ácidos fórmico e propiônico não alterou a formação de álcoois superiores por *Saccharomyces cerevisiae* (GUTIERREZ, 1988b).

2.2.2. Glicerol

O glicerol e o succinato, quantitativamente são os mais importantes dos produtos secundários responsáveis pelo consumo de 4 a 5 % do açúcar disponível. Segundo OURA (1977), se o crescimento for evitado, bem como a formação de glicerol e succinato, poderá ocorrer um acréscimo de 4,3 % na produção de etanol. Porém desse modo, durante a fermentação alcoólica teria o propósito de compensar o balanço de óxido-redução, desequilibrado pela formação de succinato e pelo crescimento da levedura (ALVES, 1994).

De acordo com KENYON et al. (1986) e BRUMM & HEBEDA (1988), é provável que as condições estressantes oferecidas à levedura num

meio de fermentação, como concentrações excessivas de potássio, arejamento, temperatura, velocidade de alimentação, sulfito, pH, concentração de açúcar, etc, requerem um maior gasto de energia de manutenção pela levedura, bem como a necessidade de se produzir glicerol como constituinte osmoticamente ativo de modo a permitir as funções enzimáticas no interior da célula.

NORDSTRÖM (1962) relata que o glicerol produzido pela célula de levedura é bem maior que o glicerol utilizado para a biossíntese de lípidos. Conforme relatos de BRUMM & HEBEDA (1988), a produção de glicerol estaria relacionada com a regeneração de NADH, e não com a osmorregulação (ou regulação osmótica) como considerado anteriormente por alguns autores (BELLINGER et al., 1990). Porém ALVES (1994), considera o glicerol um poliol necessário a osmorregulação.

Durante a fermentação alcoólica 4 a 5 % de açúcar consumido é desviado para a formação de glicerol e ácido succínico, os dois principais produtos secundários excretados. Acredita-se que a formação de tais compostos seja mais devido a um meio fermentativo inadequado do que uma necessidade metabólica por parte da levedura. (BASSO¹, 1993). Em todos os ensaios realizados a fim de demonstrar quais os fatores que influenciam a formação do glicerol, este autor constatou que todos os efeitos estressantes sobre a levedura acarretam uma queda na eficiência fermentativa, convergindo para uma maior formação de glicerol. De acordo com seus resultados, também pôde verificar que a oxigenação do meio favorece o crescimento do fermento, provocando uma queda na eficiência fermentativa e consequentemente um aumento na produção de glicerol. Conforme ALVES (1994), o glicerol acompanha o crescimento.

A eficiência da fermentação torna-se melhor à medida que diminui a formação de glicerol num meio fermentativo. Como existe uma estreita correlação entre a linhagem de levedura utilizada e a eficiência fermentativa, GUTIERREZ (1989) verificou que das leveduras utilizadas no seu experimento, a M-300A e a Fleischmann® foram as que apresentaram um maior crescimento e consequentemente uma menor eficiência.

NORDSTRÖM (1966), verificou que para a biossíntese dos aminoácidos além de retirar esqueleto carbônico dos açúcares também aumenta

¹BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1993.

a produção de NADH₂ que para ser reoxidado provoca aumento de glicerol. Fato também verificado por GUTIERREZ (1991b) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

A adição de uréia no meio de fermentação provoca uma diminuição nos teores de glicerol, por que o microrganismo em questão utiliza a uréia como fonte nitrogenada para a produção de aminoácidos, reduzindo os ácidos nucleícos como observou OLIVEIRA (1976).

2.2.3. Ácido succínico

O ácido succínico é quantitativamente o principal ácido formado pela levedura, sendo um produto do ciclo do glioxilato em aerobiose para o fornecimento de esqueleto carbônico à gluconeogênese. STOPPANI et al. (1958), não verificaram a formação de glioxilato a partir de CO₂ em anaerobiose. HEERDE & RADLER (1978), confirmaram este fato e asseguram que o ciclo do glioxilato não participa da formação do ácido succínico durante a fermentação alcoólica. No entanto, hoje assume-se que a síntese do succinato é pela via oxidativa.

ALVES (1994), ressalta que mesmo uma formação de succinato em pequena quantidade acarreta grande perda de açúcar, devido ao glicerol acoplado.

A sequência metabólica responsável pela formação de succinato a partir de glucose pela via oxidativa, propícia a formação de 5 moles de NADH₂ por mol de succinato. Por outro lado a formação de biomassa igualmente está acoplada à formação de 1,3 a 1,5 moles de NADH₂ por cada 100 g. de matéria seca. Desse modo, durante a fermentação, a produção de glicerol teria o propósito de compensar o balanço de óxido-redução, desequilibrado pela formação de succinato e pelo crescimento da levedura (OURA, 1977).

2.2.4. Ácido acético

Os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, isocapróico, exercem ação inibidora sobre a fermentação da glucose por células de leveduras intactas (SAMSON et al., 1955).

O ácido acético é o principal ácido volátil produzido durante a fermentação (WRITING, 1976), embora sua presença em alguns casos, deva-se à atividade bacteriana (COOTE & KIRSOP, 1974). Porém este ácido é encontrado em menores teores que o ácido succínico. A sua formação ocorre durante a fermentação da D-glucose pela *Saccharomyces cerevisiae* (FRAENKEL, 1982).

COOTE & KIRSOP (1974), também verificaram que os teores de ácido acético variam de acordo com a fonte nitrogenada fornecida.

A inibição do crescimento de microrganismos em fermentação pela adição de ácido acético tem sido observado por diversos autores, sendo que a *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* foram estudadas por MOON (1983) e RAMOS & MADEIRA-LOPES (1990). Conforme SAMSON et al. (1955), o ácido acético pode afetar tanto a absorção de fosfato, por interferência química com a membrana, como a atividade de enzimas glicolíticas, ou ainda reduzir o pH intracelular, provocando um maior consumo de ATP, para retirar íons H^+ do interior das células.

GUTIERREZ et al. (1991b), observaram que o ácido acético aumenta a produção de etanol; no entanto, reflete num aumento do tempo de fermentação, sendo com isto inviável a utilização desse composto nas destilarias. Também reduz o teor de álcoois superiores, o que se explica pela menor disponibilidade de ATP para a síntese de acetil coenzima A, a partir de ácido acético.

A formação de acetato durante a fermentação apresenta-se inversamente correlacionada com a de piruvato, sugerindo que este se converta em acetato. O acetato é excretado no início da fermentação (COOTE & KIRSOP, 1974).

MOON (1983), relatou que o ácido acético provoca inibição celular para o crescimento, assim como morte celular (PINTO et al., 1989) em leveduras. Porém DRYSDALE & FLEET (1989), demonstraram que o efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* se

deve em partes a outras substâncias inibitórias provenientes do metabolismo bacteriano.

PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS (1989), constataram que o ácido acético não afeta o transporte de glicose, mas sim exerce ação inibitória sobre a enolase, modificando o controle glicolítico, sugerindo a participação da ATPase no controle do pH citoplasmático.

2.2.5. Nitrito

GLACET et al. (1985a), verificaram que a adição de nitrito no mosto de melaço de beterraba, aumentou o tempo da fermentação alcoólica, fato explicado por GUTIERREZ & DE MARTIN (1991) pela redução na produção de álcool superior, aumentando os níveis dos carboidratos de reserva trealose e glicogênio, quando testaram concentrações crescentes de nitrito em meio sintético de fermentação. No entanto, nada aconteceu para a produção de etanol, porém o teor de glicerol teve um aumento significativo com a adição de nitrito no meio.

Conforme relataram HINZE & HOLZER (1986), isto ocorre devido a inibição da desidrogenase do gliceraldeído-3-P pelo nitrito, ou pela inibição da descarboxilase pirúvica por nitrito, que diminui a regeneração do NAD pela desidrogenase alcoólica, desviando a fosfodiidróxiacetona para glicerol de acordo com SUMMER & SOMERS (1947).

Quanto a produção de álcoois superiores, a presença de NO₂ no meio de fermentação aumenta a formação do álcool n-propílico e reduz a formação dos álcoois isoamílico e isobutílico. Neste caso, GUTIERREZ & De MARTIN (1991), sugeriram que ocorre uma destruição da tiamina por nitrito, explicando a maior produção do n-propílico. Ou ainda, a ação do nitrito também poderia ser explicada pelo seu efeito na formação do α - hidroxietil pirofosfato de tiamina, reduzindo a formação dos aminoácidos isoleucina, valina e leucina, o que explica também a maior duração na presença do nitrito.

2.2.6. Nitrogênio

JONES et al. (1981), relatam que o conteúdo de nitrogênio nas leveduras pode chegar a 10% da matéria seca, um importante constituinte para qualquer meio de crescimento.

De acordo com COOPER (1982) a *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar uma ampla gama de compostos nitrogenados, tais como aminoácidos, bases nitrogenadas, uréia e amônia, empregando vários sistemas de transporte para cada fonte nitrogenada. A absorção de amônio ocorre com gasto de energia e relaciona-se com efluxo de prótons, acidificando o meio.

JONES et al. (1981), relata que as leveduras são geralmente capazes de utilizar íons amônio como única fonte de nitrogênio, sendo o sulfato de amônio a fonte mais utilizada em fermentações industriais, além da fonte de enxofre prontamente assimilável, se comparada à uréia. Assim, de acordo com as características dos meios fermentativos é utilizado nas concentrações de 70 a 400mg/l.

Segundo ALVES (1994), a maioria dos sistemas metabólicos de assimilação do nitrogênio geram amônia, que por intermédio da enzima desidrogenase glutâmica NADP-dependente, é incorporada ao glutamato, o qual é o principal doador de nitrogênio para o metabolismo biossintético.

O fornecimento de sulfato de amônio resulta numa diminuição na síntese do succinato (GUTIERREZ, 1988a). O mesmo resultado já tinha sido observado por FREITAS-VALLE et al., (1981).

2.2.7. Sulfito

O sulfito é um dos componentes que podem afetar a fermentação alcoólica. Conforme ALVES (1994), o mosto sulfitado pode comprometer seriamente o desenvolvimento da fermentação alcoólica, devido à sua ação no metabolismo da levedura.

O sulfito aumenta a produção de acetaldeído que por sua vez pode acarretar aumento na produção de glicerol e consequentemente, redução dos teores de etanol e álcoois superiores: n-propílico, isobutílico e isoamílico (GUTIERREZ, 1988a). No entanto, deve-se levar em consideração a presença de

altas concentrações de sulfito no mosto que resulta em um aumento no tempo da fermentação alcoólica (GLACET et al., 1985b).

A formação do acetaldeído aumenta significativamente com o aumento do pH, num mosto sulfitado. ANACLETO & van UDEN (1982) sugere que isso ocorre porque com elevação do pH, diminui a proporção de SO₂ livre e aumenta a proporção da forma HSO₃ e SO₃.

HINZE & HOLZER (1986), concluíram que a síntese de ATP a partir de fosfato inorgânico e ADP pára imediatamente com a adição de sulfito ou nitrito, pela adição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Isto ocorre em consequência da inibição da síntese de ATP ligados a degradação glicolítica da glicose.

2.2.8. Outros fatores que afetam a fermentação alcoólica

Os níveis de ácido fórmico em melaços Indonésianos e Filipinos são prováveis limites dos efeitos nas taxas de crescimento (HEALEY & CARNEVALE, 1984).

Os ácidos graxos de cadeia curta em concentração relativamente alta tem efeito importante sobre o metabolismo da levedura; inibem a respiração como um exemplo muito semelhante a inibição da fermentação. Também verificou-se que a oxidação alcoólica e oxidação da glicose foi inibida por aproximadamente o mesmo volume. A inibição da oxidação do etanol indica quais oxidações são também inibidas (SAMSON et al., 1955).

Os ácidos propiônico, butírico e isocapróico inibem anaerobicamente a produção de CO₂ a partir da glucose pelo extrato de células livres de leveduras, e a inibição aumenta com o tamanho da cadeia. O butirato inibe a fermentação do glicogênio, frutose difosfato, 3-fosfoglicerato, e fosfoenolpiruvato, ao passo que aumenta a descarboxilação do piruvato (SAMSON et al., 1955).

A presença de benzoato reduz os teores de álcoois superiores na fermentação alcoólica, o que implica na obtenção de etanol de maior pureza (GUTIERREZ et al., 1991a), além de provocar redução do crescimento da levedura e menor produção de glicerol, sem afetar a viabilidade celular.

Entretanto, este pode potencializar a toxicidade da amônia, possivelmente pela inibição da piruvato carboxilase, que também é inibida pelo glioxilato. Um sítio comum de ação aumenta a possibilidade de que a combinação do benzoato e do piridoxalato pode ser muito mais tóxica que uma outra sozinha (SAMSOM et al., 1955).

DIERSSEN et al. (1956), observaram que em fermentação de laboratório é comum se ter diferentes linhagens de leveduras, porém elas também apresentam diferentes graus de resistência para o efeito de inibição ácido butírico, e entretanto pode tolerar altas concentrações no melaço.

AMIN et al. (1984) e GUTIERREZ (1989), observaram uma redução na produção de matéria seca da levedura, no teor de glicerol durante a fermentação alcoólica e de ácido succínico (DURO & SERRANO, 1981), na presença de outros inibidores como o 2,4 - Dinitrofenol, porém ocorreu paralelamente uma redução na viabilidade celular das leveduras, provavelmente porque o 2,4-Dinitrofenol afeta a síntese de ATP das células das leveduras, o que não ocorreu com o benzoato.

São diversos os biocidas hoje utilizados na indústria alcooleira como diferentes compostos ativos podendo enumerar, entre eles os mais comuns, os derivados da amônia quaternária, pentaclorofenato (GAI, 1945; ALMEIDA & LIMA, 1953; AYRES, 1960), os organo sulfurosos, os derivados da triazina, etc. Sendo de conhecimento geral o efeito dos mesmos sobre as bactérias infectantes de uma fermentação e, não sendo da mesma forma conhecido o efeito dos mesmos sobre as leveduras que, como seres vivos, podem ter suas funções alteradas com variações de viabilidade e brotamento e consequentemente efeitos negativos sobre o rendimento.

Linhagens mesófilas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* crescem num intervalo compreendendo uma temperatura mínima de 10° C e uma máxima de 40° C, estando a temperatura ótima entre 28 e 35° C (JONES et al., 1981).

O níquel inibe o transporte de glicose para dentro da célula da levedura, conforme relatos de STEVENICK (1966). Esse efeito tóxico pode ser explicado pela inibição da desidrogenase alcoólica, segundo FUHRMANN & RHOTHSTEIN (1968).

Entre limites de pH de 4,0 e 6,0 o íon H^{+} atua como inibidor não competitivo da absorção de K^{+} . Possivelmente o efeito do pH no tratamento

das leveduras sobre o rendimento das fermentações parece não estar ligado somente às porcentagens de açúcar residual redutor (AR) e glicerol dos vinhos, mas também à variação nos teores de elementos minerais das células (GOMES, 1988). Enquanto, GAO & FLEET (1988), observaram que a diminuição do pH externo de 6 para 3 aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol. Enquanto ALVES (1994), observou que o tratamento ácido (pH 3,45) induz uma redução na síntese de glicerol, trealose e estagnação do crescimento, em leveduras, podendo este tratamento estar exercendo um efeito protetor na levedura, por produzir a proliferação de bactérias, bem como seu metabolismo, onde estes sim, compreendem efeitos estressantes.

CLARK & MACKIE (1984), relataram que no preparo da madeira para a fermentação a mesma passa por um processo de hidrólise com ácido diluído a quente. Desta forma são obtidos como produtos dessa reação os açúcares e outros componentes como os fenólicos que são inibidores da fermentação etanólica. Estes últimos são de baixo peso molecular com estruturas relacionadas como as 'cetonas de Hibberts' e são consideradas como substâncias indesejadas à fermentação.

O furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) são dois produtos formados pela desidratação dos açúcares (SANCHEZ & BAUTISTA, 1988). Ambos os compostos podem afetar o crescimento e metabolismo de alguns microrganismos inibindo fortemente a síntese de proteínas e de RNA de *Candida tropicalis* (BANERJEE et al., 1981a). O 5-HMF foi encontrado também como um inibidor da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (NIRUPAMA et al., 1981b).

O furfural diminui significativamente a evolução de CO₂ no mosto, em concentração acima de 1 mg / l (BANERJEE, et al., 1981b). Sendo que para SANCHEZ & BAUTISTA (1988), o furfural é muito mais tóxico em fermentação e no crescimento das cepas testadas, do que o 5-HMF.

BANERJEE et al. (1981b), sugeriram que a inibição da glicose e a diminuição na produção de etanol, provavelmente resulta da ação do furfural sobre as enzimas chaves tais como a triose-fosfato desidrogenase e a desidrogenase alcoólica.

2.3. Herbicidas

O solo é o último reservatório para muitos compostos químicos. Os herbicidas podem chegar ao solo por aplicações direta ou, atingi-lo durante o tratamento das culturas, queda das plantas tratadas sobre o solo, ou ainda durante a lavagem da folhagem sob ação das chuvas e dos ventos. Podem permanecer ativos no solo por longos períodos, interferindo diretamente, ou mesmo, impedindo o desenvolvimento de novas culturas. Portanto muitos estudos tem sido realizados a fim de verificar o efeitos desses defensivos agrícolas sobre a flora microbiana, pois quando o objetivo da aplicação do herbicida é interferir nas vias metabólicas das plantas daninhas, esses podem também exercer uma influência sobre a comunidade de microrganismos do solo (RIES, 1976).

A atividade microbiana é um dos fatores relacionados à fertilidade do solo e esta população quantitativa e qualitativamente exerce influência nas interações entre as plantas e os microrganismos. Alguma alteração na composição, limitação de alguns grupos ou favorecimentos de outros, poderá afetar o equilíbrio microbiano no solo e, conseqüentemente as condições para o crescimento da planta (DROZDOWICZ, 1971).

Muitos herbicidas são amplamente utilizados, a fim de reduzirem as perdas na agricultura devido a competição de plantas daninhas. Para tanto, existem estudos em busca de novos herbicidas cada vez mais eficientes, altamente seletivos e fora de perigo aos animais e ao meio ambiente. A via biossintética é alvo comum para a maioria dos herbicidas (DODGE, 1983), embora foi observado que muitos deles agem em mais de um sítio ativo, apresentando um número de efeitos indiretos (KEARNEY, 1969), enquanto o restante incluem herbicidas com atividade hormonal, inibidores de vias biossintéticas específicas, como para a síntese de DNA, aminoácidos, proteínas, carotenóides e um certo número de compostos dos quais os mecanismos de ação não são bem conhecidos (DODGE, 1983). As novas classes de herbicidas tem como modo de ação a inibição específica de enzimas precursoras da via biossintética de aminoácidos em plantas (La ROSSA & FALCO, 1984).

CABRAS et al. (1988), verificaram que a *Saccharomyces cerevisiae* em meio de fermentação adsorve os inseticidas Carbaryl,

Tetraclorvinfos e Deltamethrin, e também os fungicidas Quinometionato, Triadimefon e Vinclozolin. No caso do Deltametrin e Quinometionato houve também degradação química.

A atividade de um herbicida no solo é influenciada pelos seguintes fatores: adsorção de suas moléculas pelos colóides do solo, perda dos mesmos por volatilização e/ou lixiviação, degradação química, fotodecomposição, absorção e degradação pelas plantas (ANDERSON, 1983).

Estudos microbiológicos do solo podem propiciar melhores informações a respeito dos efeitos dos herbicidas, sobre a população microbiana que vive em simbiose com as culturas, ou mesmo aquelas que participam na transformação do material orgânico presente no solo. Porém, deve-se considerar que os microrganismos também podem agir sobre os defensivos agrícolas de diversas formas. Um mecanismo pode envolver degradação com posterior desintoxicação e ou metabolização do defensivo, enquanto que outro mecanismo pode envolver a transformação de uma molécula tóxica em produto que exerça alguma influência benéfica sobre plantas superiores, fauna do solo ou microrganismos (KAUFMAN & KEARNEY, 1970).

No entanto, as leveduras são microrganismos que ocorrem naturalmente no solo, em cana-de-açúcar e outros ambientes agrícolas, onde os herbicidas são frequentemente utilizados (ECHEVERRIGARAY et al., 1991); porém, a *Saccharomyces cerevisiae* é o modelo ideal de organismo eucarioto para investigar a ação dos herbicidas sulfoniluréias a nível celular e molecular. Alguns herbicidas inibidores da fotossíntese podem agir como inibidores do crescimento de leveduras, pois ECHEVERRIGARAY et al. (1991), verificaram este comportamento em algumas cepas e sugeriram que neste caso ocorra possivelmente, outro mecanismo de ação ou a produção de peróxido de hidrogênio associado com funções biológicas, como é o caso do herbicida Paraquat, um bipyridilium.

A L-asparaginase é uma enzima encontrada no solo, que catalisa a hidrólise L-asparagina, produzindo ácido L-aspártico e amônia. No entanto, pouco se sabe a respeito dos defensivos agrícolas sobre a ação desta enzima, pois estes compostos podem afetar reações enzimáticas no solo como a ação da invertase, da fosfatase, da protease, da urease, da catalase e da desidrogenase (CERVELLI et al., 1978).

Verificou-se a presença da enzima L-asparaginase tanto em plantas como em diferentes *strains* de microrganismos (WRISTON, 1971). Porém a asparagina não é um aminoácido essencial aos mamíferos, mas ela é responsável pela translocação do nitrogênio em plantas (ATKINS et al., 1975).

FRANKENBERGER & TABATABAI (1990), realizaram alguns experimentos, testando vários herbicidas no solo e verificaram que de todos os herbicidas testados, os inibidores mais efetivos da L-asparaginase ativa no solo, foram o Alanap[®], Bladex[®], Laço[®], Gramoxone[®], Sutan[®], Diazinon[®] e Malaspray[®]. Verificaram que os efeitos dos pesticidas sobre as enzimas do solo dependem de sua concentração, mas muitas vezes mostram pequena inibição a níveis relativamente altos de aplicação. A inibição da L-asparaginase ativa pelos pesticidas mostra um alcance muito grande, sugerindo que a adição de alguns destes pesticidas no solo pode conduzir a uma redução na quantidade de nitrogênio derivado da matéria orgânica do solo. O efeito de defensivos agrícolas sobre a atividade de outras enzimas estão envolvidas no ciclo de nutrientes e nutrição da planta.

MANN et al. (1965), testaram o efeito de 23 herbicidas na incorporação da leucina na proteína, em sementes de *Sesbania exalata*, e verificaram que apenas 5 deles (CDAA, CIPC, ENDOTHAL, IOXYNIL e PCP) afetaram seriamente a incorporação da leucina.

Há duas fontes de enzima de desintoxicação *in natura*; algumas espécies de colheita agrícola apresentam vias de desintoxicação tais como a glutathione-S-transferase presente em milho (SHIMABUKURO et al., 1971). Uma outra fonte pode ser degradada por microrganismos frequentemente encontrados em solos contaminados com herbicidas (BLOCK et al., 1987).

BHARGAVA et al., (1988), verificaram, que dos herbicidas aplicados para os testes, nenhum afetou a população de bactérias do solo e que a população de actinomicetos foi reduzida em todas as concentrações de todos os herbicidas utilizados no campo. Também ressaltaram que no caso dos fungos as respostas obtidas foram muito variadas: a população foi progressivamente estimulada quando utilizou-se Atrazine, decaiu com a presença do Diuron ou Oxifluorfen e não foi afetada pelo Isoproturon.

Existem várias classes de compostos herbicidas, porém destacam-se os herbicidas aplicados no solo (pré-emergentes), ou sobre as plantas (pós-emergentes); dos quais alguns são mais utilizados no campo pelo

seu modo de ação. Os herbicidas que atuam sobre o sistema fotossintético, ou seja que interferem no transporte de elétrons fotossintéticos em plantas, como é o caso dos compostos triazinas (ASHTON & CRAFTS, 1981), em altas concentrações, podem inibir o crescimento de microrganismos heterotróficos, o que sugere que estes apresentam diferentes modos de ação, ou ainda podem servir como fonte de nutrientes, como é o caso da simazina para alguns fungos (KAUFMAN e KEARNEY, 1970), que em baixas concentrações, estimula o crescimento, como é o caso da atrazine (RICHARDSON, 1970 e PERCICH & LOCKWOOD, 1978), respiração (CURL et al., 1968), e o catabolismo da glicose (TWEEDY & LOEPKY, 1968).

2.3.1. Generalidades sobre alguns herbicidas

O Metisulfuron metil; metil 2 -[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)amino] carbo-nil]-amino]-sulfonil]benzoato, é um novo herbicida pós emergente da Dupont do Brasil, desenvolvido especialmente para a cultura do trigo. É um herbicida sistêmico, pertencente ao grupo das sulfoniluréias, altamente seletivo à cultura do trigo. Este herbicida é um potente inibidor da divisão celular, causando morte da 'gema apical' e crescimento das plantas sensíveis. O trigo é uma planta seletiva ao Metisulfuron metil conseguindo metabolizar rapidamente o produto em compostos não fitotóxicos. O seu principal modo de ação é inibir a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

No entanto, JIM & SANTO (1990), demonstraram que a combinação de alguns herbicidas resulta numa melhor eficiência no campo. É o caso da formulação preparada com os herbicidas Assure[®] (Quizalofop), Ally[®] (Metsulfuron), Ignite[®] (Glufosinato), Spike[®] (Tebutiuron), Starane[®] (Fluoxypyr), Touchdown[®] (Sulfozato) e Whip[®] (Fenoxaprop), no controle de *Leocaena leucoceplala* em cana-de-açúcar.

Os herbicidas do grupo das sulfoniluréias, dentre os quais existe o Sulfometuron metil, ingrediente ativo do produto comercial Oust[®] Weed Killer, bloqueiam o crescimento de bactérias e plantas, inibindo potencialmente

a izoenzima II Acetolactato sintase (ALS), precursora da via biossintética dos aminoácidos, interferindo na produção de aminoácidos de cadeia ramificada em bactérias, (CHALEFF & MAUVAIS, 1984, La ROSSA & SCHLOSS, 1984 e RAY, 1984). Esta enzima cataliza o primeiro passo da síntese da Valina, Isoleucina, Leucina (UMBARGER, 1983).

Segundo FALCO & DUMAS (1985), o Sulfometuron metil (SM), N-[4,6-dimetil-pirimidina-2-yl)-aminocarbo-nil]-2-metoxicarbonil] benzenosulfo-namida é um herbicida pertencente ao grupo das sulfoniluréias que se destaca pela notável eficácia e baixa toxicidade em mamíferos. Estes herbicidas apresentam grande eficiência como inibidores de plantas. Em seus experimentos verificaram que ocorreu a inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, somente em meio mínimo o que sugere que a acetolactato sintase (Fig. 1) seja a enzima alvo deste herbicida em leveduras. Da mesma forma, CHALEFF e MAUVAIS (1984), verificaram que os herbicidas Clorsulfuron e Sulfometuron metil são biologicamente potentes em baixas concentrações, inibindo desta forma a biossíntese da enzima ALS. Entretanto, La ROSSA & SCHLOSS (1984), confirmaram que os herbicidas sulfoniluréias inibem potencialmente a isoenzima II acetolactato sintase (ALS), enquanto o clorsulfuron apresenta bloqueio rápido da divisão celular.

RAY (1984), demonstrou a habilidade de uma suplementação de valina, leucina e isoleucina em reverter os efeitos de inibição do crescimento em plântulas de ervilhas. Uma completa inibição foi observada quando sementes de ervilhas foram germinadas na presença de 28 nM de chlorsulfuron. Porém, através de alterações genéticas nesta enzima, pode-se conseguir indivíduos resistentes aos inibidores da ALS (SCHMITZER et al., 1993). Com isso foram desenvolvidos mutantes ALS resistentes a essas classes de herbicidas, como microrganismos resistentes (CORRUZI, 1991; FRIEDBERG & SEIJFFERS, 1990; YADAV et al., 1986), leveduras (FALCO & DUMAS, 1985; YADAV et al., 1986), cultura de células de plantas (CHALEFF & MAUVAIS, 1984 e RAY, 1984; SAXENA & KING, 1988) e em plantas inteiras (HARMS et al., 1990).

Os herbicidas sulfoniluréias e imidazolinonas tem mostrado ser inibidores dos aminoácidos de cadeia ramificada (BC-AA) em plantas. O sítio de ação de ambas as classes de herbicidas é a acetohidroxiácido sintase, conhecida como AHAS, que cataliza o primeiro passo comum na biossíntese de BC-AA. Nesta reação duas moléculas de piruvato são utilizadas para a formação

da 2-acetolactato partindo do piruvato na rota para a formação da valina e leucina (KANDRA & WAGNER, 1990).

ANDERSON & HILBERD (1985), verificaram que a aplicação do herbicida Imazapyr (Imidazolinona) causa uma redução drástica dos níveis de aminoácidos livres, valina, leucina e isoleucina, após 48 horas do tratamento em plântulas e células de milho.

As imidazolinonas, um grupo de herbicidas desenvolvido recentemente, apresentam um amplo espectro de ação no controle de espécies pertencentes tanto à classe das monocotiledôneas quanto das dicotiledôneas (CONCLETON et al., 1987).

Dos herbicidas pertencentes ao grupo das imidazolinonas, o imazaquin (Scepter), imazapyr e o AC 222 164 se destacaram como potentes inibidores da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS) extraídas de plântulas de milho, podendo os efeitos fitotóxicos serem revertidos mediante suplementação exógena de leucina, isoleucina e valina (SHANER, et al., 1984).

SCHMITZER et al., (1993), pela primeira vez conseguiram dados de inibição da ALS e comparações de resistência cruzada numa ocorrência natural em populações de plantas daninhas resistentes a imidazolinona (imazaquin).

O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), um derivado do ácido fenoxiacético, pertencente a classe dos herbicidas hormonais do tipo pós-emergente, é utilizado em pastagens, cana-de-açúcar e outras culturas.

FOURNIER et al., (1981), realizaram um experimento utilizando-se o herbicida 2,4-D no solo e verificaram que houve um leve aumento no número de microrganismos metabolizadores. Em 1982, FOURNIER & CATROUX mencionaram que o número de microrganismos aumentou com a elevação da concentração do herbicida, onde os quais são capazes de usar o 2,4-D como fonte de carbono.

FRANKENBERGER & TABATABAI (1990), relataram que os herbicidas 2,4-D, assim como o Alacilor e o Paraquat, são inibidores eficientes da L-asparaginase no solo; uma enzima ativa precursora do aminoácido L-asparagina; que pode servir como única fonte de nitrogênio para o metabolismo celular mas não como fornecimento de carbono (JONES & MORTIMER, 1973).

O Diuron, 3-(3,4 diclorofenil)-1,1-dimetiluréia, é um herbicida pertencente ao grupo das uréias substituídas, inibidores da fotossíntese (ALI, et

al., 1986; CALVAYRAC, et al., 1979), pós e pré-emergentes, seletivo, derivado da uréia e aplicado em culturas de abacaxi, café, cana-de-açúcar, algodão, citrus, soja, etc. Bem como outros herbicidas inibidores da fotossíntese, o Diuron possibilita um aumento na quantidade de compostos nitrogenados nas plantas (FEDTKE, 1982).

CURL & RODRIGUEZ-KABÁNA (1972), relataram que o Diuron inibe a produção de esclerótia da *Sclerotinia trifolium* e *Sclerotium rolfsii*, enquanto DEYSSON et al. (1976), observaram em estudos realizados com raízes intactas de *Allium sativum*, que estas apresentaram uma sensibilidade pronunciada deste tecido não clorofilado a altas concentrações de Diuron e herbicidas relacionados e herbicidas não uréia substituída.

Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* o sítio de inibição respiratória pelo Diuron está localizado no citocromo *b* e *c*, intgerferindo no transporte de elétrons, um tanto similar à antimicina (LIU et al., 1972).

BRUSSLAN & HASELKORN (1989), mencionaram em seu trabalho, que aparentemente o único fator que limita a engenharia das plantas superiores Diuron-resistente é o problema da dosagem gênica, sendo que um heterozigoto pode ser herbicida-resistente.

O Dual[®] (2-etil-6-metil-N-(1-metil-2-metoxietil) cloro acetanilida (Metolachlor); pertence ao grupo químico das acetanilidas, portanto é um herbicida seletivo com ação residual, recomendado para o controle de plantas daninhas na pré-emergência, muito usado nas culturas da cana-de-açúcar, feijão, milho e soja (PAES, 1990).

Metolachlor e Alachlor são herbicidas muito semelhantes, porém apresentaram uma variação nas respostas pelas leveduras, embora sejam semelhantes quimicamente (JAWORSKI, 1969). Ambos são herbicidas seletivos, pertencentes ao grupo das acetaniidas, conhecidos comercialmente por Dual[®] e Laço[®], usados em pré-emergência, para controlar várias espécies de plantas daninhas (gramíneas anuais e folhas largas) em culturas de soja, algodão, amendoim, café, cana-de-açúcar, girassol, mandioca e milho (ALMEIDA & RODRIGUES, 1988). Devido a sua alta seletividade para a cultura de soja, é um dos produtos largamente utilizados em pré-emergência nesta cultura, no Brasil.

O Garlon[®], éster butoxietílico do ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético (triclopyr), é um herbicida sistêmico seletivo do grupo dos

piridiloxiacéticos. Indicado para pastagens no controle de plantas daninhas em período de intenso processo vegetativo.

O Gramoxone[®], 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio íon dicloreto, pertence ao grupo químico dos bipiridílios (Paraquat) aplicado em área total antes do plantio direto, pulverizando as plantas nos primeiros estádios de crescimento.

POPE & HOLT (1981), verificaram que o herbicida Paraquat reduz significativamente o total de hifas micorrízicas e número de vesículas, numa concentração 5 vezes maior que a dosagem usual. Porém quando aplicado numa dose de 0,5g. i.a./ha, verificou-se tendência a favorecer o desenvolvimento de hifas, embora os resultados não foram significativamente diferentes do controle inoculado.

O Gesaprin[®], 2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamino-s-triazina (Atrazine) composto derivado da triazina que tem um eficiente efeito herbicida, pois componentes desse grupo, inibem o transporte de elétrons fotossintético em plantas (ASHTON & CRAFTS, 1981). É um herbicida seletivo com ação residual, aplicado em culturas de abacaxi, milho cana-de-açúcar e sorgo.

Porém, em alguns fungos, a Atrazine, em baixas concentrações estimula o crescimento (RICHARDSON, 1970 e PERCICH & LOCKWOOD, 1978), respiração (CURL et al., 1968), mas, apresenta frequentemente efeito inibidor em altas concentrações, (KAUFMAN & KEARNEY, 1970) revela que os fungos utilizam Simazina [2-cloro-4,6-bis(etilamina)-s-triazina], outro composto derivado de triazina, como nutriente. CASALE & HART (1986), notaram um aumento na produção das estirpes e do apotécio, quando tratados com Trifluralina [α , α , α - triflouro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidin] ou Metribuzin [4-amino-6-tert-butil-3-(metio)-as-triazina 5(4H)um].

As acetamidas (α - cloroacetamidas) apresentam múltiplos sítios de ação, afetando a síntese proteica que é o locus de interação, inibindo o crescimento e a enzima α - amilase induzida, em nucleófilos (JAWORSKI, 1969).

O Roundup[®], (N-[fosfonometil]glicina)- Glyphosate, é extensamente utilizado como um herbicida de amplo espectro, do tipo não seletivo, pós-emergente, e biodegradável pelos microrganismos do solo (GRESSHOLF, 1979).

AMRHEIN (1980), relata que há certas evidências de que o Glyphosate interfere na biossíntese de aminoácidos aromáticos num passo

anterior a formação do corísmico, pelo: a- acúmulo do ácido shiquímico em tecidos tratados com este herbicida; b- inibição da síntese das antraquinonas derivada do corismato em culturas de células de *Galium mollugo* e c- inibição da formação do ácido corísmico pelo ácido shiquímico num sistema de células livres de *Aerobacter aerogenes*.

Porém, DODGE (1983), verificou que o mecanismo primário de ação do Glyphosate em plantas e bactérias é a repressão da 5-enolpirúvico-3-fosfato sintetase, uma enzima importante na biossíntese de aminoácidos aromáticos.

JAWORSKI (1972) verificou que o Glyphosate é um inibidor da biossíntese de aminoácidos aromáticos, pois o Glyphosate interfere na biossíntese da fenilalanina e mais especificamente no metabolismo do ácido corísmico para a formação dos aminoácidos. Sabendo-se que muitos microrganismos possuem a via dos aminoácidos aromáticos, JAWORSKI (1972) sugere que estes são organismos interessantes para se determinar a inibição do Glyphosate e se esta inibição pode ser reversível.

O Glyphosate apresenta possivelmente múltiplos alvos de ação. Isto pode ser a causa da extraordinária eficiência contra as plantas e os microrganismos (RUBIN et al., 1982).

RUEPPEL et al. (1977), analisaram os efeitos do Glyphosate sobre microrganismos do solo e, como resultado verificaram em contagens de vários deles (fungos, bactérias e, presumivelmente, actinomicetos) em placas, que não houve efeitos adversos ao glyphosate.

ROISCH & LINGENS (1980), utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo teste, no seu estudo sobre a biossíntese de aminoácidos aromáticos e, observaram que uma concentração de 2 mmol^{-1} do glyphosate não teve efeito sobre a levedura.

HOLLÄNDER & AMRHEIN (1980), verificaram que o Glyphosate inibiu a produção dos compostos fenilpropanóides em plantas, tendo como precursora a fenilalanina. Através de estudos complementares eles sugerem que em *Lemna* e *Rhizobium* o sítio de inibição deste herbicida é 'a priori' para a formação do corismato.

COMAI et al. (1983), sugeriu que o Glyphosate provavelmente inibe a via do ácido shiquímico, em plantas ou bactéria. Enquanto ECHEVERRIGARAY et al. (1991), verificaram que tanto o Roundup® quanto o

Basta® afetaram de fato, a biossíntese de aminoácidos, inibindo o crescimento da maioria dos 'strains' de leveduras em meio mínimo e não fermentável. //

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Nos ensaios de fermentação foi utilizado a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*, prensada, Fleischmann®, obtida no comércio.

3.2. Meios para fermentação

Para os experimentos de fermentação foram utilizados dois meios: Sintético básico (MS) e Xarope básico (MX), que diferiam quanto a quantidade de sacarose, e cujas composições estão apresentadas nos quadros 1 e 2, respectivamente.

Os meios foram previamente preparados, completados com água destilada e esterilizados a 121° C durante 15 minutos.

3.3. Solução dos Herbicidas

Os herbicidas foram obtidos no Departamento de Horticultura da Escola Superior "Luiz de Queiroz"-USP. Para as soluções, os herbicidas foram diluídos em água destilada, de modo a apresentarem uma concentração inicial de 3000 ppm. Para tanto foram dissolvidos 3,0 g do herbicida comercial em um litro de água destilada, sendo 2 ml desta solução adicionada em 55 ml de meio fermentativo contendo inóculo, de modo a se obter uma concentração final de 105 ppm da composição comercial do herbicida. Para todos os ensaios as soluções foram preparadas imediatamente antes do preparo dos experimentos; tendo em vista a perda total de dois

experimentos, em consequência do uso inadequado de soluções estoques preparadas antecipadamente.

No entanto, para os Ensaios 1, 2, 3 e 4 foram selecionados, os herbicidas Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, enquanto para os Ensaios 5, 6, 7 e 8 utilizou-se os herbicidas Atrazine, Paraquat e Alachlor (quadro 3).

3.4. Suspensão de células

Foram preparadas suspensões de células, em água destilada, que serviram de inóculo para os ensaios. Para tanto, foram necessários 96 g do fermento prensado para um litro de água destilada, os quais foram submetido a análise de viabilidade celular. Desta suspensão foram retirados 10 ml, e centrifugados em tubo de ensaio inicialmente tarado, por 5 minutos a 500 g, lavados e resuspenso em água destilada gelada, a seguir foi retirado e descartado o sobrenadante e o "pellet" foi levado em estufa a 105° C, até atingir peso constante, para a obtenção da matéria seca inicial.

3.5. Procedimento dos experimentos

Para tanto foram desenvolvidos 8 ensaios de fermentação em erlenmeyers com capacidade para 125 ml, sendo adicionados em cada um, 50 ml de meio de fermentação, 2 ml da solução de herbicida previamente preparada, juntamente com 5 ml do inóculo. Os frascos tampados com papel alumínio permaneceram em estufa com temperatura constante de $32 \pm 1^\circ \text{C}$, até atingirem peso constante. Para acompanhar a taxa de fermentação, os frascos foram pesados a fim de determinar a liberação do CO_2 , H_2O e outros gases liberados no processo. O final da fermentação foi considerado quando a diferença de peso ficou constante. É importante salientar que, para efeitos de análises, considerou-se apenas o gás CO_2 , por ser liberado em maior quantidade durante o processo. O teor de açúcares redutores residuais (AR) no final da fermentação foi inferior a 1,00 g / 100ml, na maioria dos tratamentos. Os frascos eram agitados ocasionalmente. Após cessada a fermentação foram centrifugados 8 ml do meio em tubo de ensaio por 5 minutos a 500 g,

lavados e resuspenso em água destilada gelada. O sobrenadante foi reservado em freezer e posteriormente foram submetidos as análises de matéria seca, glicerol, açúcares redutores residuais (AR) e álcoois superiores, descritas a seguir.

Contudo, para se analisar os efeitos de alguns herbicidas na produção de álcoois superiores e matéria seca na fermentação alcoólica, foram escolhidos 9 defensivos agrícolas, dos quais 6 são utilizados frequentemente em cana-de-açúcar, bem como em outros cultivos, conforme o quadro 3.

No caso dos ensaios 1, 2, 3 e 4 utilizou-se os herbicidas Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate (quadro 3). Para os experimentos 1 e 2 foram utilizados o meio sintético (MS) com 12 % de sacarose e meio xarope (MX) com 13,5 % de ART, com viabilidade celular de 96,6 %. Enquanto, nos ensaios 3 e 4 foram utilizados o meio sintético (MS) com 16 % de sacarose e o meio xarope (MX) com 17,5 % de ART, adicionando-se o inóculo com uma viabilidade celular de 96,6 % e 98,7 %, em cada ensaio, respectivamente.

Para os ensaios 5, 6, 7 e 8, empregou-se os herbicidas: Atrazine, Paraquat e Alachlor. Porém, os ensaios 5 e 6 foram testados em meio sintético (MS), com 12 e 16 % de sacarose. Enquanto, os ensaios 7 e 8 foram realizados em meio xarope (MX), ajustando o ART dos meios para 9,1 % e 16,6 %, respectivamente, e o pH 4 foi corrigido utilizando-se a solução de H₂ SO₄ 2N.

3.6. Análises microbiológicas

3.6.1. Matéria seca

Para a determinação de matéria seca, foram retirados 8 ml do meio fermentado, centrifugados por 5 minutos a 500 g, em seguida foram lavados em água destilada gelada. O precipitado foi levado à estufa a 100-105° C durante 24 horas. Por diferença com a matéria seca original obteve-se o crescimento da levedura (MSP) em miligramas de M.S. / 100 ml do meio.

3.6.2. Viabilidade celular

Foram determinados segundo PIERCE (1970).

3.7. Análises bioquímicas

3.7.1. Açúcares redutores residuais (AR)

Os teores de açúcares residuais no meio de fermentação foram obtidos pelo método de Somogyi e Nelson, adaptado por AMORIN et al. (1982).

3.7.2. Glicerol

Foi determinado pelo método colorimétrico de oxidação com metaperiodato seguido de reação do formaldeído formado com acetil-acetona e amônia (ZAGO et al., 1989). O método sofre interferência do teor de açúcares redutores residuais acima de 0,5 g / 100 ml. Nas nossas análises isso ocorreu devido ao teor de AR ter sido superior ao valor estabelecido, provavelmente o fato se deve em consequência da composição química do meio ou em função do 'strain' de levedura utilizado para os ensaios.

3.7.3. Álcoois superiores

Os álcoois superiores formados durante a fermentação foram identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa (cromatógrafo CG-17) com detector de ionizador de chama em coluna metálica de 2 metros de comprimento por 0,5 cm de diâmetro interno com a fase estacionária Hallcomid M-18 a 15 % sobre cromosorb P (CG-1904). Temperatura do vaporizador 160° C, temperatura da coluna 110° C e temperatura de detetor 200° C. O fluxo de gás de arraste 40 ml N₂ / min, volume injetado 2 µl, atenuação 10⁻⁹. Para a quantificação foram utilizados padrões puros de álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico. A coluna

utilizada não discrimina álcool amfílico ópticamente ativo (2 metilbutanol-1) do álcool isoamílico (3 metilbutanol-1) assim os resultados apresentados correspondem a soma dos dois álcoois e são apresentados como isoamílico (Figura 2).

3.8. Análises estatísticas

Os ensaios foram preparados de acordo com o delineamento experimental previamente descrito, sendo realizados em blocos casualizados os quais constavam de uma testemunha (controle), seguidos dos tratamentos. Como tratamentos, foram utilizados soluções de herbicidas com uma concentração constante de 105 ppm à partir da solução comercial, realizados em 4 repetições. Para maior facilidade e compreensão foi desenvolvido um croqui de 4 experimentos, o qual está representado na Figura 3. Após realizadas as análises bioquímicas, foram aplicados para as análises estatísticas o teste Regwq, ao nível $\alpha = 0,05$. Para a análise dos 4 meios utilizados no experimento, fêz-se o teste grupo de experimentos, ao nível $\alpha = 0,05$. Os resultados obtidos dos tratamentos e acompanhados destas análises foram incluídos em tabelas, para uma melhor visualização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de diferentes herbicidas sobre a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.1. Metisulfuron

4.1.1.1. Matéria Seca

Foi possível verificar que nos testes contendo Metisulfuron, ocorreu uma redução da massa celular produzida pela levedura *S. cerevisiae* durante a fermentação (Tab. 1) e paralelamente ocorreu uma redução dos álcoois isobutílico e isoamílico (Tab. 3 e 4), enquanto se obteve um aumento significativo nos teores de n-propílico (Tab. 2), durante o processo. Este herbicida é considerado um potente inibidor da enzima ALS (Fig. 1), responsável pela formação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. No entanto, a inibição desta enzima acarretará uma menor produção de proteínas e consequentemente de matéria seca.

Além disso, este produto apresenta em sua fórmula química uma molécula de benzoato, que segundo observações de GUTIERREZ (1991b), é responsável pela redução na produção de matéria seca, de glicerol e nos teores de álcoois superiores durante a fermentação. Este fato pode ser confirmado neste ensaio, quando observou-se uma redução da massa celular produzida durante a fermentação, na presença de Metisulfuron. Desta forma este composto químico estaria interferindo no desempenho deste microrganismo, mesmo na presença do substrato oferecido.

Tabela 1: Efeito dos herbicidas na produção de massa celular (mg /100ml), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate.

HERBICIDAS	MS- 12 % M. 5%	MX- 13,5 % M. 5%	MS- 16 % M. 5%	MX- 17,5 % M. 5%
Controle	219,28 A	242,72 B	158,10 B	202,96 AB
Metisulfuron	155,22 B	113,03 D	139,35 B	156,09 B
2,4- D	169,28 B	234,91 B	158,13 B	198,27 AB
Diuron	231,66 A	288,04 A	279,98 A	196,71 AB
Metolachlor	189,60 AB	183,35 C	195,60 AB	223,27 A
Triclopyr	188,03 AB	172,41 C	206,54 AB	191,96 AB
Glyphosate	233,10 A	166,16 C	229,98 AB	231,09 A
C.V.	10,31	11,55	21,81	11,77
D.M.S.	46,93	53,15	97,97	54,13

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.1.2. Álcoois superiores

Nos experimentos realizados para este trabalho, observou-se um aumento nos teores de n-propílico (Tab. 2), enquanto houve uma redução significativa, nos teores dos álcoois isobutílico (Tab. 3) e isoamílico (Tab. 4) durante o processo fermentativo, o que sugere um possível desvio da via metabólica destes álcoois para a produção de n-propílico.

De acordo com La ROSSA & SCHLOSS (1984), os herbicidas deste grupo apresentam como alvo, o bloqueio no passo que antecede a formação da acetolactato sintase (ALS) - enzima precursora dos aminoácidos de cadeia ramificada: valina, leucina e isoleucina. Entretanto AYRAPAA (1967), sugere que a produção dos álcoois superiores ocorre através da descaboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese destes aminoácidos (Fig. 1). Deste modo o herbicida em questão apresenta uma

influência sobre a produção de matéria seca e, conseqüentemente, atingindo indiretamente a produção de álcoois superiores pela levedura.

Tabela 2: Efeito dos herbicidas na produção de n-propílico (mg/l), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate

HERBICIDAS	MS- 12 % M. 5%		MX- 13,5 % M. 5%		MS- 16 % M. 5%		MX- 17,5 % M. 5%	
Controle	19,14	A	23,58	B	21,10	B	30,21	B
Metisulfuron	42,37	A	66,47	A	60,26	A	110,93	A
2,4- D	16,95	A	21,54	B	20,48	B	35,42	B
Diuron	18,24	A	20,84	B	22,17	B	35,94	B
Metolachlor	17,71	A	22,58	B	21,85	B	43,75	B
Triclopyr	20,55	A	23,80	B	18,03	B	34,38	B
Glyphosate	21,21	A	22,42	B	24,47	B	36,98	B
C.V.	62,66		22,56		47,33		39,22	
D.M.S.	32,14		14,91		29,27		42,19	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

Conforme as análises realizadas, foi possível verificar que os cromatogramas das amostras contendo o herbicida Metisulfuron diferem das demais amostras. Para o caso específico deste herbicida quando presente nos meios utilizados, os cromatogramas apresentaram a formação de uma substância não identificada (Fig. 2), demonstrada através de um 4º pico, o qual sugere estudos posteriores para a sua identificação. Enquanto este fato não ocorreu para os meios na presença dos os demais tratamentos.

Tabela 3: Efeito dos herbicidas na produção de Isobutílico (mg/l), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate.

HERBICIDAS	MS- 12 % M. 5%		MX- 13,5 % M. 5%		MS- 16 % M. 5%		MX- 17,5 % M. 5%	
Controle	24,28	AB	36,87	AB	29,17	AB	45,27	A
Metisulfuron	6,69	C	10,06	C	8,65	B	14,45	B
2,4- D	22,25	B	33,01	B	29,20	AB	47,61	A
Diuron	33,53	A	47,67	A	46,42	A		
48,49	A							
Metolachlor	26,18	AB	29,90	B	30,90	AB	51,27	A
Triclopyr	25,90	AB	26,77	B	33,76	A		
48,93	A							
Glyphosate	30,84	AB	26,59	B	36,47	A		
62,14	A							
C.V.	17,74		18,45		34,07		18,96	
D.M.S.	9,88		12,78		23,98		19,81	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.1.3. Açúcar Redutor e CO₂

Quanto aos teores desses açúcares (Tab. 18) encontrados nos meios de fermentação, foi possível verificar que mesmo na presença do Metisulfuron, a *S. cerevisiae* durante a fermentação metabolizou todo o açúcar do meio (Tab. 18), inclusive nos ensaios contendo as maiores concentrações iniciais de açúcares.

As maiores concentrações de AR encontradas no final da fermentação correspondem às amostras que continham maiores quantidades de açúcares no início do processo. Este fato revela que no final do processo sobrou açúcar; o qual não foi metabolizado pelas leveduras.

Para as análises de evolução de CO₂ verificou-se que ocorreram maiores variações durante as primeiras 48 horas de fermentação

(Tab. 5, 6, 7 e 8). Após este período houve uma provável adaptação das leveduras ao meio de fermentação quando na presença do Metisulfuron, finalizando o processo num período de 96 horas.

Tabela 4: - Efeito dos herbicidas na produção de isoamílico (mg/l), em meios contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate.

HERBICIDAS	MS- M.	12 % 5%	MX- 13,5 % M. 5%	MS- M.	16 % 5%	MX- 17,5 % M. 5%
Controle	93,10	AB	93,36 A	86,07 A	98,16 AB	
Metisulfuron	46,35	C	55,88 C	68,71 A	69,23 B	
2,4- D	79,68	B	82,02 AB	79,74 A	92,61 AB	
Diuron	117,74	A	97,62 A	119,92 A	90,73 AB	
Metolachlor	84,01	ABC	72,31 BC	97,09 A	114,15 AB	
Triclopyr	90,84	AB	69,68 BC	76,99 A	84,47 AB	
Glyphosate	113,35	AB	71,29 BC	148,26 A	122,31 A	
C.V.	17,86		11,26	35,88	20,43	
D.M.S.	36,83		20,04	79,76	45,06	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

A liberação de CO₂ (Tab. 5, 6, 7 e 8) é acompanhada pelo consumo de açúcar do meio, portanto somente para os meios sintético com 12 % de sacarose (Tab. 5) e xarope com 17,5 % de ART (Tab. 8) não houve influência dos herbicidas sobre a liberação CO₂, enquanto os maiores teores de AR foram verificados para o meio com maior teor de açúcar inicial - M.X. 17,5 % (Tab. 18).

Na presença de Metisulfuron em meio xarope com 13,5 % de ART (Tab. 6), ocorreu uma ligeira redução na liberação de CO₂ apenas durante as primeiras 24 h. do processo. Enquanto em meio sintético com 16 % de sacarose (Tab. 7) a liberação deste gás foi ligeiramente maior em

relação ao controle, durante o mesmo período considerado. Entretanto nenhuma diferença foi observada para os demais ensaios.

Tabela 5: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g.), em meio Sintético (12 % de sacarose) contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate; durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	1,917	A	2,785	A	3,095	A	3,237	A
Metisulfuron	2,407	A	2,955	A	3,132	A	3,250	A
2,4- D	1,907	A	2,810	A	3,100	A	3,255	A
Diuron	2,145	A	2,820	A	3,042	A	3,145	A
Metolachlor	2,088	A	2,850	A	3,122	A	3,250	A
Triclopyr	1,977	A	2,832	A	3,112	A	3,247	A
Glyphosate	2,345	A	2,955	A	3,140	A	3,257	A
C.V.	10,988		3,681		1,855		2,083	
D.M.S.	0,533		0,241		0,132		0,154	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

Quando foi analisado o meio xarope com 13,5 % de ART (Tab.6) e meio sintético com 16 % de sacarose (Tab. 7), notou-se que na presença do Diuron durante as primeiras 24 horas de fermentação, ocorreu uma maior liberação de CO₂ (Tab. 6 e 7), bem como uma maior produção de massa celular (Tab. 1), enquanto para os meios contendo Metolachlor, Triclopyr ou Glyphosate, houve uma menor produção de CO₂ (Tab. 6), bem como maiores teores de AR (Tab. 18), o que pode indicar uma não utilização de todo o substrato pela levedura, durante o processo. Além disso, todas essas amostras apresentaram também menores quantidades de matéria seca final (Tab. 1).

Tabela 6: Efeito herbicidas na produção de CO₂ (g), em meio Xarope (13,5 % de ART) contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate, durante 72 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	2,345	AB	3,065	AB	3,337	A
Metisulfuron	2,182	ABC	2,962	AB	3,355	A
2,4- D	2,395	A	3,100	A	3,297	A
Diuron	2,435	A	3,072	AB	3,267	A
Metolachlor	2,025	C	2,880	B	3,290	A
Triclopyr	2,120	BC	3,005	AB	3,325	A
Glyphosate	2,062	C	2,955	AB	3,365	A
C.V.	5,385		3,024		2,421	
D.M.S.	0,275		0,209		0,184	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

Em alguns casos, como a concentração de açúcar e o herbicida, quando associados, podem ser um fator limitante ao desempenho da levedura durante as primeiras horas de fermentação. Embora, tenha-se verificado que para o meio sintético - 16 % de sacarose (Tab. 1), contendo os herbicidas Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, apresentou maior valor de biomassa, quando comparado com o controle.

Na tabela 5, as amostras com Metisulfuron e 2,4-D apresentaram resultados que foram considerados estatisticamente não significativos, porém, observa-se uma maior liberação de CO₂ durante a fermentação. Enquanto, paralelamente, os teores de AR foram baixos (Tab.18), estabelecendo novamente uma correlação entre as análises. Contudo os valores altos de AR encontrados para as amostras Controle, Diuron e Glyphosate (Tab. 18) se deve provavelmente a alguma falha técnica. Todavia, a maioria dos valores obtidos para os teores de AR das amostras

encontram-se dentro dos parâmetros normais das análises, com exceção das amostras contendo 2,4-D. Este fato se repetiu ao meio sintético contendo 17,5 % de ART (Tab. 18); ambos apresentaram maiores quantidades de açúcares. Para os ensaios realizados em meio xarope 17,5 % de ART, como já se esperava, os teores de AR obtidos nas amostras foram mais elevados do que os teores de AR dos ensaios anteriores (Tab. 18), porém, não foram encontradas diferenças significativas, para a liberação de CO₂ durante a fermentação (Tab. 8).

Tabela 7: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g.), em meio Sintético (16 % de sacarose) contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate, durante 96 h. de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	2,090	B	3,198	A	3,930	A	4,297	A
Metisulfuron	2,782	AB	3,655	A	3,745	A	4,262	A
2,4- D	2,133	AB	3,388	A	3,970	A	4,552	A
Diuron	3,283	A	3,685	A	4,290	A	4,552	A
Metolachlor	2,325	AB	3,623	A	4,117	A	4,380	A
Triclopyr	2,157	AB	3,470	A	4,112	A	4,453	A
Glyphosate	2,743	AB	3,810	A	4,238	A	4,458	A
C.V.	20,183		9,514		6,860		3,623	
D.M.S.	1,160		0,797		0,658		0,364	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.1.4. Glicerol

Para os Ensaios 1, 5, 6 e 7 os teores de glicerol no meio fermentativo, foram abaixo de 0,65% (Tabela 17). Enquanto para os Ensaios 2, 3, 4 e 8 os teores obtidos nas análises foram mais elevados. Contudo, para os ensaios 4 e 8, era de se esperar uma maior quantidade de glicerol, por causa da maior quantidade de açúcar presente no meio, porém, os resultados não foram correspondentes.

BASSO (1993)¹, relataram que existe uma correlação entre o crescimento do microrganismo e a produção de glicerol, porém nestes experimentos não verificou-se esta correlação. Provavelmente, isto aconteceu devido ao método colorimétrico utilizado no ensaio; considerado não muito preciso, ou ainda, devido à alguma uma falha técnica ou mesmo, pela utilização de lotes diferentes de leveduras, podendo estes conter linhagens predominantes diferentes, que poderiam estar interferindo nos resultados. Pois, sabe-se que a produção de glicerol pela levedura depende das condições oferecidas às mesmas e, também da linhagem de levedura utilizada. Entretanto, na presença de Diuron os ensaios 1 e 4 apresentaram os maiores teores de glicerol (Tab. 17).

Nas condições destes ensaios, durante as análises foram encontrados altos teores de glicerol. De acordo com KENYON et al. (1986), concentrações elevadas de açúcar pode-se considerar como condições estressantes para as leveduras.

Os valores de glicerol (Tab. 17) nos ensaios com Metisulfuron foram mais altos que o Controle, porém estão dentro dos parâmetros normais de análise.

4.1.2. 2,4-D

4.1.2.1. Matéria seca

Para os meios testes contendo o herbicida 2,4-D, foi possível verificar uma pequena redução na produção da massa celular pela *S.*

¹BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP), Piracicaba, SP., Comunicação Pessoal, 1993.

cerevisiae somente para o meio sintético contendo 12 % de sacarose e xarope com 13,5 % de ART (Tab. 1) durante a fermentação, enquanto não houve efeito significativo sobre a levedura, para os demais meios testes na presença deste herbicida. Embora, FOURNIER & CATROUX (1982), tenham verificado um aumento no número de microrganismos metabolizadores com o aumento da concentração deste herbicida no solo.

Tabela 8: Efeito dos herbicidas sobre a produção de CO₂ (g.), meio Xarope (17,5 % de ART) contendo Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate, durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	1,935	A	3,388	A	3,980	A	4,295	A
Metisulfuron	2,007	A	3,457	A	3,990	A	4,250	A
2,4- D	1,822	A	3,293	A	4,008	A	4,400	A
Diuron	1,832	A	3,235	A	3,825	A	4,142	A
Metolachlor	2,220	A	3,615	A	4,173	A	4,447	A
Triclopyr	1,710	A	3,205	A	3,935	A	4,307	A
Glyphosate	2,443	A	3,710	A	4,192	A	4,450	A
C.V.	16,472		7,721		4,818		4,00	
D.M.S.	0,777		0,623		0,457		0,41	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

O 2,4-D, o Alachlor e o Paraquat agem como inibidores da L-asparaginase no solo - enzima precursora da L- asparagina; que pode interferir na quantidade de nitrogênio derivado da matéria orgânica (JONES & MORTIMER, 1973). Contudo, nas condições destes ensaios, o meio pode ter favorecido a decomposição da molécula dos herbicidas Paraquat ou Alachlor pela *S. cerevisiae* (Tab. 8), enquanto, o 2,4-D apresentou efeito inibidor sobre o crescimento celular.

No meio xarope com 13,5% de ART verificou-se um aumento na produção de massa celular sob a ação do Paraquat e Alachlor (Tab. 9), o mesmo não ocorreu sob a ação do 2,4-D (Tab. 1).

4.1.2.2. Álcoois superiores

Para a produção de álcoois superiores, o meio sintético (12 % de sacarose) contendo o 2,4-D apresentou uma ligeira redução na produção do álcool isobutílico (Tab. 3). Enquanto, para os meios sintético (12 % de sacarose) e xarope (13,5 % de ART) houve uma ligeira redução nos teores de isoamílico (Tab. 4). No entanto não foi possível verificar este comportamento para as leveduras em meio sintético com 16 % de sacarose e xarope com 17,5 % de ART. Deste modo existe uma correlação positiva, entre a concentração de açúcar do meio e a produção de álcoois superiores, sendo esta diretamente proporcional.

4.1.2.3. Açúcares redutores e CO₂

Para os ensaios 1 e 2 contendo o herbicida 2,4-D (Tab. 18) houve um total consumo da glucose, enquanto a liberação de CO₂ foi mais intensa durante as primeiras 48 horas de fermentação (Tab. 6) em meio xarope com 13,5 % de ART. Isto implicaria na aceleração do metabolismo celular neste período, e posteriormente numa provável adaptação da levedura ao meio.

Para os demais ensaios não ocorreu efeito significativo sobre a liberação de gases durante o processo (Tab. 7 e 8), enquanto não houve também um completo consumo de glucose (Tab. 18), indicado pelos valores obtidos nas análises de AR.

4.1.2.4. Glicerol

Nos ensaios realizados na presença de 2,4-D, observou-se que, os teores de glicerol encontrados durante as análises bioquímicas, não

ultrapassaram valores iguais a 1,0 %, sendo que os teores mais baixos foram verificados para os ensaios 1 e 2, os quais continham menores concentrações de açúcares. Enquanto, o maior valor foi observado para o ensaio 4 (Meio xarope com 17,5 % de ART). Entretanto, 0,88 % de AR. é considerado um valor relativamente alto para um meio fermentado. Durante a fermentação alcoólica ocorre um desvio da biossíntese de etanol para a produção de glicerol. Portanto, com altos teores de açúcares no meio, a levedura estaria desviando a produção de etanol para a formação de glicerol. Nestes ensaios o fermento foi submetido a várias concentrações de açúcar, adicionando-se as soluções dos herbicidas. Estas condições pode favorecer a formação de glicerol no meio. Além disso, deve-se também considerar as linhagens de leveduras que podem apresentar variações genéticas, uma vez que foram obtidas comercialmente.

4.1.3. DIURON

4.1.3.1. Matéria seca

Para as amostras contendo Diuron, verificou-se um ligeiro aumento na quantidade de matéria seca produzida (Tab. 1) em cada ensaio, acompanhado pelo aumento de álcoois superiores embora estatisticamente não significativo.

O Diuron é um herbicida que apresenta em sua fórmula, radicais nitrogenados, contribuindo como fonte de nutrientes para as plantas (FEDTKE, 1982). No entanto, neste caso, é provável que este composto apresente mais de um modo de ação, por ser um defensivo agrícola que age sobre o sistema fotossintético (ALI et al., 1986).

Nos ensaios realizados, este herbicida provavelmente contribuiu para o fornecimento de nitrogênio às leveduras, bem como o que acontece para as plantas, conforme se refere FEDTKE (1982). Esta fonte de nitrogênio pode estar contribuindo para a síntese proteica, o que estaria refletindo no crescimento celular e consequentemente na quantidade de matéria seca produzida nos ensaios de fermentação por *S. cerevisiae* (Tab.1)

BHARGAVA et al. (1988), verificaram respostas muito variadas na população de fungos do solo, observando uma redução dos

actinomicetos na presença de Diuron. Porém, nos testes, os quais a levedura *S. cerevisiae* foi submetida, não foi observado este comportamento; verificando-se um aumento da quantidade de matéria seca.

A partir dos resultados obtidos, embora em alguns casos não foram estatisticamente significativos, como para os meios sintético - 12 % de sacarose e xarope - 17,5 % de ART (Tab. 1); foi possível observar um aumento na quantidade de matéria seca produzida pela levedura, que provavelmente deve ter utilizado este composto químico como uma fonte de nutriente para o seu desenvolvimento. Pois, este herbicida é um composto derivado de uréia - uma fonte de nitrogênio que o microrganismo, em questão, pode utilizá-la para a síntese proteica. Desta forma tem-se um aumento no crescimento celular, produzindo conseqüentemente um maior número de células durante o processo fermentativo. Este fato pode ser verificado através do método de determinação de matéria seca.

4.1.3.2. Álcoois superiores

Com relação a produção de álcoois superiores, foi possível verificar que ocorreu um aumento significativo nos teores de isobutílico (Tab. 3) e conforme a tabela 4, pôde-se verificar um aumento para os teores de isoamílico em três dos meios utilizados nos ensaios de fermentação, dos quais o MX (13,5 % de ART) e o MS (16 % de sacarose) não foram significativos. Enquanto, os teores de n-propílico (Tab. 2), foram ligeiramente mais elevados quando comparados com o controle, em meio sintético (16 % de sacarose) ou em meio xarope (17,5 % ART), embora os valores não sejam considerados significativos (Tab. 4).

Conforme GUTIERREZ (1991b), existe uma relação entre o crescimento microbiano e a produção de álcoois superiores, pela *S. crevisiae*, durante a fermentação alcoólica, concordando desta forma, com os resultados apresentados nestes experimentos.

4.1.3.3. Açúcares redutores e CO₂

Quanto aos teores de açúcares redutores foi possível verificar que houve um completo consumo do mesmo durante a fermentação alcoólica para todos os meios testes (Tab. 18).

Durante a fermentação o processo esteve levemente acelerado nas primeiras 24 h. Isto pode ser observado para os meios sintético com 16 % de sacarose e xarope com 13,5 % de ART (Tab 6 e 7). Juntamente com estes resultados, observou-se um consumo completo de açúcares do meio xarope e sintético (Tab. 18). Entretanto, pode-se considerar que este herbicida não interfere no período pelo qual transcorre a fermentação alcoólica.

4.1.3.4. Glicerol

As análises revelam que na presença do herbicida Diuron foram encontrados os valores mais altos de glicerol (Tab. 17). De acordo com KENYON et al. (1986), altas concentrações de açúcares pode ser um fator determinante para o 'stress' em levedura. Entretanto, o Diuron, quando adicionado aos meios com maior concentração de sacarose, possivelmente estaria estimulando a formação de glicerol durante o processo fermentativo pela levedura ou, ainda, poderia ser considerado um fator estressante, pelo que o microrganismo necessita produzir o glicerol como um elemento de proteção. Porém, deve-se considerar que altos teores, também foram encontrados para as amostras do controle. A partir desses valores seria relevante se questionar, a influência da linhagem utilizada para os ensaios, sobre a fermentação alcoólica.

4.1.4. Triclopyr, Metolachlor e Glyphosate

4.1.4.1. Matéria seca

Tanto o meio contendo o Metolachlor, quanto o meio com Triclopyr apresentaram uma redução na produção de células (Tab. 1), para os

meios sintético (12,5 % de sacarose) e xarope (13,5 % de ART), enquanto para os meios com maiores concentrações de açúcares foram obtidos maiores quantidades de massa celular. Entretanto, os microrganismos apresentam vias de desintoxicação, que auxiliam na degradação de substâncias tóxicas, utilizando-as para o seu metabolismo.

Conforme a tabela 1, verificou-se um melhor desempenho da levedura nos meios com maiores teores de açúcares. Sendo que, a maior produção de células (Tab. 1) e de álcoois superiores (Tab. 2, 3, e 4) foram obtidos nos ensaios com Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate.

No caso do Metolachlor foi possível observar que existe uma grande variação nas respostas pelas leveduras à este herbicida com relação ao meio utilizado, fato já verificado por JAWORSKI (1969). Desta maneira, considera-se que as leveduras apresentam rápida adaptação à ambientes adversos, utilizando o meio como fontes de vários compostos essenciais ou não ao seu desenvolvimento. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre o metabolismo do microrganismo considerado, com o meio e o herbicida.

De acordo com a Tab. 1, ocorreu uma inibição significativa na produção de massa celular para os meios sintético com 12 % de sacarose e xarope com 13,5 % de ART, enquanto o inverso aconteceu para os meios sintético com 16 % de sacarose e xarope com 17,5 % de ART, sendo possível verificar um aumento na quantidade de células produzidas durante a fermentação. Através destes resultados percebe-se que maiores quantidades de sacarose no meio, propicia melhores condições para o crescimento celular na presença do Triclopyr, do Metolachlor e do Glyphosate, enquanto sob menores concentrações de açúcares, obteve-se menores quantidades de matéria seca no final do processo fermentativo. Entretanto, as variações observadas entre os resultados, pode ser consequência das linhagens utilizadas nos ensaios.

4.1.4.2. Álcoois superiores

Para todos os testes, verificou-se que os meios com Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, apresentaram o mesmo comportamento quando se analisou os teores de álcoois isoamílico (Tab. 4). Embora, somente

para o MX (13,5 % de ART), os resultados foram significativos para as análises deste álcool. Em MS. (16 % de sacarose) o Triclopyr e Glyphosate apresentaram os teores mais elevados de isobutílico (Tab. 3). Enquanto, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do Controle, para a maioria dos casos. Assim, pode-se concluir que a estrutura química de cada herbicida interfere na resposta apresentada pelo microrganismo, dos quais determinados defensivos agrícolas podem apresentar uma fórmula estrutural que favorece o microrganismo, pois estes conseguem desdobrá-los e utilizá-los como fonte de nutriente ao seu desenvolvimento, enquanto outros podem bloquear vias biossintéticas importantes, interferindo no seu metabolismo celular.

Tabela 9: Efeito dos herbicidas na produção de massa celular (mg / 100 ml) em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor.

HERBICIDAS	MS - 12 %		MX - 9,1 %		MS - 16 %		MX - 16,6 %	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	87,15	A	74,650	C	130,87	B	151,18	B
Atrazine	101,21	A	121,52	A	198,05	A	248,05	A
Paraquat	87,15	A	110,58	AB	130,87	B	151,18	B
Alachlor	99,65	A	96,52	B	118,37	B	163,68	B
C.V.	33,24		8,15		16,07		20,78	
D.M.S.	65,467		17,253		48,763		77,90	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.4.3. Açúcares redutores e CO₂

Os teores de AR (Tab. 18), para os herbicidas Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate, foram abaixo de 1,0 % , indicando um completo consumo do açúcar. Embora, observou-se maiores valores de AR para os meios contendo o herbicida Triclopyr e Metolachlor em meio sintético - 16 % de sacarose e meio xarope - 17,5 % de ART (Tab. 18).

Tabela 10: Efeito dos herbicidas na produção de n-propílico (mg/l), em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor.

HERBICIDAS	MS - 12 %		MX - 9,1 %		MS - 16 %		MX - 16,6 %	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	19,50	A	15,70	A	22,13	AB	18,10	A
Atrazine	20,35	A	20,19	A	27,21	A	29,75	A
Paraquat	16,38	A	16,22	A	17,73	B	19,01	A
Alachlor	16,02	A	14,06	A	20,11	AB	23,11	A
C.V.	33,07		26,24		17,73		32,82	
D.M.S.	12,54		9,11		8,12		15,52	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

Quanto a evolução de CO₂, em meio sintético - 12 % de sacarose (Tab. 5), não foi encontrado diferença significativa, porém é visível uma maior liberação deste gás para os três herbicidas em questão. Entretanto, estes herbicidas não interferiram no tempo da fermentação.

Em MX. - 13,5 % de ART (Tab. 6), verificou-se uma redução na liberação de CO₂, durante as primeiras 24 h., nos meios contendo Triclopyr e Glyphosate, enquanto para o Metolachlor a liberação de CO₂ foi mais lenta no período de 48 h.

À partir de 48 h. de fermentação não se observou diferenças na evolução do CO₂, acreditando-se que ocorreu uma provável adaptação do microrganismo ao substrato presente, havendo uma compensação no metabolismo celular.

Para o meios sintético com 16 % de sacarose (Tab. 7), apresentando Metolachlor e Ghyphosate, verificou-se maiores valores para os teores de CO₂ durante a fermentação. O mesmo ocorre para o MX. (17,5 % de ART), embora os resultados não sejam considerados estatisticamente diferentes.

Tabela 11: Efeito dos diferentes herbicidas na produção de isobutílico (mg/l), em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor.

HERBICIDAS	MS - 12 %			MX - 9,1 %			MS - 16 %			MX - 16,6 %		
	M.	5%		M.	5%		M.	5%		M.	5%	
Controle	32,29	A		29,16	A		36,21	A		44,88	A	
Atrazine	31,77	A		31,25	A		41,81	A		44,51	A	
Paraquat	26,56	A		30,72	A		26,46	A		38,60	A	
Alachlor	30,73	A		34,37	A		30,66	A		50,55	A	
C.V.	24,37			17,11			30,18			14,75		
D.M.S.	15,52			11,27			21,40			13,82		

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.4.4. Glicerol

Quanto aos teores de glicerol encontrados nas análises bioquímicas da fermentação, verificou-se uma tendência a se obter maiores teores nas respostas obtidas, quando se analisa os meios contendo maiores concentrações de açúcares (Tab. 17). Entretanto, paralelamente a este fato, é relevante salientar que os ensaios 3 e 4 (MS 16 % e MX 17,5 %, respectivamente, apresentaram os maiores teores de glicerol na presença de Glyphosate (Tab. 17). Então, provavelmente, existe uma relação dos ensaios com maiores concentrações de açúcares, com o Glyphosate, provocando um desvio da produção de etanol para a biossíntese de glicerol pela levedura. Apesar deste herbicida representar um potente inibidor da via biossintética dos aminoácidos aromáticos (JAWORSK, 1972), ele apresenta outros alvos de ação (RUBIN et al., 1982), que poderiam estar contribuindo para a formação de glicerol.

4.1.5. Atrazine, Paraquat e Alachlor

4.1.5.1. Matéria Seca

Meios contendo menores quantidades de açúcares apresentaram menor crescimento. Porém, em todos os meios verificou-se que, as amostras contendo o herbicida Atrazine, apresentaram maiores quantidades de matéria seca (Tab. 9), do que na presença dos demais herbicidas. No entanto, RICHARDSON (1970), já havia constatado que os derivados da triazina, em alguns fungos, quando em baixa concentração estimula o crescimento, pois estes microrganismos utilizam estes compostos como fontes de nutrientes (KAUFMAN & KEARNEY, 1970).

Tabela 12: Efeito dos herbicidas na produção de isoamílico (mg/l), em meios contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor.

HERBICIDAS	MS - 12 %		MX - 9,1 %		MS - 16 %		MX - 16,6 %	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	92,71	A	65,62	A	82,50	A	66,15	A
Atrazine	101,04	A	92,71	A	102,43	A	92,96	A
Paraquat	73,91	A	65,37	A	70,57	A	68,53	A
Alachlor	72,92	A	68,87	A	76,06	A	73,05	A
C.V.	35,94		28,05		21,96		28,69	
D.M.S.	63,85		43,07		38,22		45,29	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

O Alachlor é um herbicida muito semelhante estruturalmente ao Metolachlor, porém foi verificado que ocorreu uma maior produção de matéria seca para todos os meios testes, embora somente o meio xarope (9,1% ART) apresentou resultados estatisticamente significativos (Tab. 9).

Tabela 13: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g) em meio Sintético (12 % de sacarose) contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	2,078	A	2,977	A	3,227	A	3,362	A
Atrazine	2,278	A	2,980	A	3,177	A	3,290	A
Paraquat	1,947	A	2,950	A	3,215	A	3,370	A
Alachlor	1,987	A	2,987	A	3,255	A	3,392	A
C.V.	16,768		73,990		1,416		1,703	
D.M.S.	0,729		0,249		0,095		0,119	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

De acordo com JAWORSKI (1969), o Alachlor é um herbicida que apresenta múltiplos sítios de ação, afetando a síntese proteica, o crescimento celular e inibindo a ação da α -amilase. Porém, nas concentrações utilizadas para estes ensaios não foi possível observar uma redução do crescimento celular pelo Alachlor. Entretanto, no caso do meio xarope com 9,1 % de ART, obteve-se um aumento significativo na produção da massa celular pela levedura durante a fermentação (Tab. 9).

Segundo RICHARDSON (1970) e PERCICH et al. (1978), baixas concentrações de Atrazine estimula o crescimento de alguns fungos, porém em altas concentrações ocorre um efeito inibidor. Nestes experimentos foi utilizado uma concentração baixa do herbicida, conforme a literatura consultada. Por tanto, os resultados estão de acordo com as observações destes autores (Tab. 9).

Os herbicidas Atrazine, Paraquat e Alachlor, apresentaram maiores quantidades de matéria seca produzida quando se compara com o controle. Contudo, somente para os meios testes contendo Atrazine (Tab. 9) os resultados foram significativos, com exceção do meio sintético com 12 % de sacarose. ECHERVERRIGARAY et al. (1991), sugere que o Paraquat, herbicida inibidor da fotossíntese, deve apresentar um outro mecanismo de

ação, associado a funções biológicas, que possa agir como inibidor do crescimento em leveduras num meio não fermentável. Entretanto, quando foi utilizado um meio fermentativo, obteve-se aumento no crescimento das leveduras de panificação, comprovado pela análise de matéria seca do MX. 9,1 % de ART (Tab. 9). Desta forma pode-se inferir que, além de outro modo de ação apresentado pelo herbicida sobre o microrganismo, a resposta depende também do tipo de meio e do substrato oferecido a levedura para o seu desenvolvimento.

Tabela 14: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g.) em meio Xarope (9,1 % de ART) contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	1,940	A	3,355	A	3,892	A	4,180	A
Atrazine	2,503	A	3,633	A	3,993	A	4,193	A
Paraquat	1,940	A	3,348	A	3,892	A	4,142	A
Alachlor	2,037	A	3,443	A	3,920	A	4,145	A
C.V.	13,897		6,096		2,489		1,225	
D.M.S.	0,639		0,463		0,216		0,113	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

Quanto a produção de CO₂, durante a fermentação, não houve influência da ação dos herbicidas Atrazine, Paraquat e Alachlor, sobre a velocidade da fermentação (Tab. 13, 14 e 15), exceto para o Atrazine em meio xarope (16,6 % de ART) com 48 h de fermentação (Tab. 16): o único caso que ocorreu uma liberação de gases consideravelmente maior neste período. Contudo, deve-se admitir que houve uma correlação entre a concentração de açúcares disponível no meio, a liberação de CO₂ (Tab. 13, 14, 15 e 16) e a produção de massa celular (Tab. 9). Portanto, para estes

ensaios pode-se afirmar que, quanto maior a concentração de açúcares, maior deverá ser a liberação de CO₂ do meio, no final da fermentação.

Tabela 15: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g) em meio Sintético (16 % de sacarose) contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	2,210	A	3,320	A	3,767	A	4,002	A
Atrazine	2,755	A	3,498	A	3,762	A	3,900	A
Paraquat	1,930	A	3,160	A	3,700	A	3,930	A
Alachlor	1,990	A	3,190	A	3,658	A	3,853	A
C.V.	14,590		6,138		4,671		6,100	
DMS	0,680		0,424		0,365		0,502	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

4.1.5.2. Álcoois superiores

Na produção dos álcoois superiores (Tab. 9, 10 e 11) observou-se teores mais elevados para todos os meios contendo o herbicida Atrazine, embora os efeitos foram considerados estatisticamente significativos, apenas quando presentes em meio sintético com 16 % de sacarose (Tab. 10).

Desta maneira pode se estabelecer, novamente, uma correlação positiva com a produção de matéria seca. Contudo, quando foram analisados os álcoois separadamente, verificou-se que na presença do Atrazine ocorreu uma maior produção para o álcool n-propílico pela levedura, somente quando adicionado ao M.X. 16 % de sacarose (Tab. 10).

Para os álcoois superiores isobutílico e isoamílico os teores observados não apresentaram diferenças com o Controle (Tab. 11 e 12),

apesar, do herbicida Atrazine, ter apresentado um efeito positivo sobre a produção dos álcoois superiores (Tab. 10, 11 e 12).

Tabela 16: Efeito dos herbicidas na produção de CO₂ (g) em meio Xarope (16,6 % de ART), contendo Atrazine, Paraquat e Alachlor, durante 96 h de fermentação.

HERBICIDAS	CO ₂ 24 h		CO ₂ 48 h		CO ₂ 72 h		CO ₂ 96 h	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
Controle	1,977	A	3,195	B	4,148	A	4,680	A
Atrazine	2,893	A	4,048	A	4,582	A	4,885	A
Paraquat	2,055	A	3,550	AB	4,532	A	5,155	A
Alachlor	2,080	A	3,453	AB	4,265	A	4,825	A
C.V.	16,271		10,677		6,811		4,919	
D.M.S.	0,752		0,798		0,626		0,504	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Regwq.

O Paraquat apresentou um efeito inibidor, sobre a produção de n-propílico, somente quando presente no MS. 16 % de sacarose (Tab. 10). Este herbicida reduz significativamente o número total de hifas micorrízicas quando aplicado, apenas, numa concentração 5 vezes maior do que a usual e pode favorecer o seu crescimento quando utilizados em baixas concentrações (POPES & HOLT, 1981). Entretanto, no meio fermentativo utilizando-se uma concentração, de 105 ppm da solução comercial do herbicida (Gramoxone®), ocorreu um aumento no crescimento da levedura (Tab. 9) em meio xarope com 9,1 % de ART.

Tabela 17: Média dos valores de glicerol (%) obtidos nos experimentos.

HERBICIDAS	ENSAIOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	0,52	0,59	0,57	0,98	0,40	0,67	0,45	0,88
Metisulfuron	0,54	0,75	0,91	0,88	---	---	---	---
2,4-D	0,49	0,77	0,88	1,07	---	---	---	---
Diuron	0,65	0,70	0,60	1,19	---	---	---	---
Metolachlor	0,39	0,75	0,69	1,02	---	---	---	---
Triclopyr	0,44	0,61	0,60	0,97	---	---	---	---
Paraquat	---	---	---	---	0,38	0,63	0,46	0,66
Atrazine	---	---	---	---	0,41	0,55	0,64	0,72
Alachlor	---	---	---	---	0,40	0,53	0,31	0,69
Glyphosate	0,48	0,55	0,86	1,05	---	---	---	---

1 = (M.S. 12 % de sacarose); 2 = (M.X. 13,5 % ART); 3 = (M.S. 16 % de sacarose); 4 = (M.X. 17,5 % ART); 5 = (M.S. 12 % de sacarose); 6 = (M.S. 16 % de sacarose); 7 = (M.X. 9,1 % de ART); 8 = (M.X. 16,6 % ART).

4.1.5.3. Açúcares Redutores e CO₂

Baixos teores de AR foram encontrados para os ensaios contendo os herbicidas Atrazine, Paraquat e Alachlor, o que sugere um completo consumo dos açúcares do meio, transformando-os em álcoois. Acompanhando esses resultados, verificou-se também, que não houve influência dos herbicidas sobre a liberação do CO₂, (Tab. 13, 14, 15 e 16) consequentemente o tempo de fermentação também não foi afetado.

4.1.5.4. Glicerol

As análises de glicerol (Tab. 13) demonstraram que os resultados encontrados, estão dentro dos parâmetros normais para um meio de fermentação. Portanto, pode-se concluir que estes herbicidas não

interferem no metabolismo destes microrganismos, nem podem ser considerados como fatores estressantes.

Tabela 18: Média dos valores de AR (%) obtidos nos experimentos.

HERBICIDAS	ENSAIOS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Controle	0,021	0,04	0,83	0,54	0,06	0,21	0,095	0,78
Metisulfuron	0,021	0,07	0,23	0,85	---	---	---	---
2,4-D	0,027	0,05	1,13	1,14	---	---	---	---
Diuron	0,035	0,05	0,13	0,98	---	---	---	---
Metolachlor	0,024	0,14	0,05	0,96	---	---	---	---
Triclopyr	0,024	0,10	0,50	0,80	---	---	---	---
Paraquat	---	---	---	---	0,05	0,25	0,091	0,90
Atrazine	---	---	---	---	0,06	0,39	0,084	0,47
Alachlor	---	---	---	---	0,05	0,18	0,062	0,87
Glyphosate	0,027	0,12	0,81	0,11	---	---	---	---

1= (M.S. 12 % de sacarose); 2= (M.X. 13,5 % ART); 3= (M.S. 16 % de sacarose); 4= (M.X. 17,5 % ART); 5= (M.S. 12 % de sacarose); 6= (M.S. 16 % de sacarose); 7= (M.X. 9,1 % de ART); 8= (M.X. 16,6 % ART).

4.2. Análise geral de todos os meios testes aplicados nos experimentos

4.2.1. Matéria seca

Quando foi analisado a produção geral de matéria seca (MSP), na presença dos herbicidas: Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr e Glyphosate durante o processo fermentativo, verificou-se que todos os meios de fermentação são iguais, estatisticamente (Tab. 19a). Desta maneira pode-se concluir que neste caso, o tipo de meio não interfere na produção de matéria seca pela levedura. Enquanto, nos ensaios com os herbicidas Atrazine, Paraquat e Alachlor, todos os meios diferiram estatisticamente entre si (Tab. 19b). Neste caso, ocorre uma interferência

positiva da composição do meio com o crescimento celular, pois pode-se observar que meio xarope, independente do teor de ART e do herbicida adicionado a ele, apresenta uma maior produção de células, que os meios sintéticos utilizados nestes ensaios (Tab. 19b).

4.2.2. Álcoois superiores

Durante a fermentação alcoólica foram realizadas análises de n-propílico, isobutílico e isoamílico. Entretanto foi possível verificar que na presença de todos os herbicidas, o meio xarope com 17, 5 % de ART apresentou os teores mais elevados dos álcoois superiores n- propílico, isobutílico e isoamílico (Tab. 19a e b), embora estatisticamente não significativo apenas para os teores de isoamílico (Tab. 19a). Como já foi discutido no texto, a quantidade de açúcares do meio interfere na produção de álcoois superiores, sendo estas concentrações diretamente proporcionais, pois, quanto maior a quantidade de sacarose presente no meio de fermentação, maiores serão os teores destes álcoois. Portanto deve-se levar em consideração que os teores de isoamílico, encontrados normalmente num meio fermentativo são bem maiores do que os demais álcoois superiores.

É necessário salientar a importância da composição do meio de fermentação para o metabolismo celular do microrganismo. Pois, em nossos ensaios ficou claro, através do teste estatístico utilizado (Tab. 19a e b), que a levedura apresenta uma estreita correlação entre o seu comportamento e as condições ambientais oferecidas a ela.

Desta forma, devemos também, considerar que o meio pode interferir no modo de ação do herbicida, pois estes podem apresentar substâncias que se complexam com as moléculas do defensivo agrícola utilizado, inativando-o; como é possivelmente, o caso do meio xarope (Tab. 19a e b), que além das substâncias necessárias ao desenvolvimento do microrganismo, carrega outras impurezas que acompanham a cana-de-açúcar do campo até as dornas de fermentação. Entretanto, é possível fazer tal correlação, já que, quando observamos os resultados apresentados nas tabelas, verificamos que os meios xaropes proporcionaram maior crescimento celular e produção de álcoois superiores, do que os meios sintéticos, independentemente do herbicida utilizado.

Tabela 19: Análise geral de todos os experimentos, quanto a produção de matéria seca (mg/100ml) e os teores de álcoois superiores (mg/L).

a: Ensaios 1, 2, 3 e 4.

MEIOS	MSP		N-propílico		Isobutílico		Isoamílico	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
MS. (12 %)	198,03	A	22,31	B	24,24	B	89,70	A
MX.(13,5 %)	200,09	A	28,75	B	30,12	B	77,45	A
MS. (16 %)	195,38	A	26,91	B	30,61	B	96,68	A
MX.(17,5%)	200,05	A	46,80	A	45,45	A	95,95	A
DMS	48,70		12,84		8,34		21,78	
CV	14,53		43,51		23,38		24,36	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Grupo de experimentos.

b: Ensaios 5, 6, 7 e 8

MEIOS	MSP		N-propílico		Isobutílico		Isoamílico	
	M.	5%	M.	5%	M.	5%	M.	5%
MS. (12 %)	93,53	C	18,68	AB	30,34	B	85,14	A
MX. (9,1 %)	144,54	AB	21,80	A	33,79	B	82,89	AB
MS. (16 %)	100,56	BC	16,55	B	31,38	B	73,15	B
MX.(16,6%)	180,08	A	22,49	A	44,64	A	75,17	AB
DMS	45,67		5,08		8,34		11,90	
CV	20,94		28,25		21,68		29,27	

M. = média dos tratamentos; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste Grupo de experimentos.

Para os meios contendo os herbicidas Triazine, Paraquat e Alachlor, foi possível verificar uma diferença significativa para os teores de isoamílico (Tab. 19b). Neste caso foram encontrados maiores teores deste

álcool para o MS (12 % de sacarose) e menores teores para o MS. (16 % de sacarose), enquanto os meios xaropes não apresentaram diferenças entre eles, porém os resultados foram positivos em relação ao MS (16% de sacarose) (Tab. 19b). Também, para os ensaios contendo os demais herbicidas (Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolacchor, Triclopyr e Glyphosate), notou-se que não houve diferença significativa entre os meios, mas ocorreu uma ligeira diminuição no teor do isoamílico para o MX (13,5 % de ART), enquanto o MS. (16 % de sacarose) apresentou teores mais elevados deste álcool. Neste caso, a quantidade de sacarose e o herbicida adicionados ao meio podem estar interferindo diretamente na produção do álcool superior isoamílico.

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no trabalho é possível concluir que:

. Os herbicidas inibidores da fotossíntese, utilizados nos ensaios, podem exercer efeitos inibidores ou estimular o metabolismo celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, num meio fermentativo;

. O modo de ação dos herbicidas sobre o metabolismo celular, depende não somente do microrganismo, mas também da composição química do meio;

. O meio xarope apresenta substâncias orgânicas diferentes da composição do meio sintético, podendo estas se complexar com as moléculas dos herbicidas;

. O herbicida Diuron, pertencente ao grupo das uréias substituídas, apresenta em sua estrutura química, radicais nitrogenados, que podem ser desdobrados pela levedura para servir de substâncias para ao seu desenvolvimento;

. O herbicida sulfometuron, pertencente ao grupo das sulfoniluréias; potente inibidor da via biossintética dos aminoácidos valina e isoleucina, inibe o crescimento celular e a produção dos álcoois superiores isobutílico e isoamílico em *Saccharomyces cerevisiae*;

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A.; Mc LAREN, R.D.; SOUZA MACHADO, V. Chloroplastic resistance to triazine herbicides in *Sinapsis arvensis* (Wild mustard). *Weed Research*, Oxford, **26**(1): 39- 44, 1986.
- ALMEIDA, F.S. & RODRIGUES, B.N. Guia de herbicidas, recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina, IAPA, 1988. 603p.
- ALMEIDA, J.R. & LIMA, U.A. de. Curso de fermentação alcoólica. Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, **6**: 1- 245. 1953.
- ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1994. 274p., (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- AMIN, G. P.; STANDAERT, P.; VERACTERT. Effects of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation by several yeast in batch or in immobilized cell systems. *Applied Microbiolgy*, Berlin, **19**: 91- 9, 1984.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo. Sociedade brasileira de Microbiologia. 1982. 58 p.
- AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P.; STEINRÜCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vitro*. *Plant Physiology*, Rockville, **66**: 830- 4, 1980.

ANACLETO, J. & van UDEN, N. Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphur dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*. New York, **34**: 2477- 86, 1982.

ANDERSON, W.P. *Weed science principles*. New York, Academic Press, 1983. 655p.

ANDERSON, P.C. & HILBBERD, K.A. Evidence for the interaction of an imidazolinone herbicide with leucine, valine, and isoleucine metabolism. *Weed Science*, Champagne, **33**: 479- 83, 1985.

ASHTON, F.M. & CRAFTS, A.S. *Mode of action of herbicidas*. New York, Wiley Interscience, 1973. 480p.

ASHTON, F.M. & CRAFTS, A.S. *Mode of action of herbicidas*. New York, John Wile & Sons., 1981. 525 p.

ATKINS, E.L.; Mac DONALD, R.L.; GREYWOOD, E.A. Repellent additives to reduce pesticide hazards to honey bees: field tests. *Environmental Entomology*, **4**(2): 207-10, 1975.

AYRAPAA, T. Formation of higher alcohols from ^{14}C -labelled valine and leucine. *The Journal of Institute Brewing*, London, **73**: 30- 3, 1967.

AYRAPAA, T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *The Journal of Institute Brewing*, London, **77**: 266- 76, 1971.

AYRES, G.C.M. Fatores físicos e químicos que influem sobre a fermentação alcoólica, J.R. Almeida e colaboradores, *Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP*, Piracicaba, **1**: 103- 18, 1960.

- BANERJEE, N., BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Development of resistance in *Saccharomyces cerevisiae* against inhibitory effects of browning reaction products. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, **3**(1): 24- 8, 1981a.
- BANERJEE, N., BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, **11**: 226- 8, 1981b.
- BEESTMAN, G.B. & DEMING, J.M. Dissipation of acetanilide herbicides from soils. *Agronomy Journal*, Madison, **66**(2): 308- 11, 1974.
- BELLINGER, Y.; LEMARCHAL, P.; LARHER, F. Relations entre la tolérance à la salinité de *Saccharomyces cerevisiae* et L'efficience des conversions de glucose en biomasse, en glycerol et en lipides. *Science des Aliments*, Paris, **10**(3): 679- 95, 1990.
- BHARGAVA, J.N.; SHARMA, J.P.; SHARMA, Y.P. Influence of herbicides on the soil microflora in peach orchard. *The Punjab-Horticultural-Journal*, Patiala, **28**: 69- 72, 1988.
- BLOCK, de M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELÉ, V.; RAO MOVVA, N.; THOMPSON, C. ; van MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *The Embo Journal*, Eynsham, **6**(9): 2513- 18, 1987.
- BRUMM, P. J. & R.E. HEBEDA. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. *Biotechnology Letters*, Kew, **10**(9): 677- 82, 1988.
- BRUSSLAN, J. & HASELKORN, R. Resistance to the photosystem II herbicide diuron is dominant to sensitivity in the *Cyanobacterium synechococcus sp.* *Embo Journal*, Eynsham, **8**(4): 1237- 45, 1989.
- CABRAS, P.; MELONI, M.; PIRISI, F.M.; FARRIS, G.A.; FATICHENTI, F. Yeast and pesticide interaction during aerobic fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, **29**: 298- 301, 1988.

- CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M.N. Kinetics of volatiles metabolites during alcoholic fermentation of cane molases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Bioengineering*, Berlin, **35**: 450- 54, 1991.
- CALVAYRAC, R.; BOMSEL, J.L.; MARTIN, D.L. Analysis and characterization of 3, (3,4 diclorofenil), 1-1 dimetil ureia (DCMV) - resistant *Euglena*. *Plant Physiology*, Rockville, **63**: 857- 65, 1979.
- CASALE, W.L. & HART, L.P. Influence of four herbicide on carpogenic germination and apothecium development of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, **76**(10): 980- 4, 1986.
- CHALEFF, R.S. & MAUVAIS, C.J. Acetolactate Synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicide in higher plants. *Science*, Washington, **224**: 1443- 5, 1984.
- CLARK, T.A. & MACKIE, K.L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, London, **34b**: 101-10, 1984.
- CERVELLI, S.; NANNIPIERI, P.; SEQUI, P. Interactions between agrochemicals and soil enzymes. In: BURNS, R.G. ed. *Soil enzymes*. New York, Academic Press, 1978. 293p.
- COMAI, L.; SEN, L.C.; STALKER, D.M. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. *Science*, Washington, **221**: 370- 1, 1983.
- CONCLETON, W.F.; VANCANTFORT, A.M.; LIGNOWSKI, E.M. Imazaquim (Scepter): a new soybean herbicide. *Weed Tecnology*, Champaign, **1**(2): 186- 8. 1987.
- COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J.N. et al., *The molecular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae; Metabolism and expression*. New York, Cold Spring Harbour, 1982. p39- 99.

- COOTE, N. & KIRSOP, B.H. The content of some organic acids in beer and other fermented media. *Journal of Institute of Brewing*, London, **80**: 474- 83, 1974.
- CORRUZI, G. M. Molecular approaches to the study of amino acid biosynthesis in plants. *Plant Science*, Lucknow, **74**: 158- 61, 1991.
- CURL, E.A. & RODRIGUEZ-KABÁNA, R. Efecto de los herbicidas diuron, fluometuron, paraquat, prometryne y trifluralin en la produccion de esclerocios por el *Sclerotium rolfsii* y el *Sclerotinia trifoliorum*. *Sepeparata Review Phytopatology*, St. Paul, **5**: 10-4, 1972.
- CURL, E.A.; RODRIGUEZ-KABÁNA, R.; FUNDERBURK, H.H Jr. Influence of atrazine and varied carbon and nitrogen amendmets on growth of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, **58**: 323- 8, 1968.
- DAVIS, D.E.; PILLAI, C.G.P.; TRUELOVE, B. Effects of prometryn, diuron, fluometuron and M.S.M.A on *Chlorella* and two fungy. *Weed Science*, Champaign, **24**(6): 587-93, 1976.
- DEYSSON, G. Research of microtubular inhibitors. *European Journal of Toxicology and Enviromental Hygiene*, Paris, **9**(5): 259- 70, 1976.
- DIERSSEN, G.A.; HOLTEGAARD, K.; JENSEN, B.; ROSEN, K. Volatile carboxylic acids in molasses and their inhibitors action on fermentation. *International Sugar Journal*, London, **58**: 35- 9, 1956.
- DODGE , A.D. The mode of action of herbicides. In: HUTSON, D.H.; ROBERTS, T.R. eds. *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, New York, John Wiley & Sons, 1983. vol.3. p 163- 7.
- DRYSDALE, G.S. & FLEET, G.A. The effect of acetic bacterial upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *The Journal of Applied Bacteriology*, London, **64**: 471- 81, 1989.

- DROZDOWICZ, A. Os herbicidas e os microrganismos. **Reviews Microbiological**, Washington, 2(1): 43- 61, 1971.
- DURO, A.F. & SERRANO, R. Inhibition of succinate production during yeast fermentation by deenergization of the plasma membrane. **Current Microbiology**, New york, 6: 111- 3, 1981.
- ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A.; GOMES, L.H.; BOSCARIOL, F.C. inhibition of yeast growth by herbicides. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 43(6): 457- 9, 1991.
- FALCO, S.C. & DUMAS, K.S. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. **Genetics**, Rockville, 109: 31- 5, 1985.
- FEDTKE, C. Modes of herbicides action as determined with *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coulter Counting*. **ACS Symposium Series**, Leverkusen, 181, 1982.
- FOURNIER, J.C.; CODACCIONI, P.; SOULAS, G. Soil adaptation in relation to the application rates and the metabolic behavior of the degrading microflora. **Chemosphere**, Oxford, 10(8): 977- 84, 1981.
- FOURNIER, J.C. & CATROUX, G. General data on the microbial degradation of pesticides in soil. **Travaux de la Societe de Pharmacie de Montpellier**, Montpellier, 41(1-2): 35- 43, 1982.
- FRAENKEL, D.G. Carboydrate metabolism. In: STRATHERN, J. et al., eds. **Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces***. New York, Cold Spring Harbor, 1982. 660 p.
- FRANKENBERGER, W.T.Jr. & TABATABAI, M.A. Factores affecting L-asparaginase activity in soils. **Biology and Fertility of soils**, Berlin, 11 (1): 1- 5, 1990.

FREITAS-VALLE, A.B.; MENEZES, R.R.; PANEK, A.D.; MATTON, J.R. Relationship between succinate excretion and cytochrome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & molecular Biology*, Elmsford, 27(5): 467- 71, 1981.

FRIEDBERG, D. & SEIJFFERS, J. Molecular characterization of genes coding for wild-type and aulfonylurea-resistant acetolactate synthase in the cyanobacterium *Synechococcus* PPC7942. *Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, 45c: 538- 43, 1990.

FUHRMANN, G.F. & ROTHSTEIN, A. The mechanism of the practical inhibition of fermentation in yeast by nickel ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 163: 331- 8, 1968.

GAI, F. Os antissépticos na fermentação alcoólica. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*, Rio de Janeiro, 8 (4): 377- 82, 1945.

GAO, C. & FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology*, Baltimore, 65: 405- 9, 1988.

GLACET, A.; LEVEQUE, F.; VILLA, P. Kinetic study of nitrite inhibition during alcoholic fermentation of beet molasses. *Biotechnology Letters*, Kew, 7(1): 47- 52, 1985a.

GLACET, A.; LETOURNEAU, F.; LEVEQUE, P.; VILLA, P. Kinetic study of sulfite ion inhibition during alcoholic fermentation of beet molasses. *Bioscience*, Washington, 4(1): 16- 19. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 103: 36142g, 1985b.

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206 p. (Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- GRESSHOFF, P.M. Growth inhibition by glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. **Australian Journal Plant Physiology**, East Melbourne, **6**:177- 85, 1979.
- GROSSBARD, E. Effects on the soil microflora. In: AUDUS, L.J. **Herbicides: physiology, biochemistry, ecology**. 2 ed, New York, Academic Press, 1976. v.2, p99-147.
- GROSSBARD, E. Effects of glyphosate on the microflora: with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. In: GROSSBARD, E. & ATKINSON, D. ed. **The herbicide glyphosate**. New York, Academic Press, 1985. p159- 85.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **45**(2): 359- 68, 1988a.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **45**(2): 369-79, 1988b.
- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160 p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GUTIERREZ, L.E. Composição de ácidos graxos e viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, **9**(6): 31- 4, 1991a.
- GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **48**: 55- 69, 1991b.

GUTIERREZ, L.E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. *Scientia Agricola.*, Piracicaba, 50(3): 464- 72, 1993.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L. & LEITE DA SILVA, S.B. Aumento da produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar pela adição de benzoato. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 48: 1- 21, 1991a.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 34:(2): 235- 42. 1991b.

GUTIERREZ, L.E. & De MARTIN, V.F. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 48: 41- 4, 1991.

HARMS, C.T.; MONTOYA, A.L.; PRIVALLE, L.S.; BRIGGS, R.W. Genetic and biochemical characterization of corn inbred lines tolerant to the sulphonylurea herbicide primisulfuron. *Theoretical Applied Genetic*, Berlin, 80: 353- 8, 1990.

HARRIS, G. In: Cook, A.H. *The Chemistry & Biology of Yeasts*. New York, Academic Press, 1958. cap. 9.

HARRISON, J.S. & GRAHAM, J.C.J. Yeast in distillery practice. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., eds. *The yeasts*. New York, Academic Press, 1970. vol. 3, cap. 6, p. 283-348.

HEALEY K.W. & CARNEVALE, J. Determination of volatile fatty acids in molasses by gas-liquid chromatography of their benzyl esters. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Oregon, 32(6): 1363-71, 1984.

- HEERDE, E. & RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, Berlin, **117**: 269, 1978.
- HERRAIZ, T. Production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation of grape must in presence or absence SO₂. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, Brussels, **45**(2): 57- 62, 1990.
- HINZE, H.B. & HOLZER, H. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of Microbiology*, Berlin, **145**: 27- 31, 1986.
- HOLLÄNDER, H. & AMRHEIN, N. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. *Plant Physiology*, Rockville, **66**: 823- 9, 1980.
- INGRAHAM, J.L. & GUYMON, J. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, **88**: 157- 66, 1960.
- JAWORSKI, E.G. Analysis of the mode action of herbicidal α -chloroacetamides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Oregon, **17**(2): 165- 70, 1969.
- JAWORSKI, E.G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, Oregon, **20**(6): 1195- 98, 1972.
- JIM, R.K & SANTO, L.T. Herbicides to control *haole koa* in sugarcane. *Hawaiian Sugar Technologists*, Hawai, p.A44- 5, 1990.
- JONES, G.E. & MORTIMER, R.K. Biochemical properties of yeast L-asparaginase. *Biochemistry Genetics*, New York, **9**(2): 131- 46, 1973.

- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast: The effect of enviromental and other variables. **Process Biochemistry**, London, **16**: 42- 9, 1981.
- KANDRA, L. & WAGNER, G. Chlorsulfuron modifies biosynthesis of acyl acid substituents of sucrose esters secreted by tobacco trichomes. **Plant Physiology**, Rockville, **94**: 906-12, 1990.
- KAUFMAN, D.D. & KEARNEY, P. Microbial degradation of s-triazine herbicides. **Residue Review.**, New York, **32**: 235- 65, 1970.
- KEARNEY, P.C. Symposium on mode de action of herbicides- Pesticide investigations- behavior in soil. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Oregon, **17**(2): 165, 1969.
- KENYON, C.P.; PRIOR, B.A.; Van VUURENH, .J.J. Water relation of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. **Enzyme and Microbiology and Technology**, Guildford, **8**: 461-4, 1986.
- LaROSSA, R.A. & FALCO, S.C. Amino acid biosynthetic enzymes as targets of herbicide action. **Trends Biotechnology**, London, **2**: 158- 62, 1984.
- LaROSSA, R.A. & SCHLOSS. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Samonella typhimurium*. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, **259**: 8753- 7, 1984.
- LIU, L.C.; CIBES-VIADÉ, H.; KOO, F.K.S. Adsorption of ametryne and diuron by soils **Weed Science**, Champain, **18** (4): 470- 4, 1972.
- MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengeneering**, New York, **25**: 103- 21, 1983.

- MANN, J.D.; JORDAN, L.S.; DAY, B.E. The effects of carbamate herbicides on polymer synthesis. *Weeds, Champaign*, **13**: 63- 6, 1965.
- MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeast by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **55** (3): 453-60, 1983.
- MORELAND, D.E & HILTON, J.L. Actions on photosynthetic systems. In: AUDUS, L.J. *Herbicides: physiology, biochemistry, ecology*. New York, Academic Press, 1976. v.1, cap16, p493- 21.
- NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. *The Journal of Institute of Brewing*, London, **67**: 173- 81, 1962.
- NORDSTRÖM, K. & CARLSSON, B.O. Yeast growth and formation of fusel alcohols. *The Journal of the Institute of Brewing*, London, **71**: 171- 4, 1965.
- NORDSTRÖM, K. Yeast growth and glycerol formation. *Acta Chemica Scandinava*, Copenhagen, **20**(4): 1016- 25, 1966.
- OLIVEIRA, J.S. Reduction of the amount of nucleic acids in the yeast *Candida utilis*. *Industries Alimentaires et Agricoles*, Paris, **93**: 689- 93, 1976.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, London, **12**: 19- 35, 1977.
- PAES, F.A. *Compêndio de defensivos agrícolas- Guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*. 3 ed. São Paulo, Organização Andrei, 1990. 478 p.
- PAMPULHA, M.E.F.S. & LOUREIRO-DIAS, M.C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermentation yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, **31**:547- 50, 1989.

- PERCICH, J.A. & LOCKWOOD, J.L. Interaction of atrazine with soil microorganisms: Population changes and accumulation. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, **24**:1145- 52, 1978.
- PINTO, L.; CARDOSO, H.; LEÃO, C.; van UDEN, N. High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. **Biothecnology and Bioengeneering**, New York, **33**: 1350- 2, 1989.
- POPE, P.E. & HOLT, H.A. Paraquat influences development and efficacy of the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, **59**(4): 518- 21, 1981.
- RAMOS, M.T. & MADEIRA-LOPES, A. Effects of acetic acid on temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Kew, **12**(3): 229- 34, 1990.
- RANKINE, B.C. Influence of yeast strain and pH on pyruvic acid content of wines, **Journal of Science Food and Agriculture**, London, **18**: 41- 4, 1967.
- RAY, T.B. Site of action of chorsulfuron: innhibiton of valine and isoleucine byosynthesis in plants. **Plant Phisology**, Rockville, **75**: 827- 31, 1984.
- RICHARDSON, L.T. Effects of atrazine on growth response of soil fungi. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, **50**: 594- 6, 1970.
- RIES, S.K. Subtoxic effects on plants. In: AUDUS, L.J. **Herbicides: physiology, biochemistry, ecology**. 2ed. New York, Academic Press, 1976. v2, cap11. p313- 45.
- RIZZON, L.A. Composição química dos vinhos da microregião homogênea viniculturora de Caxias do Sul (MHR 311) - Compostos voláteis. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Bento Gonçalves, **5**: 1-4. 1987.

- ROISH, U. & LIGENS, F. The mechanism of action of the herbicide N- (phosphonomethyl)glycine. Effect on the growth and the enzymes of aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Hoppe-seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, Tübinger*, **361**(7): 1049- 58, 1980.
- RUBIN, J.L.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Enzymological basis herbicidal action of glyphosate. *Plant Physiology, Rockville*, **70**: 833- 9, 1982.
- RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal Agricultural Food Chemistry, St. Louis*, **25**(3): 517- 28, 1977.
- SAMSON, F.E.; KATZ, A.M.; HARRIS, D.L. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeast metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics, New York*, **54**: 406- 23, 1955.
- SANCHEZ, B. & BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbiology Technology, Stoneham*, **10**: 315- 8, 1988.
- SAXENA, P.K. & KING, J. Herbicide resistance in *Datura innoxia*, *Plant Physiology, Rockville*, **96**: 863- 7, 1988.
- SCHMITZER, P.R.; EILERS, R.J.; CSÉKE, C. Lack of cross-resistance of imazaquin-resistant *Xanthium strumarium* acetolactate synthase to fluometsulam and chlorimuron. *Plant Physiology, Rockville*, **103**(1): 281- 3, 1993.
- SHANER, D.L.; ANDERSON, P.C.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones, potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology, Rockville*, **76**: 545- 6, 1984.

- SHIMABUKURO, R.H., FREAR, D.S. SWANSON, H.R.; WALSH, W.C. Glutathione conjugation. Enzymic basis for atrazine resistance in corn. **Plant Physiology**, Rockville, 47: 10- 4, 1971.
- STEVENICK, J. van. The influence of nickelous ion on carbohydrate transport in yeast cells. **Biochemical and Biophysica Acta**, New York, 126(1): 154- 62, 1966.
- STOPPANI, A.O.M.; FAVELUKES, S.L.S.; CONCHES, L. Formation of succinic acid in baker's yeast through the citric acid cycle. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, New York, 75: 453- 64, 1958.
- SUMER, J.B. & SOMERS, G.E. **Chemistry and methods of enzymes**. New York, Academic Press, 1947. 415p.
- SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. **The Journal of Institute of Brewing**, London, 7: 164- 77, 1971.
- SUOMALAINEN, H. & KERANEN, A.J.A. Valine, leucine and isoleucine as precussors of branched fatty acids in yeast. **Suomen Kemistilehti**, Helsinki, B 40: 288- 9, 1967.
- TU, C.M. & BOLLEN, W.B. Effect of paraquat on microbial activities in soils. **Weed Research**, 8(1): 28- 37, 1968.
- TWEEDY, B.G. & LOEPPKY, C. The use of ¹⁴C-labeled glusose, glucuronate, and acetate to study the effect of atrazine, simazine, and fluometuron on glucose catabolism in selected plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, St. Paul, 58: 1522- 31, 1968.
- UMBAGER, H.E. The biosynthesis of isoleucine and valine and its regulation. In: Herman, K.K. & Somerville, R.L., eds. **Amino acids: biosynthesis and genetic regulation**, London, Addison-Wesley, 1983. p. 245.

VOLLBRECHT, D. & RADLER, F. Formation of higher alcohols by amino acid auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Conversion of amino acids to higher alcohols. **Archives of Microbiology**, Berlin, **94**(4): 351- 8, 1974.

WRISTON, J.C. L-Asparaginase. In: BOYER, P.D. ed. **The enzymes**. New York, Academic Press, 1971. p.101- 21.

WRITTING, G.C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **82**: 84- 92, 1976.

YADAV, N., McDEVITT, R.E.; BENARD, S.; FALCO, S.C. Single amino acid substitutions in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, **83**: 4418- 22, 1986.

ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba 1982. 125 p. (Doutoramento- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

ZAGO, E.A.; AMORIM, H.V; BASSO, L.C.; GUTIERREZ, L.E.; OLIVEIRA, J.A. Métodos analíticos para o controle de produção de álcool. Piracicaba, Fermentec-CEBTEC-ESALQ/USP. 1989, 144p.

ANEXO
LISTA DE FIGURAS

Figura 2: Perfil cromatográfico dos álcoois superiores presentes nos meios de fermentação. 1 = etanol, 2 = n-propílico, 3 = isobutílico, 4 = desconhecido (somente para as amostras contendo Metisulfuron), e 5 = isoamílico.

	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Controle	A1	A14	A25	A16	B1	B14	B25	B16
Metisulfuron	A26	A28	A11	A20	B26	B28	B11	B20
2,4-D	A18	A4	A7	A8	B18	B4	B7	B8
Diuron	A3	A12	A15	A17	B3	B12	B15	B17
Metolachlor	A19	A18	A2	A9	B19	B18	B2	B9
Triclopyr	A24	A5	A22	A21	B24	B5	B22	B21
Glyphosate	A13	A6	A27	A23	B13	B6	B27	B23
Controle	C1	C14	C25	C16	D1	D14	D25	D16
Metisulfuron	C26	C28	C11	C20	D26	D28	D11	D20
2,4-D	C18	C4	C7	C8	D18	D4	D7	D8
Diuron	C3	C12	C15	C17	D3	D12	D15	D17
Metolachlor	C19	C18	C2	C9	D19	D18	D2	D9
Triclopyr	C24	C5	C22	C21	D24	D5	D22	D21
Glyphosate	C13	C6	C27	C23	D13	D6	D27	D23

Tratamentos- Controle, Metisulfuron, 2,4-D, Diuron, Metolachlor, Triclopyr, Glyphosate; Blocos: A (MS - 12% de sacarose), B (MX - 13,5 % de ART), C (MS. - 16 % de sacarose) e D (MX - 17,5 % de ART), Repetições: R1 a R4, Amostras: 1 a 28.

Figura 3: Croqui do experimento.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Meio Sintético básico (MS):

COMPONENTES	G / LITRO	
Sacarose	120,00	160,00
K ₂ HPO ₄	0,50	0,50
MgSO ₄	0,50	0,50
CaCl ₂ . H ₂ O	0,10	0,10
Ácido cítrico	4,00	4,00
Extrato de Levedura	3,00	3,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50	0,50

O pH foi corrigido para 4,0 com solução do KOH 5N.

Quadro 2: Meio Xarope básico (MX):

Composto	Local	% ART* Inicial	% ART* Final	BRIX Vol.
Xarope	Usina Sto Antonio	58	≅12 ou ≅16	70

* O ART (açúcares redutores totais) foi corrigido conforme o método de Somogyi e Nelson e o pH foi acertado para 4,0 com solução do H₂ SO₄ 2N.

Quadro 3: Características dos herbicidas utilizados nos ensaios.

Ingrediente ativo- I.A *	Nome Comercial*	Nome Oficial*	Fabricante	Conc. (g/L)	Conc. I.A. (ppm)	Principais Culturas*
Metisulfuron	Ally®	metil 2-[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il]amino] carbonil]-amino]sulfonil] benzoato	Dupont	600	60	Trigo
2,4- D	2,4- D®	ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Dow Elanco	670	67	Pastagens, cana-de-açúcar, etc
Diuron	Karmex®	3-(3,4 diclorofenil)-1,1-dimetiluréia	Dupont	500	50	Café, cana de açúcar, algodão, citrus, soja, abacaxi, etc
Metolachlor	Dual®	2-etil-6-metil-N-(1-metil-2-metoxietil)	Ciba Geigy Química SA.	960	96	Cana de açúcar, feijão, milho e, soja.
Triclopyr	Garlon®	ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloacético	Dow Elanco	480	48	Pastagens
Atrazine	Gesaprin®	2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamino-s-triazina	Ciba Geigy Química SA.	500	50	Abacaxi, milho, cana de açúcar e sorgo
Paraquat	Gramoxone®	1,1'-dimetil-4,4-bipiridílio fon dicloreto	ICI do Brasil - SA.	200	20	Café, cana de açúcar, milho, etc
Alachlor	Laço®	2-cloro-2',6'-dietil-N-(metoximetil)	Monsanto do Brasil - SA.	480	48	soja e milho
Glyphosate	Roundup®	(n-[fosfonometil]glicina)	Monsanto do Brasil - SA.	480	48	café, cana de açúcar, arroz, citrus, milho, etc

* PAES, F.A. **Compêndio de defensivos agrícolas- Guia Prático de produtos fitossanitários para uso agrícola.** 3ed. São Paulo, Organização Andrei, 1990. 478p.