**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias
contaminantes da fermentação etanólica**

Ellen Karine Diniz Viégas

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

Ellen Karine Diniz Viégas
Engenheira Agrônoma

**Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias
contaminantes da fermentação etanólica**

Orientadora:
Prof^a. Dra. **SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI BRAZACA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência e *Tecnologia*
de Alimentos

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Viégas, Ellen Karine Diniz
Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da
fermentação etanólica / Ellen Karine Diniz Viégas. - - Piracicaba, 2011.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Agentes antimicrobianos 2. Bactérias 3. Contaminação 4. Etanol 5. Fermentação
alcoólica 6. Própolis I. Título

CDD 663.13
V656p

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A minha mãe, *Selma*, a minha avó *Raimunda* e minha tia **Celsa**, pelo amor,
carinho, dedicação, incentivo e valiosos ensinamentos.

DEDICO

À **DEUS**, pela vida, por agradecer-me com saúde, paz, uma família maravilhosa e
permitindo-me alcançar mais uma vitória.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Maranhão - FAPEMA, pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Prof.^a Dra Sandra Helena da Cruz, por sua amizade e confiança que possibilitaram a oportunidade de iniciar este trabalho; pela compreensão durante todos os momentos e pelo incentivo e apoio nas dificuldades.

À meus tios Edvaldo Diniz, Marinilde Diniz, Maria das Graças, Ribamar, José de Ribamar (*in memoriam*) e ao meu avó Augusto Diniz (*in memoriam*) pelo carinho e companheirismo.

Ao Marcos Costa pela paciência, carinho e amor; por ser especial em minha vida.

Ao Prof. Dr. Urgel Lima pelos valiosos conselhos, ajuda incondicional e incentivo.

Aos professores André Alcarde e Solange Brazaca pelas sugestões e apoio.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela formação profissional.

Aos técnicos do laboratório do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição do Setor de Açúcar e Alcool Rosemary, Sylvino e Pedro pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

À bibliotecária Beatriz Helena Giongo pelo auxílio na correção e organização das referências bibliográficas.

Aos amigos da pós-graduação Aline Zampar, Letícia Abreu, Bruno Monteiro, Vivian Pietrobon, Laise Wadt, André Belluco, Beatriz Meduri por terem tornado minha estadia muito mais agradável.

Aos amigos de vida Michelle Maia, Viviane Araújo, Joana Ramirez por dividirem não só uma casa, mas por terem ajudado a formar um lar.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RECOMEÇAR

(Carlos Drummond de Andrade)

*Não importa onde você parou,
em que momento da vida você cansou,
o que importa é que sempre é possível
e necessário "Recomeçar".*

*Recomeçar é dar uma nova
chance a si mesmo.
É renovar as esperanças na vida
e o mais importante:
acreditar em você de novo.*

*Sofreu muito nesse período?
Foi aprendizado.*

*Chorou muito?
Foi limpeza da alma.*

*Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia.*

*Sentiu-se só por diversas vezes?
É por que fechaste a porta até para os anjos.*

*Acreditou que tudo estava perdido?
Era o início da tua melhora.*

*Pois é!
Agora é hora de iniciar,
de pensar na luz,
de encontrar prazer nas coisas simples de novo.*

*Que tal um novo emprego?
Uma nova profissão?
Um corte de cabelo arrojado, diferente?
Um novo curso,
ou aquele velho desejo de aprender a pintar,
desenhar,
dominar o computador,
ou qualquer outra coisa?*

*Olha quanto desafio.
Quanta coisa nova nesse mundão
de meu Deus te esperando.*

*Tá se sentindo sozinho?
Besteira!
Tem tanta gente que você afastou
com o seu "período de isolamento",
tem tanta gente esperando apenas um sorriso
teu para "chegar" perto de você.*

*Quando nos trancamos na tristeza nem
nós mesmos nos suportamos.
Ficamos homíveis.
O mau humor vai comendo nosso fígado,
até a boca ficar amarga.*

*Recomeçar!
Hoje é um bom dia para começar novos desafios.*

*Onde você quer chegar?
Ir alto.
Sonhe alto, queira o melhor do melhor,
queira coisas boas para a vida,
pensamentos assim trazem para nós aquilo que
desejamos.*

*Se pensamos pequeno,
coisas pequenas teremos.*

*Já se desejamos fortemente o melhor e
principalmente lutamos pelo melhor,
o melhor vai se instalar na nossa vida.*

E é hoje o dia da Faxina Mental.

*Joga fora tudo que te prende ao passado,
ao mundinho de coisas tristes,
fotos,
peças de roupa,
papel de bala,
ingressos de cinema,
bilhetes de viagens,
e toda aquela tranqueira que guardamos quando
nos julgamos apaixonados.
Jogue fora.
Mas, principalmente, esvazie seu coração.
Fique pronto para a vida, para um novo amor.*

*Lembre-se somos apaixonáveis,
somos sempre capazes de amar
muitas e muitas vezes.
Afinal de contas
nós somos o "Amor".*

*"Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não
do tamanho da minha altura."*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO.....	155
ABSTRACT	177
1 INTRODUÇÃO	199
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 O etanol como combustível	23
2.2 Matéria-prima	23
2.3 Etapas de produção	25
2.4 Fermentação	26
2.4.1 Fatores que afetam a fermentação.....	27
2.5 Controle da contaminação.....	31
2.6 Própolis	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Obtenção dos extratos	37
3.2 Compostos fenólicos totais (CFT)	39
3.3 Atividade Antimicrobiana	40
3.3.1 Bactérias.....	40
3.3.2 Teste de difusão em ágar.....	40
3.4 Fermentação	41
3.4.1 Preparo do caldo.....	41
3.4.2 Ensaio.....	41
3.4.3 Determinações físico-químicas e microbiológicas.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Análises do extrato	45
4.2 Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i>	45
4.3 Fermentação	52
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos no processo fermentativo.	56
5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de fluxo da produção de açúcar e bioetanol de cana	26
Figura 2 - Flocculação de leveduras por bactérias.....	31
Figura 3 - Estrutura planar e espacial do fenol	35
Figura 4 – Diagrama de Pareto para interação entre os fatores frente ao teor de CFT (mg/g)	47
Figura 5 – Curvas de contorno para a resposta compostos fenólicos totais (mg/g) em função da temperatura e tempo (A), da concentração de etanol e do tempo (B) e da temperatura e da concentração de etanol (C)	48
Figura 6 – Halos de inibição do Lactrol® 100 ppm sobre as bactérias (A), do etanol em diferentes concentrações sobre as bactérias e a levedura (B) e do extrato da própolis sobre <i>S. cerevisiae</i> (C), <i>Bacillus</i> (D) e <i>Lactobacillus</i> (E)	52
Figura 7 - Diagrama de Pareto para interação entre os fatores frente ao teor alcoólico (g/l)	54
Figura 8 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta teor alcoólico (g/L) em função da temperatura e da concentração de células de levedura (A), d teor de sólidos solúveis e da concentração de células de levedura (B) e da temperatura e teor de sólidos solúveis (C)	55
Figura 9 – Variações das determinações microbiológicas e de parâmetros fermentativos.....	58
Figura 10 – Flocculação na fermentação contaminada por <i>Lactobacillus fermentum</i>	59
Figura 11 – Variação da viabilidade celular inicial e final	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixa de estudo das variáveis independentes em análise no planejamento experimental fatorial do tipo 2^3	37
Tabela 2 – Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições de extração dos compostos bioativos obtidas no planejamento fatorial do tipo 2^3	39
Tabela 3 – Descrição dos grupos dos ensaios fermentativos	42
Tabela 4 - Valores utilizados no planejamento 2^3 completo nos respectivos níveis, para os parâmetros fermentativos variando a concentração de células, teor de sólidos solúveis (°Brix) e temperatura	42
Tabela 5 – Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições de extração dos compostos bioativos obtidas no planejamento fatorial do tipo 2^3	46
Tabela 6 – Médias das zonas de inibição (mm) de <i>L. fermentum</i> e <i>B. subtilis</i> frente ao extrato da própolis	51
Tabela 7 - Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições do processo fermentativo no planejamento fatorial do tipo 2^3	53
Tabela 8 - Parâmetros fermentativos observados ao termino da fermentação de caldo de cana seguindo delineamento fatorial	57

RESUMO

Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica

Os processos industriais de produção de álcool existentes no Brasil reutilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos. Paralelamente, o excedente produzido pela multiplicação das células de levedura durante esse processo é seco e comercializado, principalmente no mercado externo, como ingrediente para ração animal. As práticas usualmente utilizadas nas indústrias para reduzir a contaminação bacteriana são o tratamento ácido do creme de levedura e a aplicação de antibióticos. Porém, desde que foram detectados altos níveis de resíduos de antibióticos na levedura destinada à ração animal, seu uso tem sido condenado pela comunidade internacional. Desde então as indústrias brasileiras têm buscado alternativas aos antibióticos para o controle da contaminação bacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da própolis sobre as bactérias do gênero *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis*, que são alguns dos contaminantes da fermentação alcoólica. O maior pico de produção de compostos fenólicos totais foi com uso de etanol 76% como solvente, à 58°C por 50 minutos, apresentando 68,95 mg de CFT/g de própolis e um halo de inibição de 6 e 5mm para *Bacillus* e *Lactobacillus*, respectivamente. As faixas das variáveis que maximizaram o teor alcoólico foi o processo fermentativo conduzido a 32°C, com 41 g de células de leveduras/L, em um meio contendo 18,5°Brix. Apesar do antimicrobiano comercial ter apresentado maior eficiência na redução da contaminação (94,46% e 97,40% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente), o extrato de própolis tem potencial para ser utilizado no controle dos contaminantes bacterianos presentes nas fermentações etanólicas, sendo responsável por redução de 54,24% e 67,02% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente.

Palavras-Chave: Fermentação, Contaminação bacteriana, Antimicrobianos naturais, Própolis

ABSTRACT

Bacterial properties of green propolis bacteria contaminants on the ethanol fermentation

The industrial processes of ethanol production in Brazil reuse yeast fermentation in consecutive cycles. In parallel, the surplus produced by the multiplication of yeast cells during this process is dried and sold, mainly in foreign markets as an ingredient for animal feed. The practices commonly used in industry to reduce bacterial contamination are the acid treatment of the yeast cream and the application of antibiotics. However, since they were detected high levels of antibiotic residues in yeast destined for animal feed, its use has been condemned by the international community. Since then Brazilian industries have sought alternatives to antibiotics to control bacterial contamination. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the extract of propolis on bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bacillus*, which are some of the contaminants of fermentation. The highest peak production of phenolic compounds was using 76% ethanol as solvent at 58°C for 50 minutes, with 68,95 mg of CFT/g of propolis and a halo of inhibition of 6 and 5mm for *Bacillus* and *Lactobacillus*, respectively. The ranges of variables that maximized the alcoholic fermentation was conducted at 32°C with 41g of yeast cells/L in media containing a 18,5°Brix. Despite having larger commercial antimicrobial effectiveness in reducing contamination (94,46% and 97,40% for *Lactobacillus* and *Bacillus*, respectively), the extract of propolis has potential to be used in the control of bacterial contaminants present in the ethanolic fermentation, and responsible for reduction of 54,24% and 67,02% for *Lactobacillus* and *Bacillus*, respectively.

Keywords: Fermentation, Bacterial contamination, Natural antimicrobial, Propolis

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é pioneiro no uso do etanol como energia renovável; desenvolveu tecnologias eficientes para obter álcool em grande escala, com baixo custo e emprego de matéria-prima de grande potencial energético (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). A agroindústria do álcool representa considerável gerador econômico, sendo de suma importância para o país, que é o primeiro a desenvolver um programa de combustível alternativo em substituição à gasolina, e o maior produtor de cachaça. Como toda a produção de álcool e de cachaça ocorre por via fermentativa, é fundamental o conhecimento do processo que tem sido constantemente aprimorado (NOBRE, 2005). Para maior eficiência do processo, tecnologias são constantemente pesquisadas e desenvolvidas em universidades e no setor privado. No caso do etanol um importante parâmetro a ser controlado é a fermentação; para isso necessita-se de ambiente e meio de fermentação assépticos utilizando apenas os microrganismos desejáveis responsáveis pela maior eficiência fermentativa (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

O processo de produção do etanol utilizado no Brasil envolve o reciclo das leveduras, que provoca também o reciclo de contaminantes, provocando problemas tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido a toxinas lançadas no meio pelo contaminante (ALTHERTUM et al., 1984), fermentações secundárias oriundas da atividade desses microrganismos contaminantes, além do problema de floculação das células de levedura provocada principalmente por bactérias (BOVI; MARQUES, 1983). A origem da contaminação microbiológica pode ser proveniente da cana-de-açúcar (bainha e colmo), sujidades vindas do campo ou mesmo proveniente de equipamentos e utensílios mal higienizados utilizados no processo (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Alguns trabalhos identificaram e tornaram evidente a predominância de bactérias Gram-positivas e em formas de bastonetes no processo de fermentação alcoólica, com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, sendo as espécies *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis* as causadoras da queda da viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo misto, devido a acidez do meio (CHERUBIN, 2003; NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007). O setor alcooleiro ainda possui etapas

rudimentares de produção, deixando passar contaminantes que prejudicam a fermentação. É de grande importância o controle microbiológico do caldo de cana a ser fermentado, para garantir alto rendimento de etanol. Eficiência de higienização da linha de produção e esterilização do caldo na etapa de clarificação deixaria para trás grande parte dessa carga microbiana. Os contaminantes microbiológicos diminuem a eficiência fermentativa, sendo responsáveis pela morte celular, consumo de açúcar, consumo de álcool produzido, perdas de células no fundo das dornas e formação de gomas (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

As práticas usualmente utilizadas nas indústrias para reduzir a contaminação bacteriana são o tratamento ácido do creme de levedura e a aplicação de antibióticos durante a fermentação (CHERUBIN, 2003). Métodos para conter ou inibir contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas utilizando bactericidas foram estudados por Aquarone et al (1975) e Yokoya (1991); eles concluíram que antibióticos agindo sozinhos ou associados com outros são eficientes para reduzir a carga bacteriana no caldo e mosto. No entanto, os antissépticos não devem ser usados de forma indiscriminada, há restrições, devido à possibilidade de deixar resíduos nos destilados, a exemplo do pentaclorofenol usado durante alguns anos nas proporções de 10 a 50ppm, e hoje é proibido (LIMA, 2001).

Uma solução para reduzir ou mesmo eliminar o resíduo de antibióticos nos destilados e nas leveduras é o uso de bactericidas naturais que não deixam resíduos no processo. Esses compostos bioativos com função antimicrobiana além de isentar resíduo de antibióticos ou produtos químicos, não geram resistência às bactérias, não afetam a levedura. Geralmente, é utilizado um único produto, podendo reduzir o consumo de ácido sulfúrico. A toxicidade apresentada pelos antimicrobianos naturais sobre alguns microrganismos pode ser atribuída à alta complexidade de sua fórmula química. Os grupamentos alcoóis, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos podem explicar sua ação bacteriostática e/ou bactericida (NOVACOSK; TORRES, 2006).

Apesar da carência de estudos sobre a viabilidade do aproveitamento de resíduos agroindustriais, os possíveis produtos naturais extraídos deles tornam-se importantes, pois os mercados consumidores estão buscando aditivos naturais com propriedades

antioxidante e antimicrobiana que possuam um efeito igual ou superior aos artificiais (CASTILLO, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da própolis sobre as bactérias do gênero *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis*, que são alguns dos contaminantes da fermentação alcoólica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O etanol como combustível

Os biocombustíveis têm sido objeto de crescente interesse nos últimos anos, uma vez que sua utilização contribui para reduzir a emissão de gases ligados ao efeito estufa e, portanto, para suavizar o aquecimento global (MILANEZ et al., 2010). A indústria de cana-de-açúcar é de longa data um dos esteios da economia brasileira. A partir da introdução das primeiras mudas no país em 1532, por mais de dois séculos o açúcar foi o principal produto brasileiro. Há cerca de 40 anos, teve início a transformação do setor, pois além do açúcar as usinas passaram a ter foco na produção do etanol (NEVES et al., 2010). O Brasil foi pioneiro no uso de energias renováveis proveniente da cana-de-açúcar, e devido à crise do petróleo na década de 70, implantou o Programa Nacional de Álcool (PROÁLCOOL), para estruturar o sistema de produção e uso de etanol (NOBRE, 2005).

O álcool é utilizado em mistura com gasolina no Brasil, EUA, México, Índia, Argentina, Colômbia e no Japão (ÁLCOOL-ETANOL BRASILEIRO, 2006). O etanol é miscível com gasolina e com água, e é comercializado no Brasil como álcool etílico anidro carburante (Aeac), ou como álcool etílico hidratado carburante (Aehc) contendo de 5 a 6% em volume de água. O Aeac é misturado à gasolina A, em um teor que pode variar de 20% a 25% $\pm$ 1% em volume, para formar a gasolina C que é comercializada nos postos (NIGRO; SZWARC, 2010).

2.2 Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas para obtenção de biocombustíveis são variadas: cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo, mandioca e beterraba. Os EUA são os maiores produtores e consumidores de etanol no mundo. Mas, ao contrário do Brasil, onde o etanol utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima, na América do Norte a produção de combustíveis renováveis vem do milho. Comparando a eficiência energética dos dois, o

brasileiro é superior ao americano, pois requer consumo muito baixo de energia fóssil para ser fabricado. O balanço energético do etanol brasileiro é quase cinco vezes superior ao produzido de milho (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2009).

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana. Todos esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO - BNDES, 2008). É cultivada em mais de cem países. Entre as culturas comerciais, é a que conseguiu desenvolver mais eficientemente o mecanismo fotossintético, o qual lhe permite fixar a energia solar e transformá-la em massa verde (TAUPIER, 1999).

O clima ótimo para o cultivo da cana é o que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento (formação de brotos) e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e o acúmulo de sacarose nos colmos. O ciclo completo da cana-de-açúcar é variável, dependendo do clima local, de variedades e práticas culturais. No Brasil, o ciclo é, geralmente, de seis anos, dentro do qual ocorrem cinco cortes, quatro tratos de soqueira e uma reforma. O primeiro corte é feito 12 ou 18 meses após plantio (dependendo da época de plantio), quando se colhe a cana-planta (BNDES, 2008).

A cana-de-açúcar pode conter 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose 0,6% de frutose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos. O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar encerra entre 78 e 86% de água, 10 e 20% de sacarose, 0,1 e 2% de açúcares redutores, 0,3 e 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1,0% de compostos nitrogenados. O pH do caldo varia entre 5,2 e 6,8. A proporção de caldo produzido pela moagem varia de 50 a 100% de peso da cana, isto é, uma tonelada produz de 500 a 1000 litros de caldo; comumente admite-se a média de 850 litros (LIMA et al., 2001).

A projeção para safra 2011/2012 na região centro-sul aponta uma moagem de 568,5 milhões de toneladas, crescimento de 2,11% em relação ao total processado na última safra, que foi de 556,74 milhões de toneladas (UNICA, 2011).

2.3 Etapas de produção

A execução das operações unitárias (etapas) para a produção do etanol é diferenciada de produtor para produtor, mas de modo geral são similares. Estando no estado de maturação adequado a cana é colhida e processada o mais rápido para que não ocorra degradação e perda de sacarose (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

Uma vez na usina, a cana é lavada (somente a cana inteira) para retirada das impurezas, tais como terra e areia, e segue para o sistema de preparo e extração, que no Brasil é baseado em moendas, montados em conjuntos com quatro a sete sucessivos ternos de moenda. No conjunto de rolos de moenda, o caldo, que contém a sacarose, é separado da fibra (bagaço), que segue para a planta de energia da usina, sendo usada como combustível. O caldo é inicialmente peneirado e tratado quimicamente, para coagulação, floculação e precipitação das impurezas, que são eliminadas por decantação. Uma vez tratado, o caldo é evaporado para ajustar sua concentração de açúcares e, eventualmente, é misturado com o melaço, dando origem ao mosto, uma solução açucarada e pronta para ser fermentada. O mosto segue para as dornas de fermentação, onde é adicionado com leveduras e fermentado por um período de 8 a 12 horas, dando origem ao vinho (mosto fermentado, com uma concentração de 7% a 10% de álcool). O processo de fermentação mais utilizado nas destilarias do Brasil é o Melle-Boinot, cuja característica principal é a recuperação das leveduras do vinho mediante sua centrifugação. Assim, após a fermentação, as leveduras são recuperadas e tratadas para novo uso, enquanto o vinho é enviado para as colunas de destilação (BNDES, 2008).

Figura 1 – Diagrama de fluxo da produção de açúcar e bioetanol de cana (Fonte: BNDES, 2008)

2.4 Fermentação

A fermentação é a transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono. Para que o processo fermentativo seja eficiente a temperatura deve permanecer próximo a 30° C e um ponto ótimo de pH entre 4 – 5 (POURQUIE; VANDECASTEELE, 1985).

Do ponto de vista econômico, as leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. As espécies mais usadas são as *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Tão logo se mistura o inóculo ao mosto corrigido, se inicia o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentescíveis nele contido. Apesar da dificuldade, pode-se distinguir os limites de separação entre as fases em uma fermentação alcoólica (LIMA et al, 1975):

- **Fase preliminar:** inicia-se no momento de contato do levedo com o mosto, caracterizando-se por multiplicação celular intensa, pequena elevação da temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono. Sua duração é de 4 a 6 hs;

- **Fase tumultuosa ou principal:** ocorre desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, rápida elevação da temperatura, redução da densidade do mosto, elevam-se a percentagem de álcool e a acidez e dura de 12 a 16 hs;
- **Fase complementar:** leva de 4 a 6 hs, caracterizando-se pela diminuição da intensidade do desprendimento de dióxido de carbono e diminuição da temperatura. Nesta fase, a concentração de açúcares chega ao fim.

Tendo por objetivo obter álcool na fermentação alcoólica, pode-se considerar como secundário qualquer outro produto originado durante o processo fermentativo, que podem se converter em subprodutos (ácido acético, ácido láctico, ácido butírico, ácidos graxos, furfural e outros), recuperando-se economicamente. Admitem-se como sendo produtos secundários, o dióxido de carbono, os alcoóis superiores, a glicerina, o ácido succínico e o aldeído acético (LIMA et al, 1975).

2.4.1 Fatores que afetam a fermentação

Os fatores que mais afetam a produção de etanol são: temperatura, concentração de etanol e substrato, pH, oxigênio, viabilidade e contaminação, que provoca o aumento da acidez e consumo de nutrientes.

a) Temperatura

A temperatura é um fator que afeta o desenvolvimento das leveduras por atuar principalmente sobre os processos bioquímicos. As leveduras, de modo geral, são menos resistentes a altas temperaturas que outros microrganismos, e isto se deve ao fato de a temperatura afetar a tolerância ao etanol presente no meio (TORIJA et al., 2003).

Em resposta a este tipo de estresse, as leveduras acionam mecanismos de defesa e liberam metabólitos que conferem tolerância ao etanol, como os compostos secundários, afetando de modo negativo o rendimento alcoólico. Como mostrado por Eleutherio et al. (1995), a produção de trealose é elevada durante o crescimento celular ao longo de mudanças da temperatura, como um mecanismo de resistência ao calor, ao aumento de etanol e tensão osmótica. A ação da trealose consiste em estabilizar a

membrana e proteger as células das leveduras frente aos efeitos do etanol (MAJARA et al., 1996).

Em estudo de Torija et al. (2003) revela que a viabilidade celular diminui com o aumento da temperatura, especialmente em 35°C e promove a maior formação de compostos secundários oriundos das próprias leveduras.

Além de dificultar o desenvolvimento das leveduras, altas temperaturas acabam estimulando o crescimento de bactérias lácticas termotolerantes, principais competidores das leveduras pelo substrato (BALAKUMAR et al., 2001).

A temperatura pode favorecer o potencial tóxico do etanol. No entanto, a potencialidade da temperatura pode ser diferente em decorrência da qualidade do mosto em que a levedura se desenvolve. Em estudo realizado por Morimura et al. (1997) mostrou que a variação da temperatura, de 30 para 35°C, durante a fermentação em caldo proporcionou queda no rendimento. Em contra partida, em trabalho realizado por Lalluce et al. (2002), com fermentação realizada a partir de mosto preparado com caldo de cana concentrado, mostrou que a viabilidade e o rendimento alcoólico foram maiores em temperatura de 35°C.

As temperaturas baixas reduzem o crescimento de bactérias acéticas e lácticas, facilitando o controle da fermentação alcoólica. Estas fermentações devem ser conduzidas em temperaturas acima de 15°C para se obter bons rendimentos (TORIJA et al., 2003). Embora altas temperaturas afetem o desenvolvimento de leveduras, processos fermentativos que ocorrem em temperaturas entre 34 a 40°C ou acima possuem a vantagem de proporcionar economia de custos do controle de refrigeração em destilarias de produção de etanol (LALLUCE et al., 1991).

b) Açúcar

O açúcar é o fator limitante dentro do rendimento alcoólico, pois é o substrato para a produção de etanol. Aumentando-se a concentração de açúcares, aumenta-se a produtividade do processo, porém um aumento muito elevado pode ocasionar estresse osmótico. Considera-se uma faixa ótima, que a concentração esteja entre 100 e 150 g/L de sacarose (LIMA et al., 2001).

O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células, devido a perturbações no gradiente

osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre exterior e o interior das células (MAGER; VARELA, 1993).

O trabalho realizado por Silva et al. (2008), aplicando um experimento fatorial completo com as variáveis independentes: Brix, concentração de fósforo e concentração de nitrogênio com o Brix variando de 10 a 20°, o melhor rendimento foi alcançado em 15°Brix, conseguindo otimizar a produtividade em 6,6 g/L.h⁻¹ e rendimento em 88%. No entanto, teores de 19 a 22°C são recomendados para se obter fermentação adequada.

Segundo Marques e Serra (2004), a cinética de fermentação é afetada pela concentração de açúcar no meio. O estudo comparou a cinética de fermentação através da avaliação da liberação de CO², mostrando que a fermentação em meio com 180g ART/L foi mais rápida que a de 310g ART/L, em oito ciclos de fermentação, apresentando o valor médio de 1,7g/h e 0,54g/h, respectivamente. Além disto, o autor cita que a concentração de etanol acima de 7,2% é suficiente para reduzir o crescimento celular e que a 11% chega a zero, com apenas liberação intracelular de etanol.

c) Contaminação

O caldo de cana é um ótimo meio de crescimento de microrganismos, por apresentar teores consideráveis de nutrientes, alta atividade de água e pH favorável. A origem da contaminação microbiológica pode ser proveniente da cana-de-açúcar (bainha e colmo), sujidades vindas do campo ou mesmo proveniente de equipamento e utensílios mal higienizados utilizados no processo. Estudos indicam que a maioria das bactérias contaminantes pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* (CARVALHO, 2001).

O fator marcante na contaminação é a competição pelo substrato e limitação do desenvolvimento da levedura. Segundo Nobre (2007), os metabólitos gerados pelas bactérias não são suficientes para reduzir a percentagem de células vivas de *S. cerevisiae*, sendo, portanto um conjunto de fatores que limitam o desenvolvimento da levedura, pois ela contribui significativamente para o aumento da acidez no vinho.

Oliva-Neto e Yokoya (1994) encontraram uma relação negativa causada pela presença de *L. fermentum* durante a fermentação alcoólica em processo de batelada alimentada. Através da comparação dos resultados apresentados do 2º e do 17º ciclo fermentativo, foi registrada elevação da contaminação de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL para $2,3 \times 10^9$ UFC/mL, houve redução do teor alcoólico no vinho final, o rendimento fermentativo foi reduzido de 92% para 49% e a acidez elevou-se de $3,4 \text{ g.L}^{-1}$ para $6,2 \text{ g.L}^{-1}$. A contaminação a níveis de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL para $3,3 \times 10^7$ UFC/mL e $6,0 \times 10^7$ UFC/mL em 6 ciclos de fermentação é responsável pela estimulação da formação de glicerol, como relatado por Cherubin (2003).

Além da contaminação por bactérias, é possível a contaminação por leveduras selvagens podendo ser capaz de reduzir em até 10% no rendimento de fermentação e de 18% na produção total de etanol (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996).

Além dos fatores relacionados ao consumo de açúcares e redução da viabilidade das leveduras, dependendo do nível de contaminação, há deposição de células de leveduras, impedindo o acesso dos nutrientes do caldo às leveduras, chamado de floculação. Este fenômeno se configura como o agrupamento de células com formação de flocos que se sedimentam no fundo das dornas após a fase tumultuosa de fermentação ou da agitação mecânica. Devido a decantação, a fermentação tem sua velocidade reduzida ou até cessada, maior formação de ácidos e queda significativa da viabilidade e produção. Além disto, os flocos formados dificultam a recuperação do fermento (LUDWIG et al., 2001).

Segundo Antonini (2004), as bactérias indutoras de floculação do fermento estão restritas a linhagens de *Lactobacillus*, mais particularmente *L. fermentum*. Na Figura 1, ilustra-se a ocorrência da floculação da levedura induzida por bactérias.

Figura 2 - Flocculação de leveduras por bactérias

2.5 Controle da contaminação

O controle microbiológico da fermentação é fundamental porque a constante presença de contaminantes durante o processo fermentativo é importante o conhecimento dos fatores que possibilitem a redução dos problemas causados pela contaminação bacteriana, além de práticas usuais de tratamento ácido do creme de levedura e de aplicação de antibióticos (NOBRE, 2005). Estes contaminantes são causadores de problemas tais como: o consumo de açúcar, a queda de viabilidade de células de leveduras devido às toxinas excretadas no meio e flocculação do fermento, o que acarreta perda de células de levedura pelo fundo de dorna ou na centrífuga e a queda no rendimento industrial (AMORIM et al., 1989).

Os métodos tradicionais empregados pela indústria sucro-alcooleira para o tratamento do mosto com o objetivo de reduzir sua carga microbiana contaminante preconizam o uso de antibióticos e o de ácido sulfúrico concentrado (LIMA, 2001).

Segundo Narendranath e Power (2004), a estratégia de inocular uma alta taxa de leveduras é um meio de minimizar os efeitos causados pela contaminação bacteriana, bem como o crescente conceito de que as bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos.

O tratamento ácido é normalmente aplicado nas usinas por apresentar eficiência ao controlar a contaminação bacteriana. Contudo, o tratamento ácido tem efeito agressivo sobre as leveduras, visto que provoca lixiviação de nutrientes tais como N, P e K (AMORIM et al., 1996).

Visando uma rota alternativa para o uso do ácido sulfúrico como tratamento para a recuperação de inóculo, Ceballos-Schiavone (2009) aplicou concentrações variadas de etanol em solução como agente antibacteriano, obtendo eficácia na eliminação de bactérias. No entanto, o autor afirma haver necessidade de diluir o fermento para evitar o efeito tóxico do etanol e que este tipo de tratamento tem a vantagem de evitar danos as tubulações.

A indústria, também recorre à ajuda de antimicrobianos que possuem a função de inibir ou anular o crescimento de bactérias por mecanismos específicos, influenciando vias metabólicas e mudando o equilíbrio osmótico pela alteração da estrutura das paredes celulares. Porém, antibióticos são caros e o uso de tais produtos fica restrito ao fator custo-benefício, além de requererem aplicação constante (NOBRE, 2009).

Gallo (1989) observou uma redução média de 44,5% da flora bacteriana quando o fermento recebeu tratamento com ácido sulfúrico por duas horas em pH igual a 2,0. Oliveira et al. (1996), utilizando antimicrobianos comerciais obtiveram redução populacional de 13,9% para *Bacillus subtilis*; 15,6% para *Bacillus coagulans*; 99,5% para *Lactobacillus fermentum* e 66,3% para *Lactobacillus plantarum*.

Andrietta et al. (1995) analisaram o efeito dos antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado (Cloranfenicol, fermacol, penicilina V potássica, quartenário de amônio e virginiamicina), e observaram que todos os antimicrobianos são capazes de eliminar a maioria das bactérias, como *Lactobacillus buchneri*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus brevis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis*. Contudo, a bactéria *L. plantarum* apresentou maior resistência frente aos antimicrobianos.

Em resposta a resistência bacteriana, esforços têm sido concentrados no isolamento e identificação de novos compostos com propriedades antibacterianas (TAYLOR; STAPLENTON; PAUL, 2002). Compostos naturais com propriedades biológicas podem ser utilizados para síntese de novos medicamentos, ou mesmo, serem utilizados como substitutos de princípios ativos sintéticos, como os antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana (AHMAD; BEG, 2001).

Entre os produtos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e

alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (CABRAL, 2008).

2.6 Própolis

Há relatos históricos pelos quais a própolis tem sido utilizada desde a antiguidade quando os egípcios embalsamavam os faraós, com uma mistura de ervas e própolis (FARNESI, 2007), eles sabiam que a própolis possuía atividade anti-putrefativa. Essa “cola de abelha” (como também é conhecida a própolis) era notoriamente reconhecida pelas suas propriedades medicinais por antigos médicos e filósofos gregos e romanos, como Aristóteles, Plínio e Galeno. Era utilizada como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal. Soldados romanos frequentemente faziam uso do produto como medicamento de emergência para as feridas de guerra. Assim sendo, esses usos medicinais foram perpetuados na Idade Média. Além do grande reconhecimento entre a civilização do Velho Mundo, os Incas também faziam uso de própolis como agente antipirético. Entre os séculos XVII e XX a própolis tornou-se o remédio mais popular em toda Europa. Herbalistas recomendam o uso de própolis por suas propriedades bactericida, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora e antiinflamatória, bem como para aumentar a resistência natural no corpo contra infecções (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

O nome “própolis” é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, a cidade, e quer dizer: “em defesa da cidade ou da colméia”. A própolis pode ser definida como uma resina natural produzida pelas abelhas e utilizada pela população para o tratamento de inúmeras condições médicas, incluindo inflamação e infecções bacterianas (MARCUCCI, 1996).

A própolis ganhou popularidade e vem sendo utilizada como suplemento alimentar. Além disso, tem sido empregada a fim de melhorar a saúde humana e prevenir doenças, tais como inflamações, problemas cardíacos, diabetes e até câncer. No que se refere às propriedades biológicas atribuídas à própolis, inúmeras já foram descritas: atividade citotóxica, anti-herpes, antitumoral, redução de radicais livres, antimicrobiana e atividade anti-HIV (PARK et al., 2004). Alguns trabalhos sugeriram que

esta ação poderia estar associada ao potencial antimicrobiano dos compostos fenólicos e de derivados de ácido cafeico, como o fenetil éster (CAPE) e o benzil cafeato, presentes em sua composição química (MARCUCCI, 1995; KROL et al., 1990; SCHELLER et al., 1990; VOLPERT ; ELSTNER, 1993; PASCUAL et al., 1994; SAID, 2000; RIGHI, 2008).

A composição da própolis é muito variável, mas em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos (BURDOCK, 1998). As propriedades biológicas da própolis estão, obviamente, ligadas diretamente com a sua composição química. Esse é possivelmente o maior problema para o uso da própolis como fitoterápico, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região, a época da colheita, a espécie da abelha e o grau de “africanização da *Apis mellífera*” (TOMÁS-BARBERAN, 1993). Embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas atividades farmacológicas distintas podem também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (KROL et al., 1993).

De acordo com Adelman (2005), a própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar diversos grupos químicos tais como hidrocarbonetos superiores, alcoois, ácidos alifáticos, ácidos graxos, aldeídos, cetonas, flavonóis, flavanonas, terpenóides, esteroides, aminoácidos, açúcares, lignanas, vitaminas, bem como diversos minerais.

A principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos. Essas substâncias possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Figura 1). Estão entre as substâncias com atividade biológica mais estudada em alimentos. Abrangem cerca de 8000 compostos com diferentes estruturas químicas (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008).

Figura 3 – Estrutura planar e espacial do fenol (Fonte: NAKAMURA, 2008)

De todos esses compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores são os flavonoides (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Consequentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides (PETERSON; DWYER, 1998). Podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros (MARCUCCI, 1998).

Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas flavonas, flavonois, dihidroflavonóides, antocianidinas, isoflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas etc. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis (LU et al., 2004). A ingestão de flavonóides interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana (WILLIAMS et al., 2004).

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritides* etc, entre eles Bankova et al. (1995), Serra e Escola (1995), Mazzuco et al. (1996) e Park et al. (1998). Ensaios de antibiose com a própolis, frente a 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as Gram-positivas (ANTUNES et al., 1996).

Park et al. (1998) estudaram a atividade de extratos etanólicos de própolis de diferentes regiões do Brasil, contra *Streptococcus mutans* e sobre a enzima glucosiltransferase. Os resultados demonstraram que todos os extratos inibiram tanto a glucosiltransferase como o crescimento do *S. mutans*.

A atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis foi verificada contra várias linhagens de bactérias Gram positivas: *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomas funi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoe mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e gram negativas: *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Verificou-se que de 39 linhagens de bactérias testadas, o crescimento de 25 delas foi inibido na presença de concentrações de própolis menores que 100 µg/mL (MARCUCCI, 1996).

Grange e Davey (1990) observaram que os extratos etanólicos de própolis - EEP (3 mg de sólidos totais/mL) inibiram completamente o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*, inibiram parcialmente o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não tiveram efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando inibição preferencial sobre cocos em detrimento de bacilos Gram positivos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos da própolis verde, gentilmente cedida pela empresa BIOEXX. A amostra de própolis foi triturada, homogeneizada e armazenada a -10°C . Para o preparo do extrato etanólico da própolis (EEP) foi feita mistura de própolis e etanol na proporção 1:5 (g de própolis:ml de etanol). A extração foi feita em banho de água termostatizado sob agitação constante. Fatores como a concentração do etanol, a temperatura e o tempo de permanência no banho-maria foram definidos a partir de um planejamento fatorial do tipo composto rotacional central. A tabela 1 apresenta os níveis das variáveis independentes, compreendendo os pontos inferior (-1) e superior (+1) e os axiais ($-\alpha$; $+\alpha$). As faixas de variação entre o limite inferior e superior de cada variável foram estabelecidas com base na literatura. Em seguida realizou-se a centrifugação a $5000 \times g$ durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises subsequentes.

Tabela 1 - Faixa de estudo das variáveis independentes em análise no planejamento experimental fatorial do tipo 2^3

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Concentração de etanol (%)	70	76	85	93	99,5
Tempo (minutos)	10	20	35	50	60
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	58	70	82	90

O planejamento fatorial foi a ferramenta utilizada para otimização das condições de preparo do EEP. Para a avaliação foi aplicado um planejamento experimental fatorial do tipo 2^3 . Quando há necessidade de desenvolver ou melhorar um processo, ou a formulação de um produto, é indispensável planejar um procedimento experimental para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes ou fatores têm sobre a(s) resposta (s). Segundo Barros-Neto *et al.* (2003), o planejamento fatorial é utilizado para

analisar como determinados fatores influenciam determinadas respostas. Consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis requer a condução de experimentos para as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Dessa forma, para n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2 e n_k do fator k, o planejamento terá no mínimo $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ experimentos e será chamado de fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. O planejamento em que as variáveis são analisadas em dois níveis (superior + e inferior -) é o mais simples e utilizado. O planejamento de dois níveis e k variáveis requer a condução de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes.

A Tabela 2 apresenta o delineamento experimental aplicado. A avaliação dos resultados foi feita pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, com o objetivo de avaliar o efeito de cada variável sobre o teor de compostos fenólicos totais. O ensaio foi efetuado em ordem aleatória, segundo o procedimento determinado por Barros-neto et al. (2003) e Rodrigues; lemma (2005). Os aplicativos “Statistica Release 5” e SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM) foram utilizados para o tratamento dos dados.

Tabela 2 – Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições de extração dos compostos bioativos obtidas no planejamento fatorial do tipo 2^3

Ensaio	Níveis de variáveis codificados		
	Conc. de etanol (g/L)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	- 1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1	- 1
3	- 1	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5	- 1	- 1	+ 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1
8	+ 1	+ 1	+ 1
9	- 1,68	0	0
10	+ 1,68	0	0
11	0	- 1,68	0
12	0	+ 1,68	0
13	0	0	- 1,68
14	0	0	+ 1,68
15 – 20	0	0	0

A análise dos resultados pela ANOVA (análise de variância) permitiu a elaboração de um modelo matemático quadrático para correlacionar a resposta desejada em função dos parâmetros estatisticamente significativos, gerando superfície de resposta que forneceram informações sobre as faixas mais desejadas.

3.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão. Esse método envolve a oxidação de fenois por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteu) e a medida

colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino (SINGLETON et al., 1999).

Os extratos obtidos foram diluídos e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de reação foram adicionado 2 mL de carbonato de sódio a 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE, mg.100g⁻¹).

3.3 Atividade antimicrobiana

3.3.1 Bactérias

Para avaliar a ação bactericida dos extratos foram utilizadas linhagens comerciais de *S. cerevisiae* e isolados das bactérias *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus fermentum*, que se encontravam armazenadas nos meios GLT e MRS, respectivamente. Foram utilizados como microrganismos testes cepas de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus fermentum* e as cepas de bactérias foram mantidas em GLT (glicose, extrato de levedura, triptona, ágar) ou MRS (Man, Rogosa, Sharpe + ágar), respectivamente, à temperatura de 37 °C (BAUER et al., 1966; GREGER; HADACEK, 2000).

3.3.2 Teste de difusão em ágar

Para a análise da ação antibacteriana dos extratos, foi utilizado o procedimento de difusão em meio sólido desenvolvido por Bauer et al. (1966) utilizando discos de papel de filtro estéreis com 4 mm de diâmetro. Os microrganismos foram reativados através de cultivo em meio líquido por 24 horas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram suspensas semeando-se 150µL em 9 mL de solução salina 0,9% estéril até ajuste da turvação para o valor absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro que equivale a 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL.

Uma alíquota de 500 µL da suspensão bacteriana foi inoculada com 25 mL de meio sólido estéreo MRS ou GLT ou YPD para *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis* e *S. cerevisiae*. Em seguida, foram depositados discos de papel de filtro embebidos com 20 µL de cada produto. O teste controle negativo foi realizado com disco embebido de solução alcoólica e o teste controle positivo com o disco contendo 20µl do antibiótico Lactrol[®]. Após este procedimento, as placas foram incubadas a 35°C durante 24h. Depois com auxílio de um paquímetro, foram medidos os halos de inibição do crescimento.

Foi considerado como possuidor de atividade antimicrobiana o produto que apresentou a formação de um halo de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro (WONG - LEUNG, 1988). Este teste trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antimicrobianos, essencialmente qualitativa. O método utilizado foi o descrito por Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003).

3.4 Fermentação

3.4.1 Preparo do caldo

As amostras de cana-de-açúcar utilizadas no projeto foram coletadas no Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP). O caldo foi extraído em moenda composta de um único terno. O caldo foi filtrado em algodão, e o teor de sólidos solúveis ajustado com sacarose.

3.4.2 Ensaios

Foram realizados quatro grupos de ensaios de fermentação, assim distribuídos: sendo eles referentes a um controle sem adição de antibiótico e/ou contaminante; um controle negativo inoculado com as bactérias *B. subtilis* ou *L. plantarum* sem antimicrobiano; um inoculado com as bactérias *B. subtilis* ou *L. plantarum* com adição

de solução antimicrobiana do extrato da própolis ou Lactrol[®] e um controle positivo com adição de extrato da própolis ou antibiótico Lactrol[®] (Tabela 3).

Tabela 3 – Descrição dos grupos dos ensaios fermentativos

Grupos de ensaios fermentativos	Composição		
	Caldo de cana (150 mL)	Inóculo bacteriano ¹ (3mL)	Antimicrobiano ² (3mL)
Controle	X		
Controle negativo	X	X	
Controle positivo	X		X
Caldo contaminado	X	X	X

¹ Solução bacteriana com *L. fermentum* ou *B. subtilis*

² Extrato de própolis ou Lactrol[®] (10 ppm)

Cada grupo constou de um ensaio completo, seguindo o mesmo delineamento experimental do tipo composto rotacional central, envolvendo 3 variáveis independentes (concentração de levedura, teor de sólidos solúveis e temperatura). A Tabela 4 apresenta os níveis das variáveis independentes, compreendendo os pontos inferior (-1) e superior (+1), os axiais (- α e + α) e os centrais.

Tabela 4 - Valores utilizados no planejamento 2³ completo nos respectivos níveis, para os parâmetros fermentativos variando a concentração de células, teor de sólidos solúveis (°Brix) e temperatura

Variáveis independentes	Níveis de variação				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Concentração de leveduras (%)	32	36	41	46	50
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	16	17	18,5	20	21
Temperatura (°C)	32	34	36	38	40

3.4.3 Determinações físico-químicas e microbiológicas

a) Determinação de CO₂

A formação de CO₂ foi determinada pela perda de massa, efetuando-se a pesagem dos frascos em balança semi-analítica, após leve agitação manual.

b) Açúcares redutores totais (ART)

O teor de ART foi determinado segundo o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Cinco mililitros de amostras, do caldo de cana ou do vinho separado por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos, foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL e adicionados 25 mL de HCl 1,3 N. A solução foi mantida em banho-maria a 65°C por 30 minutos, resfriado e, posteriormente, neutralizada com NaOH 4 N.

Após completar o volume do balão para 100 mL, uma alíquota de 500 µL foi transferida para tubos de ensaio contendo 500 µL do reagente DNS. Os tubos contendo as amostras foram mantidos em água fervente por 5 minutos e resfriados. Após adição de 5 mL de água destilada a absorbância foi obtida a 540 nm em espectrofotômetro. Uma solução de glicose a 2% foi utilizada como padrão.

c) Teor alcoólico

A determinação do teor alcoólico do vinho foi realizada após destilação da amostra em microdestilador Tecnal mod. TE-012, recolhendo-se 25 mL do destilado em balão volumétrico e determinando-se a densidade relativa da solução em densímetro digital ANTON PAAR (DMA-45). Com o valor obtido foi calculado o rendimento alcoólico (Y) com base na estequiometria, da seguinte forma:

$$\text{Rendimento de fermentação (Y)} = \frac{\text{g de etanol obtido no vinho}}{\text{g de ART fornecido}} * 100$$

d) Viabilidade celular

A viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* foi determinada pela coloração diferencial das células pela solução de azul de metileno e posterior contagem das

células viáveis e não viáveis presentes em 80 retículos da câmara de Newbauer espelhada, com o auxílio de microscopia ótica, em microscópio OLYMPUS, modelo BH, em aumento de 100x, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (1996).

Os resultados foram expressos em percentagem, sendo que a viabilidade representa a relação entre células vivas e total de células.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{n^{\circ}\ células\ viáveis\ (CV)}{n^{\circ}\ células\ totais\ contadas} * 100$$

e) Contagem dos microrganismos

A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) dos microrganismos foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície, utilizando o meio MCC-ágar estéril. No meio de cultivo foi adicionado actidiona na concentração de 10 ppm como inibidor da levedura. Para as diluições seriadas 1 mL do caldo foi transferido para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9% esterilizada. As placas foram incubadas a 32°C por 24 horas para crescimento e posterior contagem das colônias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do extrato

A composição química variável da própolis é dependente da biodiversidade de cada região visitada pelas abelhas e entre os compostos ativos da própolis os fenólicos, têm sido considerados como substâncias biologicamente ativas (MARCUCCI et al., 2000). O processo de otimização de extração compreende condições diversas, tais como: temperatura de extração, comparação entre métodos e diferentes líquidos extratores (álcool em várias diluições, adição de substâncias tensoativas misturadas às soluções álcool-água ou água) e o tempo de extração (LONGHINI et al., 2007).

O planejamento fatorial foi a ferramenta que auxiliou a mesclagem de fatores, buscando alcançar um ponto ótimo para obtenção do extrato o mais rico possível em compostos bioativos e com um desempenho favorável.

A Tabela 5 mostra os resultados experimentais dos CFT quando se faz variar os fatores concentração do etanol (%), tempo (minutos) e temperatura (°C) de extração. Com os resultados experimentais obtidos para cada fator analisado, a partir do planejamento fatorial, é possível ajustar os dados para obter um modelo linear que relacione a quantidade de CFT com os parâmetros estudados.

Tabela 5 – Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições de extração dos compostos bioativos obtidas no planejamento fatorial do tipo 2^3

Ensaio	Concentração do etanol (%)	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	CFT (mg/g)
1	76	50	58	68,95 ^a
2	85	35	70	40,62 ^{def}
3	85	35	90	39,88 ^f
4	76	20	82	35,03 ^h
5	85	35	70	40,62 ^f
6	85	35	70	40,62 ^{def}
7	85	60	70	52,18 ^b
8	99,5	35	70	41,74 ^{de}
9	93,5	20	82	39,88 ^f
10	85	10	70	32,80 ^h
11	93,5	50	82	43,60 ^c
12	76	20	58	37,64 ^g
13	93,5	50	58	39,88 ^{ef}
14	85	35	50	42,11 ^{cd}
15	85	35	70	40,62 ^{def}
16	93,5	20	58	42,11 ^{cd}
17	85	35	70	40,62 ^{def}
18	70	35	70	39,88 ^f
19	85	35	70	40,62 ^{def}
20	76	50	82	29,44 ⁱ

Valores seguidos por letras diferentes (a, b, c...) diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de CFT das amostras analisadas são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), o que permitiu a comparação dos resultados obtidos. O teste de Tukey demonstrou que os tratamentos são estatisticamente diferentes. De acordo com o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 4, para o teor de CFT, à maioria dos fatores são estatisticamente significativos

ou estão bem próximos de 95% de confiança, neste caso a retirada de algum parâmetro não melhora a qualidade do ajuste, então se estudou o modelo com todos os parâmetros. A linha em vermelho indica a região acima da qual os efeitos foram significativos. Com base nesta informação os gráficos de contorno (Figura 5) foram construídos, o que simplifica a interpretação dos resultados.

Figura 4 – Diagrama de Pareto para interação entre os fatores frente ao teor de cft (mg/g)

Figura 5 – Curvas de contorno para a resposta compostos fenólicos totais (mg/g) em função da temperatura e tempo (A), da concentração de etanol e do tempo (B) e da temperatura e da concentração de etanol (C)

Observa-se que a interação entre a concentração do álcool, o tempo e a temperatura confirmam a comparação de médias pelo teste de Tukey e a melhor resposta foi no ensaio 1 com média de 68,95 mg/g. Este ensaio corresponde aos níveis: álcool 76%, 58°C e 50 minutos.

A variável que influencia de forma mais significativa o teor de compostos fenólicos é a temperatura, sendo esta inversamente proporcional à resposta, podendo ser evidenciado na comparação das respostas. A combinação menos satisfatória foi no

ensaio 20; apesar desse extrato ter sido obtido com um solvente de mesma concentração e em igual tempo de extração que o ensaio 1, sua temperatura elevada (85°C) pode ter afetado o processo extrativo, obtendo um extrato com 29,44mg/g.

A busca de um método de extração mais fácil, prático e eficiente é um processo constante nas avaliações de compostos bioativos, onde vários parâmetros devem ser observados, podendo ser influenciados pela luz UV, pH extremo e altas temperaturas (CARVALHO et al., 2001). Autores acreditam que a temperatura empregada no processo extrativo não deve exceder 70 °C podem acarretar na degradação, polimerização e a oxidação de compostos fenólicos, fatores que resultam na redução dos fenóis totais (NEGRI, 2007; BASTOS et al., 2007; NAKAMURA, 2008; SOBRINHO et al., 2010).

Negri (2007), avaliando a estabilização das folhas de *Maytenus ilicifolia*, observou uma relação inversa entre os teores de flavonóides e a temperatura de secagem, comprovando a influência deste fator sobre os compostos fenólicos avaliados. Bastos et al. (2007) obtiveram menor teor de compostos fenólicos no mate tostado em relação ao mate verde.

Segundo o Diagrama de Pareto, a relação entre a temperatura e tempo; e concentração do etanol e tempo não foi significativa. No entanto, quando associamos concentração do etanol a temperatura, obtemos o ponto mais significativo no processo extrativo, com valores inversamente proporcionais.

4.2 Teste de susceptibilidade *in vitro*

O bioensaio de difusão em ágar mostrou, de forma rápida e qualitativa, a ação inibitória dos extratos de própolis verde pela formação de halo de inibição em torno da área em que os discos de papel foram colocados. O controle negativo foi o etanol 70%, 76%, 85%, 93 % e 99,5% (v/v) enquanto que o controle positivo foi o Lactrol® 100 ppm, um antibacteriano de alto poder de ação. Na tabela 6 encontram-se os valores da média dessas zonas, em milímetros, enquanto que na figura 6 são ilustradas as placas de Petri com as zonas de inibição em relação ao controle (positivo e negativo) e aos

extratos. Foi observada ausência de atividade fungistática no extrato de própolis para a levedura.

O solvente utilizado para solubilizar as amostras, não inibiu o crescimento das bactérias testadas. Os controles utilizados (negativo e positivo) responderam conforme o esperado, não havendo nenhum tipo de interferência. Também podemos observar que alguns extratos têm um espectro de ação maior em relação a outro, a exemplo do extrato obtido no ensaio 1 que inibiu as bactérias testadas com formação de halos de inibição de até 6 mm de diâmetro.

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana da própolis em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* etc, entre eles Bankova et al. 1995), Mazzuco et al. (1996) e Park et al. (1998). Ao estudar a atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos, Drumond et al. (2004) conseguiram um halo de inibição de 17 mm do extrato de própolis sobre a linhagem de *Lactobacillus casei*.

Ensaio de antibiose com a própolis, frente 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade bacteriana da própolis é mais efetiva sobre as Gram-positivas (ANTUNES et al., 1996).

Tabela 6 – Médias das zonas de inibição (mm) de *L. fermentum* e *B. subtilis* frente ao extrato da própolis

Tratamentos	Bactérias	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Lactrol®	6	7
Etanol 70%	nd	nd
Etanol 76%	nd	nd
Etanol 85%	nd	nd
Etanol 93,5%	nd	nd
Etanol 99,5%	nd	nd
Ensaio 1	5	6
Ensaio 2	4	5
Ensaio 3	3	2
Ensaio4	2	nd
Ensaio5	3	3
Ensaio6	3	5
Ensaio7	4	5
Ensaio8	3	4
Ensaio9	4	2
Ensaio10	1	nd
Ensaio11	4	5
Ensaio12	1	2
Ensaio13	2	2
Ensaio14	4	4
Ensaio15	3	4
Ensaio16	3	3
Ensaio17	4	3
Ensaio18	2	3
Ensaio19	4	3
Ensaio20	nd	1

nd: valor não detectado

Figura 6 – Halos de inibição do Lactrol® 100 ppm sobre as bactérias (A), do etanol em diferentes concentrações sobre as bactérias e a levedura (B) e do extrato da própolis sobre *S. cerevisiae* (C), *Bacillus* (D) e *Lactobacillus* (E)

4.3 Fermentação

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental foi possível investigar a influência de determinadas variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados. As respostas dos experimentos da combinação dos três fatores (concentração de células de levedura, temperatura e teor de sólidos solúveis) são apresentadas na Tabela 07, onde se observar que o teor alcoólico médio foi de $62,58 \pm 0,05$ g/mL. O ensaio 7 apresentou o melhor teor alcoólico ($78 \pm 0,11$ g/L), com 41% de concentração de células de leveduras, 18° Brix e 32°C.

Tabela 7 - Valores codificados e configuração experimental para o estudo de otimização das condições do processo fermentativo no planejamento fatorial do tipo 2^3

Ensaio	Conc. de células de levedura (%)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Temperatura (°C)	Teor alcoólico (g/l)
1	41	16	36	$73,30 \pm 0,04^{ab}$
2	50	18,5	36	$66,40 \pm 0,14^{bcd}$
3	36	20	34	$61,40 \pm 0,06^{cde}$
4	46	17	38	$55,30 \pm 0,02^{def}$
5	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,09^{abc}$
6	32	18,5	36	$65,10 \pm 0,13^{bcd}$
7	41	18,5	32	$78,00 \pm 0,11^a$
8	46	20	34	$51,60 \pm 0,01^{ef}$
9	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,03^{abc}$
10	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,03^{abc}$
11	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,03^{abc}$
12	36	17	38	$52,60 \pm 0,01^{ef}$
13	46	20	38	$51,80 \pm 0,07^{ef}$
14	46	17	34	$56,10 \pm 0,05^{def}$
15	41	21	36	$61,90 \pm 0,04^{bcde}$
16	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,03^{abc}$
17	36	17	34	$52,60 \pm 0,02^{ef}$
18	41	18,5	40	$46,30 \pm 0,03^f$
19	36	20	38	$48,40 \pm 0,01^f$
20	41	18,5	36	$71,80 \pm 0,03^{abc}$
Valor médio (X)		-	-	$62,58 \pm 0,05$

O gráfico de Pareto (Figura 7) ilustra os efeitos das variáveis, bem como suas interações. Os parâmetros (colunas horizontais) que ultrapassam a direita da linha tracejada são considerados significativos no nível de significância de 5%.

Entre as variáveis estudadas, a temperatura apresentou efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). A interação entre os fatores pode ser visualizada de forma mais clara nos gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figura 8). Neles observa-se que o maior teor alcoólico ocorreu na fermentação conduzida em temperaturas menores.

Figura 7 - Diagrama de Pareto para interação entre os fatores frente ao teor alcoólico (g/l)

Figura 8 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta teor alcoólico (g/L) em função da temperatura e da concentração de células de levedura (A), d teor de sólidos solúveis e da concentração de células de levedura (B) e da temperatura e teor de sólidos solúveis (C)

A produção de álcool durante a fermentação é influenciada por alguns fatores, como a matéria-prima, a linhagem de leveduras, o pH do meio de fermentação, a concentração do inóculo, a temperatura de fermentação, a quantidade e a natureza dos nutrientes no mosto e a presença de contaminantes. Os ensaios central (5, 9, 10, 11, 16, 20) e 18 foram conduzidos em condições semelhantes ao ensaio 7, a exceção da temperatura, no entanto estes apresentaram diferença significativa. A adaptação de

alguns meios e temperaturas antes de inoculação pode afetar não apenas a habilidade das células sobreviverem, mas também a qualidade e a composição do produto.

Baseado nos os resultados de tais ensaios é possível afirmar que o aumento da temperatura interfere no desempenho das leveduras, o que resulta na redução do teor alcoólico. Elevadas concentrações de açúcar estão associados a baixa atividade de água e pressão osmótica, que podem dificultar a passagem do etanol para fora da célula (STREHAIANO; GOMA, 1983).

A temperatura é indiscutivelmente um dos parâmetros mais importantes que afetam a fermentação, influenciando no metabolismo da levedura. As baixas temperaturas reduzem o crescimento de bactérias acéticas e lácticas, facilitando o controle da fermentação alcoólica (BRAGA, 2006). Jones et al. (1981) descreveram que as espécies de *Saccharomyces* apresentam altas taxas de crescimento a temperatura entre 28 e 35°C e acima de 40°C não ocorre crescimento das leveduras. A concentração de etanol intracelular atinge valores máximos sob altas temperaturas, induzindo a morte da célula.

O mecanismo de ação da temperatura sobre o comportamento da *S. cerevisiae* ocorre ao nível da membrana mitocondrial. A membrana de composição lipídica das leveduras, assim como em outros microrganismos, muda de acordo com as variações de temperatura; quanto menor a temperatura, mais insaturada é a membrana de composição lipídica (WATSON, 1987). Fundamentado nestes resultados, foi selecionado um ponto ótimo para a condução do processo fermentativo.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos no processo fermentativo

O antimicrobiano sintético mostrou-se mais eficiente no controle da contaminação bacteriana em relação ao extrato de própolis. Amostras contaminadas com *Lactobacillus* e *Bacillus* tratadas com o extrato apresentaram teor alcoólico 48,89% e 34,67% menor que as amostras tratadas com o Lactrol[®], respectivamente (Tabela 8). Era esperado que o extrato de própolis apresentasse um rendimento menor que o do produto sintético, já que a própolis apresenta um grande número de elementos em sua

composição, com diferentes bioatividades, não sendo exclusivamente um bactericida elaborado para uso em fermentações.

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos observados ao termino da fermentação de caldo de cana seguindo delineamento fatorial

Tratamentos	Teor alcoólico (g/L)	Rendimento (%)	10 ⁶ UFC/m L	Viabilidade (%)	
				Inicial	Final
Fermentação I	80,5 ^b	69,45 ^{abc}	34,17 ^b	80,15	96,41
Fermentação II	46,3 ^{de}	43,33 ^d	74,77 ^a	76,25	46,91
Fermentação III	107,2 ^a	78,55 ^a	4,14 ^d	77,58	91,32
Fermentação IV	54,8 ^{cd}	58,500 ^c	35,71 ^b	79,88	86,88
Fermentação V	63,7 ^c	60,29 ^{bc}	21,65 ^c	67,95	74,95
Fermentação VI	78 ^b	62,68 ^{bc}	26,93 ^{bc}	77,35	88,95
Fermentação VII	97,5 ^a	70 ^{ab}	1,7 ^d	86,79	93,28
Fermentação VIII	38 ^e	41 ^d	65,56 ^a	77,00	49,76

FERMENTAÇÃO I: Amostra controle (caldo de cana); FERMENTAÇÃO II: Amostras inoculadas com *Lactobacillus*; FERMENTAÇÃO III: Amostras inoculadas com *Lactobacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO IV : Amostra *Lactobacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO V : Amostra *Bacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO VI: Amostras extrato; FERMENTAÇÃO VII: Amostras inoculadas com *Bacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO VIII: Amostras inoculadas com *Bacillus*.

Através dos dados obtidos pode-se observar que o aumento na contaminação bacteriana afeta diretamente o teor alcoólico bem como o rendimento da fermentação. O antimicrobiano comercial reduziu a contaminação bacteriana em 94,46% e 97,40% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente. O extrato de própolis a redução foi pouco menor, 54,24% e 67,02% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Variações das determinações microbiológicas e de parâmetros fermentativos

FERMENTAÇÃO I: Amostra controle (caldo de cana); FERMENTAÇÃO II: Amostras inoculadas com *Lactobacillus*; FERMENTAÇÃO III: Amostras inoculadas com *Lactobacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO IV : Amostra *Lactobacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO V : Amostra *Bacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO VI: Amostras extrato; FERMENTAÇÃO VII: Amostras inoculadas com *Bacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO VIII: Amostras inoculadas com *Bacillus*

Dentre as principais causas de redução no rendimento fermentativo destaca-se a produção de ácidos pelas bactérias lácticas que levam a uma inibição ou mesmo a morte das leveduras em função da quantidade de ácidos excretados, conseqüentemente haverá um aumento da acidez o que acarreta uma sobra de açúcares no final da fermentação, ocorrendo significativas perdas na eficiência fermentativa (CHERUBIM, 2002).

Verificou-se também que com o aumento da infecção bacteriana houve surgimento de floculação no meio fermentativo (Figura 10), o que leva a inibição do crescimento, morte das células e conseqüentemente diminuição da viabilidade celular, esses fatores somados levaram a uma queda na produção de álcool pelas leveduras e por seguinte a queda do rendimento do processo.

Figura 10 – Flocculação na fermentação contaminada por *Lactobacillus fermentum*

Conforme Ludwig et al. (2001) a flocculação bacteriana é um fenômeno reversível de agrupamento celular que comumente se desenvolve no final da fase exponencial de crescimento ou na fase estacionária, pode ser causado por agentes químicos ou microbiológicos, causando redução da superfície de contato entre as leveduras e o mosto e o aumento no tempo de fermentação ou até fermentações incompletas, com grandes perdas de açúcares ao final do ciclo fermentativo e até a morte de células saudáveis.

Conforme Figura 11, verifica-se que o extrato da própolis na afetou a viabilidade celular. com o aumento da infecção bacteriana houve também o aumento significativo da acidez da dorna. As bactérias ativas afetaram a viabilidade de *S. cerevisiae*, pois ao longo dos cultivos mistos as porcentagens de viabilidade foram menores que no tratamento controle.

Figura 11 – Variação da viabilidade celular inicial e final

FERMENTAÇÃO I: Amostra controle (caldo de cana); FERMENTAÇÃO II: Amostras inoculadas com *Lactobacillus*; FERMENTAÇÃO III: Amostras inoculadas com *Lactobacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO IV : Amostra *Lactobacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO V : Amostra *Bacillus* + extrato; FERMENTAÇÃO VI: Amostras extrato; FERMENTAÇÃO VII: Amostras inoculadas com *Bacillus* + Lactrol 100ppm; FERMENTAÇÃO VIII: Amostras inoculadas com *Bacillus*

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito de *Lactobacillus* em cultura mista com *S. cerevisiae* e relataram que a inoculação das bactérias na fermentação anteriormente à da levedura ocasionou aumento do desvio de carboidratos para a produção de ácido láctico, queda na viabilidade e redução na formação de massa celular da levedura. Entretanto, os mesmos autores observaram que quando as bactérias foram inoculadas ao mesmo tempo e com o mesmo nível que as leveduras, 10^7 células.mL⁻¹, o crescimento das bactérias foi inibido e a viabilidade da levedura não foi significativamente afetada.

O extrato da própolis não afetou de forma significativa a viabilidade celular. Castro et al. (2001) afirmam que o citocromo C e o gene YCA1 são responsáveis pela sensibilidade da *Saccharomyces* a própolis e que a supressão desse gene ocorre em diversas cepas.

5 CONCLUSÕES

O maior pico de produção de compostos fenólicos totais foi com uso de etanol 76% como solvente, à 58°C por 50 minutos, apresentando 68,95 mg de CFT/g de própolis e um halo de inibição de 6 e 5mm para *Bacillus* e *Lactobacillus*, respectivamente.

As faixas das variáveis que maximizaram o teor alcoólico foi o processo fermentativo conduzido a 32°C, com 41 g de células de leveduras/L, em um meio contendo 18,5° Brix

Apesar do antimicrobiano comercial ter apresentado maior eficiência na redução da contaminação (94,46% e 97,40% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente), o extrato de própolis tem potencial para ser utilizado no controle dos contaminantes bacterianos presentes nas fermentações etanólicas, sendo responsável por redução de 54,24% e 67,02% para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente. No entanto, sugere-se estudos acerca da viabilidade econômica da própolis como antimicrobiano natural para o controle dos contaminantes da fermentação etanólica.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants again multi-drug resistant human pathogens. **Journal Ethnopharmacology**, Tomelilla, v. 74, p. 113-123, 2001.
- ÁLCOOL-ETANOL BRASILEIRO, 2006. Disponível em: <http://biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm>. Acesso em: 20 janeiro/2011.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, D. M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas destilarias. **STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP., 1996.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., 1981 Rio de Janeiro. **Anais....** Piracicaba: STAB, 1981. v.1, p.158-168.
- ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVEIRA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação de M.I.C. (concentração inibitória mínima) para cinco antimicrobianos sobre bactérias g+ isoladas da indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 13, n. 6, 42 – 43p. 1995.
- ANTUNES, R. M. P.; CATAO, R. M. R.; CEVALLOS, B. S. O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.77, p.15-18, 1996.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: Edgar Blücher .1975. 231p. (Biotecnologia 2).
- BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V.; BALASUBRAMANIAM, K. Isolation and improvement of a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York v. 17, p. 739-746, 2001.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; M ARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v.50c, p.167-172, 1995.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.401p.

BASTOS, D. H.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A.C.; CUNHA, I. B.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, Basel, v.12, p.423-32, 2007.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO. **BIOETANOL de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável** – Rio de Janeiro, 2008.

BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, n.9, p.10-13, 1983.

BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 2006. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CABRAL, I. S. R.; **Isolamento e identificação de compostos com atividades antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

CARVALHO, R. S. **Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. 2001. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

CARVALHO, J. C. T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**, Florianópolis, 3.ed., 443-457p, 2001.

CASTALDO, S.; CAPASSO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 73, S1-S6p., 2002.

CASTILLO, C. J. C.; SHIRAHIGUE, L. D.; SELANI, M. M. **Efeito de extratos de resíduos de uva (*Vitis labrusca*) na inibição da oxidação lipídica em carne de frango cozida armazenada sob refrigeração**. Brasília: UNESCO, MCT, CNPq, 2009. p. 175 – 202.

CASTRO, P. A.; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; BARROS, M. H.; GOLDMAN, M. H.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**. Washington, v. 10, n. 3, p. 398-411, 2011.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6, 1996, Maceió, **Anais...** Maceió: STAB, 1996. p.23-29.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2002. 124p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

DRUMOND, M. R. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PEREIRA, M. S. V.; PADILHA, W. W. N. Estudo Comparativo in vitro da Atividade Antibacteriana de Produtos Fitoterápicos Sobre Bactérias Cariogênicas. **Pesquisa Brasileira de Odontopedia Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 4, n. 1, p. 33-38, 2004.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

ELEUTHERIO, E. C. A.; RIBEIRO, M. J. S.; PEREIRA, M. D.; MAIA, F. M.; PANEK, A. D. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, Nova Jersey, v. 36, n. 6, p. 1217-1223, 1995.

FARNESI, A. P.; **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microrganismos**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2007.

FERNADEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; Antioxodant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 649-671, 2008.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas. 1989.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 83, n. 3, p. 159-160, 1990.

GREGER, H.; HADACEK, F. Testing of arttifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, New Jersey, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 96, p. 67-202, 2002.

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, London, v.16, p-42-49, 1981.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans *Streptococci*. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.

KROL, W.; SCHLLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforschung**, Basel, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Antioxidant property of ethanolic extract propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochemistry Journal**. Washington, v.21, p. 593-597, 1990.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol-production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, New Jersey, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LALUCE, C. ; SOUZA, C. S. ; GATTAS, E. A. L. ; WALKER, G. M. ; ABUD, C. L. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with cell recycling at elevated temperatures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, United Kingdom, v. 29, n.3, p. 140-144, 2002.

LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**: Processos fermentativos enzimáticos. 10. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. (Biotecnologia 1).

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 17(3): 388-395, 2007

LU, Y.; WU, C.; YUAN, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, São Paulo, v.75, n.3, p.267-276, 2004.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

MAGER, W. H.; VARELA, J. C. S. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 10, n. 2, p. 253-258, 1993.

MAJARA, M.; O'CONNOR-COX, E. S. C.; AXCELL, B. C. Trehalose – a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Minnesota, v. 54, n. 4, p. 221-227, 1996.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, n. 1, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, Minnesota, v. 2, 116–123p.,1999.

Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Valente, P. H. M.; Paulino, N.; Naturforsch, Z. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 55, p. 1 - 76, 2000.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 532-535, 2004.

MAZZUCO, H.; SILVA, R. D.; BERCHIERI, A.; MATSUSHIGE, K.; KUSUMOTO, I. T.; YAMAMOTO, Y.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Use of propolis and ethyl alcohol in the control of Salmonella in poultry rations. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, p.1-5, 1996.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORIMURA, S.; LING, Z. Y.; KIDA, K. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tóquio, v. 83, n. 3, p. 271-274, 1997.

NAKAMURA, K. L. **Variabilidade genética e métodos de extração de metilxantinas e compostos fenólicos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. hil.)**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura) - Universidade Paranaense, Umuarama. 2008.

NARENDRANATH, N. V. POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactocilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v.31, p.581-584, 2004.

NEGRI, M. L. S. **Secagem das folhas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* mart. ex reiss) sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos**. 2007. 92p. Mestrado (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

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

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, São Paulo, n. 21, 2006.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 25-31, 1997.

OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALARDE, V. E.; GODOY, A.; AMORIM, H. V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ, 1996. 89p.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos da própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p.313-318, 1998.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PASCUAL, C. GONZALEZ, R.; TORRICELLA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal Ethnopharmacology**, Tomelilla, v. 41, p. 9-13, 1994.

POURQUIE, J.; VANDECASTEELE, J. P. **Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol**. São Paulo: Manole, 1985. cap. 2, p. 427-440. (Biotecnologia, 4).

RIGHI, A. A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. 2008. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências Botânicas) - Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326p.

SAID, R. A. **Atividade antioxidante de diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos**. 2000. 84p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2000.

SCHELLER, S.; WILCZOK, T.; IMIELSKI, S.; KROL, W.; GABRYS, J. SHANI, J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. **International Journal of Radiation Oncology Biology**. Oxford, v. 57, p. 461-465, 1990.

SERRA, J.; ESCOLA, R. A study on the bacteriostatic activity of propolis. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Hamburg, v.91, p.242-246, 1995.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S; SANTANA, D. P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p.1073-1077, 2008.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, San Diego, v.299, p.152-178, 1999.

SOBRINHO, T. J. S. P.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonóides de *Bauhinia cheilantha*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p.288-291, 2010.

STREHAIANO, P.; GOMA, G. Effects of initial substrate concentration on two wine yeasts: relation between glucose sensitivity and ethanol inhibition. **Journal of Enology and Viticulture**, Davis, 341-345, 1983.

TAUPIER, L. O. G. A diversificação no novo século. In: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LA CANA-DE-AZUCAR. **Manual dos derivados da cana-de-**

açúcar: diversificação, matérias-prima, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia Brasília: ABIPTI, 1999. cap. 1.1, p. 3-17.

TAYLOR, P. W.; STAPLETON, P. D; PAUL, L. J. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, New York, v. 7, n. 1, p. 1086-1091, 2002.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 90, n. 3, p. 819-828, 2001.

TOLEDO, D. B.; PAULINO, R. S.; MARCUCCI, M. C. Caracterização química e biológica de compostos isolados da própolis vermelha com vistas à sua inclusão na tipificação. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 1., 2008, Umuarama. **Anais...** Umuarama: Universidade Paranaense, 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLON, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 80, p. 47-53, 2003.

VOLPERT, R.; ELSTNER, E. F. Biochemical activities of propolis extracts: standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. **Naturforsch**, Tübingen, v. 48, p. 851-857, 1993.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, Los Angeles, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

WONG-LEUNG, Y. L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 11-16, 1988.

WATSON, K. Temperature relations. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. The yeasts. London: **Academic press**, London, p. 41-71, 1987.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.