



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANE STÉFANO SIMIONATO

**BIOPRODUTOS PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

ANE STÉFANO SIMIONATO

**BIOPRODUTOS PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Simionato, Ane Stéfano.

Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica / Ane Stéfano Simionato. - Londrina, 2016.
83 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Pseudomonas aeruginosa - Tese. 2. Antimicrobianos - Tese. 3. Lactobacillus - Tese. 4. Biofilme - Tese. I. Andrade Filho, Galdino . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ANE STÉFANO SIMIONATO

**BIOPRODUTOS PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gisele Silva de Aquino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando César de Macedo Júnior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 8 de abril de 2016.

“Dizem que a persistência se torna uma virtude,
mas na verdade a persistência se torna uma
atitude dos determinados”
(Renato S. Domingos)

Dedico este trabalho a uma dupla
formidável, meus pais: Luis e Eliane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser a luz que me ilumina em todos os momentos e por mais essa etapa realizada.

Aos meus pais, Luis e Eliane, que sempre estiveram ao meu lado, por sempre acreditarem em mim, por entenderem as minhas ausências e pela paciência, amor, amizade e broncas. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino Andrade, pela oportunidade de poder trabalhar no LEM e realizar este projeto. Obrigada pelas orientações, conselhos, puxões de orelha e confiança ao longo destes anos. Aprendi e aprendo muito com você todos os dias.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pelas orientações, paciência para as infinitas dúvidas e problemas que foram aparecendo ao longo da execução dos experimentos, por não me permitir desistir nos piores momentos e principalmente por ter me passado esse amor pela pesquisa científica. Obrigada por toda ajuda sempre.

Aos meus amigos, obrigada do fundo do meu coração por toda a paciência que tiveram comigo, com o carinho, o apoio, a amizade e por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Obrigada especialmente para Carol Higashi, Maria Thereza, Milton e Luiza, a família que Londrina me deu de presente, a vocês devo tudo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana e agregados dessa grande família, principalmente a: Marta, Miguel, Glenda, André, Ana Carolina, Bárbara, Juan, Vivi, Vanessa, Igor, Caroline, Renata, João, Maria Luiza, Emanuelle, Allan, Alejandra, Emanuel, Alane, Gil e Eliandro, pelos cafés, ajuda nos experimentos (principalmente, trabalhar no escuro às vezes), conversas, apoio e amizade! Vocês fizeram meus dias mais felizes.

Ao Laboratório de Espectroscopia (ESPEC), Laboratório de Análises de Materiais e Moléculas (LAMM) e Laboratório de Microscopia Eletrônica e

Microanálise (LMEM) pela ajuda e realizações dos experimentos de RMN, massas e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente.

Ao Prof. César Augusto Tischer, pela ajuda na realização e sugestões de experimentos de espectroscopia de massas.

Ao Prof. Fernando César de Macedo Júnior, pela ajuda na realização e sugestões de experimentos de RMN.

A Prof. Gisele Silva de Aquino, pelas correções e sugestões desde da banca de defesa de projeto, que contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano, por gentilmente ter cedido algumas das cepas utilizadas neste trabalho.

Aos professores e coordenadores do programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina por ajudarem e fornecerem condições para a realização deste estudo.

Ao CNPq e CAPES por tornar este estudo possível através do financiamento do projeto e concessão de bolsa.

E muito obrigada a todos que direta ou indiretamente ajudaram nas pesquisas e experimentos realizados neste projeto.

SIMIONATO, Ane Stéfano. **Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2016. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O etanol combustível possui uma queima limpa e é derivado de produtos agrícolas renováveis, sendo uma alternativa para a alta dependência mundial de petróleo. A fermentação industrial para produção do etanol é um processo não-estéril, e desta forma, pode ocorrer o aumento da população de bactérias contaminantes, diminuindo a produção e causando perdas econômicas significativas ao setor. Outro ponto crítico para a fermentação alcoólica é a formação de biofilme nos equipamentos do processo fermentativo, devido a difícil identificação e controle. Este trabalho teve como objetivo a purificação e identificação dos metabólitos com ação antimicrobiana afim de controlar contaminantes microbianos em fermentadores. Os compostos produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV foram purificados através de métodos cromatográficos e todas as frações obtidas foram testadas quanto a atividade antimicrobiana pela técnica de disco difusão e spot-on-lawn. A fração semi-purificada CF9 apresentou aditismo com nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (bio-AgNP) para células planctônicas de todos os microrganismos testados. O composto isolado CF9d apresentou atividade antimicrobiana seletiva para células planctônicas de *Lactobacillus* sp. Outro composto isolado do metabolismo secundário, CF4b, mostrou atividade inibitória na formação de biofilme de 26,51% com 62,5 µg/mL para *Lactobacillus fermentum* e 34,93% com 31,25 µg/mL para *Leuconostoc mesenteroides*. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com trabalhos realizados anteriormente, tornando as frações e compostos isolados uma alternativa para o desenvolvimento de novos produtos para o controle da contaminação microbiana e formação de biofilmes na produção de etanol.

Palavras-Chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobianos. Nanopartícula de prata. *Lactobacillus* sp. Biofilme. Sucroalcooleiras.

SIMIONATO, Ane Stéfano. **Bioproducts for bacterial contamination control in alcoholic fermentation.** 2015. 83p. Dissertation (MSc in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The fuel ethanol has a clean burning and is derived from renewable agricultural products, being an alternative to the high world dependence on oil. The industrial fermentation for ethanol production is a non-sterile process, increase in the population of bacteria contaminants, decreasing production and causing significant economic losses to the sector. Another critical point to the alcoholic fermentation is the formation of biofilm on equipment of the fermentation process, due to difficult identification and control. This work had as objective the purification and identification of metabolites with antimicrobial action in order to control microbial contaminants in fermenters. The compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV were purified by chromatographic methods and all the fractions obtained were tested for antimicrobial activity by disk diffusion technique and spot-on-lawn. The semi-purified fraction CF9 presented aditismo with silver nanoparticles biologically synthesized (bio-AgNP) to planktonic cells of all organisms tested. The compound isolated CF9d showed selective antimicrobial activity to planktonic cells of *Lactobacillus* SP. Another compound isolated from secondary metabolism, CF4b, showed inhibitory activity on biofilm formation of 26.51% with 62.5 µg/mL for *Lactobacillus fermentum* and 34.93% with 31.25 µg/mL for *Leuconostoc mesenteroides*. The results obtained from this study confirm the results previously obtained, making the fractions and isolated compounds as an alternative to the development of new products for the control of microbial contamination and biofilm formation in ethanol production.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial. *Lactobacillus* sp. Silver nanoparticle. Biofilm. Sugar and alcohol industries.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos e outros metabólitos microbianos bioativos de acordo com seus produtores..... | 28 |
| Tabela 2 - Antibióticos produzidos por <i>Pseudomonas</i> sp..... | 30 |
| ARTIGO 1 | |
| Tabela 1 - Rendimento (mg) dos extratos brutos, FD (Fase Diclorometano) e FA (Fase acetato de etila) obtidos nas extrações com diclorometano e acetato de etila do sobrenadante concentrado dos diferentes meios de cultivo utilizados (sem adição de cobre, 5 mg/L de CuCl ₂ e 10 mg/L de CuCl ₂)..... | 52 |
| Tabela 2 - Halo de inibição (mm) em teste de disco difusão dos extratos brutos FD (Fase Diclorometano) e FA (Fase Acetato de etila) obtidas através das extrações com solventes orgânicos (diclorometano e acetato de etila) do sobrenadante concentrado dos diferentes meios de cultivo utilizados (sem cobre, 5 mg/L CuCl ₂ e 10 mg/L de CuCl ₂) contra os microrganismos selecionados..... | 52 |
| Tabela 3 - Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas no processo de purificação por Cromatografia Flash (CF) do extrato bruto FD (Fase Diclorometano) através de método de difusão em ágar para os compostos de média polaridade (CF1 a CF6) e por <i>Spot-on-lawn</i> para as frações polares (CF7 a CF11)..... | 52 |
| Tabela 4 - Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas na purificação da fração CF9, obtida através da purificação do extrato bruto FD, por CCD-prep através de método <i>Spot-on-lawn</i> | 53 |
| Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos biológicos, CF9 e nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (bio-AgNP), isolados e em combinação..... | 53 |

ARTIGO 2

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1 - | Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas no processo de purificação por Cromatografia Flash do extrato bruto FD através de método de difusão em ágar para os compostos de média polaridade (CF1 a CF6) e por <i>Spot-on-lawn</i> para as frações polares (CF7 a CF11)..... | 71 |
|-------------------|---|----|

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| Figura 1 - | Fases do processo de formação do biofilme: adesão reversível das células (1), adesão irreversível (2), formação de microcolônias e maturação (3), biofilme maduro (4) e ruptura do biofilme e desadesão (5)..... | 26 |
| ARTIGO 1 | | |
| Figura 1 - | Cromatograma do composto CF9d em coluna C18 RP-HPLC com detecção de 210 nm | 54 |
| Figura 2 - | Microscopia eletrônica de varredura do isolado de dorna <i>Lactobacillus</i> sp. (A) e (B): bactérias não tratadas com a fração CF9, 4 horas após incubação (controle positivo); (C) e (D): bactérias tratadas com a fração CF9 ($39 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 4 horas do tratamento | 55 |
| Figura 3 - | Microscopia eletrônica de varredura do <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1629. (A) e (B): bactérias não tratadas com a fração CF9, 4 horas após incubação (controle positivo); (C) e (D): bactérias tratadas com fração CF9 ($156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 4 horas do tratamento | 56 |
| Figura Suplementar 1 - | Gráfico de varredura por espectrofotômetro da amostra CF9d, entre os comprimentos de onda de 190 nm e 390 nm | 57 |
| Figura Suplementar 2 - | Espectro de massas do composto CF9d em modo positivo (ACN LC-MS) | 58 |
| ARTIGO 2 | | |
| Figura 1 - | Cromatograma do composto CF4b em coluna C18 RP-HPLC com detecção de 264 nm. | 72 |

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| Figura 2 - | Efeitos das diferentes concentrações do composto CF4b frente ao <i>Lactobacillus fermentum</i> CCT 1629, microrganismo formador de biofilme, na formação de biofilme..... | 72 |
| Figura 3 - | Efeitos das diferentes concentrações do composto CF4b frente ao <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , microrganismos formadores de biofilme, na formação de biofilme..... | 73 |
| Figura Suplementar 1 - | Espectro de RMN H do composto natural organometálico (CF4b) produzido pela <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV (300 MHz; CDCl ₃)..... | 74 |
| Figura Suplementar 2 - | Espectro de ESI-MS (modo positivo) do composto natural organometélico (CF4b) produzido pela <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa LV..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|--|
| Abs | Absorbância |
| AN | Ágar Nutriente |
| bio-AgNP | Nanopartícula de prata sintetizada biologicamente |
| CCD | Cromatografia por Camada Delgada |
| CCD-prep | Cromatografia em Camada Delgada preparativa |
| CCD-a | Cromatografia em Camada Delgada analítica |
| CCT | Coleção de Culturas Tropical |
| CDCl ₃ | Clorofórmio deuterado |
| CD ₃ OD | Metanol deuterado |
| CF | Cromatografia Flash |
| CF4 | Cromatografia Flash Fração 4 |
| CF9 | Cromatografia Flash Fração 9 |
| CF4b | Cromatografia Flash Fração 2 da Fração CF4 |
| CF9d | Cromatografia Flash Fração 4 da Fração CF9 |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CN | Caldo Nutriente |
| D.O. | Densidade Óptica |
| EM | Espectroscopia de Massas |
| FA | Fração Acetato de Etila |
| FD | Fração Diclorometano |
| FIC | Fração de concentração inibitória |
| LV | Lesão Velha |
| mAU | mili unidades de Absorção |
| MCC | Meio Caldo-de-cana Clarificado |
| MEV | Microscopia Eletronica de Varredura |
| MWD | <i>Multiple Wavelength Detector</i> |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| rpm | Rotações por minuto |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônia |
| UV | Ultravioleta |
| VIS | Visível |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 18 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 | BIOCOMBUSTÍVEIS..... | 19 |
| 3.2 | BRASIL E O ETANOL..... | 19 |
| 3.3 | PRODUÇÃO DE ETANOL | 21 |
| 3.4 | INTERFERENTES NA PRODUÇÃO DE ETANOL | 23 |
| 3.4.1 | Contaminação Bacteriana | 23 |
| 3.4.2 | Biofilme..... | 25 |
| 3.5 | BIOPRODUTOS DE ORIGEM MICROBIANA | 27 |
| 3.5.1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 |
| 3.5.2 | Nanopartículas de Prata..... | 31 |
| 3.7 | PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS POR CROMATOGRAFIA | 32 |
| 3.7.1 | Cromatografia por Camada Delgada..... | 33 |
| 3.7.2 | Cromatografia por Adsorção | 33 |
| 4 | ARTIGOS | 36 |
| Artigo 1 | Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica..... | 37 |
| Artigo 2 | Bioprodutos para o controle da formação de biofilme na fermentação alcoólica..... | 59 |
| 5 | CONCLUSÕES | 76 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 77 |

1 INTRODUÇÃO

O mundo se tornou altamente dependente dos benefícios energéticos do petróleo, mas a partir do século XX com a crise do petróleo em 1973 e com o esgotamento inevitável do abastecimento de energia, houve um crescente interesse mundial em fontes alternativas de energia (VON SIVERS; ZACCHI, 1996, ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000). Assim, muitos países têm buscado novas alternativas para a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis (GOLDEMBERG, 2007).

A obtenção de etanol no Brasil é feita principalmente através da fermentação do caldo de cana-de-açúcar devido as condições de clima e solo, sendo possível o cultivo em todo território e durante todo o ano (LIMA, 2001). Devido a estes fatores, o país é o segundo maior produtor de etanol no mundo, e possui mais de 335 usinas (SILVA, 2015) em funcionamento. A produção da safra 2014/2015 foi de 29,66 bilhões de litros de etanol e estima-se uma produção de 29,21 bilhões de litros para a safra 2015/2016 de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2016).

Para a produção do etanol, por fermentação do caldo, é necessário controlar a contaminação microbiana que pode diminuir em até 90% a produtividade, causando perdas devido ao consumo principalmente da sacarose e ácidos orgânicos e/ou CO₂, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos liberados na dorna (NOBRE, 2005). Dentre os microrganismos contaminantes, os principais são bactérias Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* (GALLO, 1989, SKINNE; LEATHERS, 2004, ANDRIETTA *et al.*, 2007).

Várias estratégias têm sido estudadas e algumas estão sendo utilizadas para controlar a contaminação microbiana no processo fermentativo para a produção do etanol. As principais estratégias para controlar a contaminação na dorna são feitas com a adição de ácido sulfúrico no final de cada ciclo fermentativo, dióxido de enxofre, antimicrobianos químicos convencionais e tratamentos térmicos (AMORIM, 2005).

Existem diversos antimicrobianos sintéticos e semissintéticos no mercado à disposição da indústria alcooleira, mas não há um só capaz de controlar todos os microrganismos contaminantes sem afetar a levedura fermentadora (AMORIM, 2005). Apesar da efetividade, o uso dos antimicrobianos convencionais de forma contínua e / ou indevida, pode levar ao surgimento de resistência aos antimicrobianos. Bischoff *et al.* (2007) avaliaram os níveis de resistência aos antimicrobianos entre os contaminantes bacterianos isolados de fermentadores e demonstraram que concentrações inibitórias mínimas para ampicilina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, Synercid (Quinupristina e Dalfopristina) e virginiamicina foram maiores em isolados provenientes dos fermentadores.

Neste sentido, a busca por novos produtos naturais vem aumentando a cada dia, principalmente compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de microrganismos e plantas. Compostos do metabolismo secundário produzidos por microrganismos antagonistas, quando em competição, podem apresentar atividade antimicrobiana (de OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dentre os gêneros microbianos com potencial biotecnológico para isolamento de bioativos antimicrobianos, a *Pseudomonas* tem grande destaque, uma vez que, produz uma ampla variedade de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento ou metabolismo de outros microrganismos.

O uso destes compostos com atividade antimicrobiana no controle de bactérias contaminantes na dorna durante a fermentação etanólica pode ser uma estratégia promissora para a redução das perdas em razão da degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, que ocasionam perda de açúcar e inviabilização das leveduras (OLIVA-NETO, YOKOYA, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, extrair e purificar bioativos antimicrobianos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV para controle de bactérias contaminantes da produção do etanol combustível.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos e bioativos isolados e nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente para controle de bactérias contaminantes da produção do etanol combustível;
2. Avaliar a interação antimicrobiana dos compostos e bioativos isolados e nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente;
3. Identificar alterações populacionais e morfológicas de bactérias contaminantes da produção do etanol combustível por microscopia eletrônica de varredura;
4. Avaliar o potencial de bioativo isolado para controle de biofilme formados por bactérias contaminantes da produção do etanol combustível.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Com o esgotamento inevitável de fontes não renováveis de energia do mundo, há um crescente interesse mundial em fontes alternativas de energia (VON SIVERS; ZACCHI, 1996, ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000). Globalmente, muitos países têm explorado opções para a substituição de combustível fóssil por biocombustíveis (GOLDEMBERG, 2007).

O conceito de converter açúcares derivados da cana-de-açúcar para biocombustíveis de transporte foi proposto pela primeira vez na década de 1970 (STEPHANOPOULOS, 2007). A ideia se tornou uma realidade e, a cada ano aumenta a substituição dos combustíveis líquidos derivados do petróleo por biocombustíveis como o etanol.

O programa brasileiro de etanol (ProÁlcool) foi iniciado para reduzir as importações de petróleo, mas logo percebeu-se que tinha importantes benefícios ambientais e econômicos, tornando-se o programa de energia de biomassa mais importante do mundo (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999). O Brasil é maior produtor e exportador mundial de etanol de cana-de-açúcar e detém as melhores tecnologias de produção servindo como modelo para as indústrias mundiais. Com isso, a União Europeia e os Estados Unidos da América (EUA) definiram metas governamentais para substituição de combustíveis fósseis por etanol.

Atualmente o Brasil tem mais de 335 (SILVA, 2015) usinas em funcionamento e a produção da safra 2014/2015 foi de aproximadamente 28,66 bilhões de litros de etanol de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) e estima-se em 29,21 bilhões de litros para safra 2015/2016, um aumento de 1,9% (CONAB, 2016). Para a safra de 2020/21, a projeção é de 65 bilhões de litros, dos quais 50 bilhões para consumo de veículos (VAREJÃO, 2009).

3.2 BRASIL E O ETANOL

A produção de etanol no Brasil tem uma importante história (NASS; PEREIRA; ELLIS, 2007). Proveniente de Nova Guiné, a cana-de-açúcar chega ao Brasil em 1532 trazida pelos colonizadores portugueses. Em São Vicente, o colonizador Martin Afonso de Souza construiu o primeiro engenho brasileiro, onde ao seu redor houve um rápido desenvolvimento populacional e econômico. Assim surgia a primeira atividade econômica brasileira (UNICA, 2015a).

Com a chegada dos primeiros veículos no Brasil, em 1871, e a dependência praticamente que total dos combustíveis fósseis, surgiram novas alternativas de combustíveis, sendo o etanol a mais promissora.

Em 20 de fevereiro de 1931, foi aprovado o decreto 19.717 que regulamentava a adição de 5% de etanol anidro nacional à gasolina importada, motivando a produção do biocombustível e barateando o preço do combustível (UNICA, 2015a).

Com a 1ª Crise do Petróleo em 1973, devido ao conflito entre os países árabes produtores de petróleo pelos membros da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) aos países que apoiaram Israel na guerra Yom Kippur, o preço do barril de petróleo subiu mais de 300%, saindo de US\$ 3 para US\$ 12 (OPEC, 2015). Com isso, para estimular a substituição em larga escala dos combustíveis fósseis para o etanol o governo cria em 14 de novembro de 1975, o Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool). Este programa foi essencial à fermentação do etanol e desenvolvimento de tecnologia de produção. Na primeira fase do projeto, o governo federal determinou a substituição do chumbo tetraetila misturado na gasolina pelo etanol anidro (UNICA, 2015a).

Motivado pelo governo, em 1979, a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores assina um protocolo em que os fabricantes de automóveis deveriam desenvolver novas tecnologias para a produção em série de carros com motores movidos somente com etanol hidratado (STEPHANOPOULOS, 2007). Em conjunto foi determinado a redução do Imposto sobre Produto Industrializado (IPI) para estes veículos e a queda do preço do etanol para 64,5% do preço da gasolina. Neste mesmo ano é lançado o primeiro carro movido a álcool no Brasil, o Fiat 147.

Em 1979, devido a revolução islâmica, houve a paralização do setor petrolífero do Irã provocando a segunda crise do petróleo. O preço do barril de petróleo dispara de US\$ 12 para US\$ 40 (IPEA, 2015). Esta nova crise foi essencial para alavancar o programa ProÁlcool no Brasil e atrair a atenção mundial para o país. Em 1985, o Programa ProÁlcool está em ascensão, mais de 96% dos automóveis vendidos eram de motores a álcool. Mas a partir de 1986 começa o declínio do projeto, com o fim do conflito na região do Irã e a queda do preço do barril de petróleo. Devido a uma grande crise econômica no país, houve uma queda brusca da venda de automóveis, que foi acentuada pela inflação de 1989. Em 1990, há a queda do preço do barril de petróleo, que juntamente com a crise econômica instalada no país faz com que o governo reduzisse os incentivos à produção de etanol. Assim, a partir de 1991, o Brasil começa a importar etanol dos EUA (UNICA, 2015a).

Mas o etanol acabou ganhando destaque novamente em 1997 com o Protocolo de Kyoto, que estabeleceu metas para o período entre 2008 e 2012 de redução das emissões de gases estufa em pelo menos 5% em relação aos níveis de 1990 pelos países industrializados. Entretanto, o acordo só ganhou força em 2005 com a Rússia assinando o protocolo. No total 192 países ratificaram o protocolo, incluído o Brasil (TUFFANI, 2015). Apesar dos acordos, de 2005 a 2012, as emissões de gases aumentaram em 16,2%, em vez de diminuir.

Assim, em 2003, visando as constantes preocupações com o meio ambiente e reavivar o incentivo ao uso do etanol combustível, foi lançado o primeiro carro Flex, onde o consumidor poderia escolher que combustível usar na hora de abastecer e não mais na compra do carro. Em 2007, o etanol combustível supera as vendas da gasolina (UNICA, 2015a). Com a boa aceitação do mercado, a indústria automobilística investe fortemente na tecnologia dos carros Flex, chegando a marca de 20 milhões de carros Flex vendidos em 2013.

3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

A principal matéria-prima para produção de etanol no Brasil é a cana-de-açúcar. O cultivo de cana-de-açúcar, cientificamente conhecida por *Saccharum officinarum* L., é semi perene, que se adapta bem em regiões de clima tropical, necessitando de alta disponibilidade de água, temperaturas elevadas e alto índice de radiação solar. As plantas atingem o período de maturação com o período de inverno, onde a estação mais seca favorece o acúmulo de sacarose nos colmos da cana-de-açúcar. A colheita é realizada entre abril e novembro na região centro-sul e entre novembro e abril na região nordeste.

Após a colheita, a cana-de-açúcar passa por um processo de lavagem, onde serão retiradas as impurezas mais grossas, como areia e terra, por exemplo. As plantas também passam por eletroímãs que evitam a passagem de metais para o próximo processo (LIMA, 2001).

Os colmos são desfibrilados para passar pelo processo de moagem, onde são triturados por um conjunto de rolos, denominados ternos, para a extração do caldo e separação da parte sólida. O bagaço é utilizado como fonte de energia para usina e representa 30% de todo o processo. A energia gerada pela queima desse resíduo é utilizada pela usina principalmente para aquecer as caldeiras e toda a energia excedente é vendida às concessionárias de energia (UNICA, 2015b).

O caldo obtido após a moagem precisa passar por alguns processos antes de ser fermentado para a retirada de impurezas. Primeiramente, o caldo passa por peneiras para a retirada de impurezas insolúveis, como resíduos de terra, bagacilhos, por exemplo. Posteriormente o caldo passa por procedimentos físico-químicos, conhecido como clarificação, para a decantação e remoção de impurezas insolúveis que não foram retirados na filtragem e de impurezas solúveis e coloidais. Antes de iniciar para a fermentação propriamente dita, o caldo é aquecido até 105 °C para esterilização e depois a temperatura cai para 30 °C (UNICA, 2015b; LIMA, 2001).

O caldo, então, é levado aos tanques (dornas) de fermentação juntamente com a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, onde haverá a quebra da molécula de sacarose e produção de etanol e dióxido de carbono. Após 8 a 12 horas obtém-se o vinho fermentado, com levedura, açúcar não fermentado e 10% de álcool. O vinho fermentado é centrifugado para a reaproveitar o fermento de levedura para uma nova fermentação e o vinho é encaminhado para a destilação (LIMA, 2001).

A destilação ocorre em colunas de destilação e obtém-se o etanol hidratado, com teor alcoólico de 96%. Para ser misturado à gasolina combustível, o etanol passa pelo processo de desidratação para atingir o teor alcoólico de 99,5% (álcool anidro) (UNICA, 2015b). O etanol anidro e hidratado são armazenados em tanques, até serem transportados as distribuidoras e chegar ao consumidor final (LIMA, 2001).

3.4 INTERFERENTES NA PRODUÇÃO DE ETANOL

3.4.1 Contaminação Bacteriana

Para a produção do etanol, por fermentação do caldo, é necessário controlar a contaminação microbiana que pode diminuir a produtividade, causando perdas devido ao consumo do açúcar para a produção de ácidos orgânicos e CO₂, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos liberados na dorna (NOBRE, 2005).

Os microrganismos contaminantes no processo são os mesmos encontrados no solo da lavoura de cana, já que este é um grande reservatório de microrganismos. Assim, a contaminação presente no processo pode ser adquirida mediante a introdução de solo aderida ao caule, carregadas pelas correntes aéreas, das danificações sofridas pela colheita manual ou pela queima da cana (BERNARDES *et al.*, 2007), além da própria microbiota presente na matéria prima. Dentre os microrganismos contaminantes, as principais bactérias são Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* (GALLO, 1989, SKINNER; LEATHERS, 2004, ANDRIETTA *et al.*, 2007). As contaminações bacterianas de 10⁸ a 10⁹ células/mL podem causar quedas de 14 a 90% no rendimento da fermentação (ALTERTHUM *et al.*, 1984).

Várias estratégias têm sido estudadas e algumas estão sendo utilizadas para controlar a contaminação bacteriana no processo fermentativo durante a produção do etanol. Um bom exemplo é o uso do ácido sulfúrico no final de cada ciclo fermentativo, porém, esse procedimento pode interferir no metabolismo e

fisiologia do fermento (DORTA, 2006). O dióxido de enxofre também pode ser usado, no entanto, sua utilização pode afetar o desenvolvimento de algumas cepas de *S. cerevisiae*. Além destes compostos químicos, o uso de antibióticos convencionais tais como: pentaclorofenol, hexaclorofeno, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e clorotetraciclina, Kamoran e virginiamicina também são estratégias para controlar a contaminação na indústria sucroalcooleira.

Day *et al.* (1954) testaram vários antibióticos tais como penicilina, aureomicina, cloromicetina, terramicina, estreptomicina, tirotricina, bacitracina e polimixina B contra *Lactobacillus* spp. e a microbiota mista obtida a partir dos fermentadores. Eles observaram que todos os antibióticos inibiram os contaminantes típicos associados à fermentação bioetanólica, no entanto, a eficiência variou de acordo com o antibiótico utilizado.

Apesar da efetividade, um grave problema do uso de antibióticos convencionais, é a seleção de microrganismos resistentes. Bischoff *et al.* (2007) avaliaram os níveis de resistência aos antimicrobianos entre os contaminantes bacterianos isolados partir dos fermentadores. Em seu estudo, eles observaram que a concentração inibitória mínima de ampicilina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, synercid e virginiamicina foram maiores em isolados provenientes dos fermentadores. Os resultados obtidos nestes estudos demonstram que o uso de antibióticos e o aumento de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais podem limitar sua eficácia no controle bacteriano na produção de etanol combustível em usinas em um futuro próximo (BISCHOFF *et al.*, 2009). A resistência aos antibióticos é muitas vezes retratada como uma consequência indesejável do abuso de antibióticos ou uso indevido (ASM, 2009).

Uma alternativa que vem sendo implementada é o extrato de lúpulo, um bactericida natural produzido através da extração com CO₂ de β-ácidos (lupulonas, colupulonas e adlupulona) do lúpulo (LEITE, 2011). Estes possuem atividade contra bactérias Gram positivas e determinadas algas. O produto comercial BETABIO 45, na dose de 10 ppm, reduz em aproximadamente 90% a população de microrganismos contaminantes (BETABIO, 2015). Segundo o estudo de Leite (2011), este produto na concentração usual no processo fermentativo, 10 ppm, reduz as células viáveis de *S. cerevisiae*, de $2,7 \cdot 10^8$ UFC/mL no início do processo

para $4,0 \cdot 10^6$ UFC/mL no final do processo. Outros produtos comerciais a base de extrato de lúpulo estão disponíveis no mercado como o IsoStab, e o LactoStab.

Entretanto, ainda são poucas as alternativas encontradas que controlem a contaminação bacteriana na fermentação da dorna durante a produção do etanol, por isso, são urgentes e necessárias a busca por novos produtos e/ou composições.

3.4.2 Biofilme

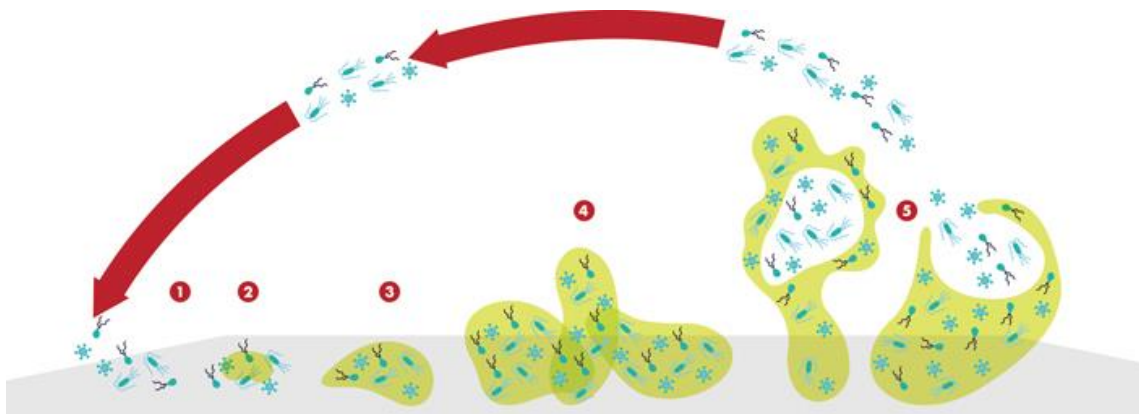
O ponto mais crítico de contaminação por microrganismos no processo fermentativo é a formação de biofilme, devido a difícil identificação e controle (MADIGAN *et al.*, 2010). Geralmente, encontram-se em fendas e cantos de canos, tanques e trocadores de calor, onde a limpeza automática dos equipamentos não consegue removê-los (SKINNER-NEMEC *et al.*, 2007). O biofilme formado nos equipamentos pode evoluir para contaminação persistente na dorna de fermentação, diminuindo gradualmente a produtividade. Além disso, pode retardar a passagem de líquidos pelos ductos, acelerando a corrosão dos mesmos e a necessidade de troca de toda a tubulação, gerando prejuízos para a usina.

O Biofilme consiste em uma comunidade de células bacterianas que crescem aderidos por uma matriz de exopolissacarídeo a uma superfície inerte ou viva. É um mecanismo de autodefesa, que favorece a sobrevivência e permanência do microrganismo em um ambiente mais favorável. São formados em 5 estágios (MADIGAN *et al.*, 2010) (Figura 1):

1. Adesão reversível das células planctônica (bactérias livres) a uma superfície sólida apropriada;
2. Adesão irreversível das células à superfície, que desencadeia a expressão dos genes específicos de formação de polissacarídeos de superfície celular;
3. Crescimento celular e síntese de polissacarídeos;
4. Desenvolvimento adicional, aumento do crescimento e de polissacarídeos, formando um biofilme maduro, aderente e quase impenetrável.

5. Desadesão - as bactérias podem sair do biofilme para procurar ambientes mais favoráveis e formar novos biofilmes.

Figura 1. Fases do processo de formação do biofilme: adesão reversível das células (1), adesão irreversível (2), formação de microcolônias e maturação (3), biofilme maduro (4) e ruptura do biofilme e desadesão (5).



Fonte: ABELSON e McLAUGHLIN, 2012.

Assim como nos contaminantes isolados na produção, os principais gêneros encontrados no biofilme são *Lactobacillus* e *Leuconostoc* devido a capacidade desses microrganismos de produzirem grandes quantidades de exopolissacarídeos (SKINNER-NEMEC *et al.*, 2007). O gênero *Lactobacillus* produz densas camadas incluídas a compostos poliméricos (ABBE *et al.*, 2011), e a principal espécie encontrada nos biofilmes de equipamentos de fermentação é o *Lactobacillus fermentum* (SKINNER-NEMEC *et al.*, 2007).

O gênero *Leuconostoc* produz dextranosacarase extracelular que converte sacarose em glucose polimérica (dextrano), que é um exopolissacarídeo altamente formador de biofilme (LEATHERS; BISCHOFF, 2011). A sacarose é o único substrato conhecido capaz de induzir o microrganismo a produzir e liberar esta enzima, que atuando em condições de excesso de substrato produzirá dextrano (SANTOS, 1999). Sendo assim, o sistema de fermentação alcoólica a partir do caldo de cana é um ambiente propício para a produção deste polissacarídeo e formação de biofilme.

Para o controle da formação de biofilme, em conjunto com o tratamento térmico, são utilizados os mesmos antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes usados frente a bactérias planctônicas, mas em concentrações mais elevadas, chegando até 100 vezes maiores (TORRES *et al.*, 2011). Isto se deve principalmente à dificuldade de penetração dos compostos nas várias camadas formadas no biofilme, pois somente há a eliminação dos microrganismos mais superficiais.

3.5 BIOPRODUTOS DE ORIGEM MICROBIANA

A busca por novos produtos naturais vem aumentando a cada dia, principalmente compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de microrganismos e plantas (BÉRDY, 2005). O metabolismo é um conjunto de reações bioquímicas que ocorrem no interior das células, no caso de microrganismos é dividido em metabolismo primário e secundário. No metabolismo primário são produzidos compostos que são essenciais a sobrevivência celular durante a fase de crescimento exponencial. Os metabólitos secundários de microrganismos, produzidos ao final da fase de crescimento exponencial ou próximo ao início da fase estacionária, são moléculas orgânicas complexas e precisam de reações enzimáticas específicas para sua síntese (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários não são essenciais ao crescimento e reprodução do microrganismo. Sua síntese depende quase que exclusivamente das condições de cultivo, especialmente em relação à composição do meio e do ambiente (temperatura, luminosidade, agitação, entre outros). A grande maioria dos metabólitos secundários são moléculas orgânicas complexas e que requerem um grande número de reações enzimáticas para sua síntese. Estes compostos trazem vantagem às espécies produtoras e são muito importantes para a sobrevivência, pois mesmo em pequenas concentrações inibem o crescimento de outras espécies microbianas, diminuindo a competição por nutrientes (MADIGAN *et al.*, 2010).

Entre os grupos de microrganismos estudados com relação a produção de bioprodutos (Tabela 1), o grupo dos actinomicetos filamentosos possuem mais de 10 mil compostos bioativos, sendo considerado o maior grupo de metabólitos microbianos estudados (45%). Já no grupo das bactérias, os gêneros que se

destacam são *Pseudomonas* e *Bacillus*, com cerca de 3.800 compostos estudados, representando 17% de todos os metabólitos microbianos com atividade antibiótica (de Oliveira *et al.*, 2015).

Tabela 1. Antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos e outros metabólitos microbianos bioativos de acordo com seus produtores

| Fonte | Metabólitos secundários microbianos bioativos | | | |
|--------------------------------|---|-------------------------|------------------------------|---|
| | Antimicrobiano | | Metabólitos bioativos | |
| | Total | (com outras atividades) | Sem atividade antimicrobiana | (antimicrobianos e outras biotividades) |
| Bacteria | 2900 | (780) | 900 | (1680) |
| Eubactéria | 2170 | (570) | 580 | (1150) |
| <i>Bacillus</i> sp. | 795 | (235) | 65 | (300) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | 610 | (185) | 185 | (370) |
| Actinomicetos | 8700 | (2400) | 1400 | (3800) |
| <i>Streptomyces</i> sp. | 6550 | (1920) | 1080 | (3000) |
| Actinos raros | 2250 | (580) | 220 | (800) |
| Fungos | 4900 | (2300) | 3700 | (6000) |
| <i>Penicillium/Aspergillus</i> | 1000 | (450) | 950 | (1400) |
| Basidiomicetos | 1050 | (200) | 950 | (1150) |
| Leveduras | 105 | (35) | 35 | (70) |
| Total | 16500 | (5480) | 6000 | 11480 |

Fonte: Adaptado de Bérdy (2012).

A procura por compostos bioativos começou a partir da descoberta da lisozima e da penicilina pelo britânico Alexander Fleming na década de 20. Desde então, novos compostos vêm sendo descobertos, como por exemplo, com atividades antitumorais, antivirais e antiparasitários. A partir dos anos 90, houve um aumento exponencial dos números de descoberta de novos metabólitos (sobretudo compostos não antibióticos, menores e análogos), mas a ocorrência de novos grupos químicos tem diminuído (de OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Devido aos crescentes problemas com o aparecimento de novas cepas de microrganismos multirresistentes e de novas patologias tanto em humanos como em plantas, a necessidade de novos agentes terapêuticos naturais é emergencial. As novas tecnologias permitem que haja rápidos avanços nas terapias de doenças fisiopatológicas e fitopatológicas, começando a renovar os métodos clássicos de tratamento e suprir a grande demanda de novos quimioterápicos (BÉRDY, 2005).

O uso destes compostos naturais com atividade antimicrobiana no controle de bactérias contaminantes na fermentação do etanol é uma estratégia promissora para a redução das perdas em razão do consumo de sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético e/ou CO₂, que ocasionam perda de açúcar e inviabilização das leveduras (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997).

3.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é um bacilo Gram negativo, reto ou levemente curvado, medindo entorno de 1 a 5 µm de comprimento. É um microrganismo aeróbio facultativo, em condições nutricionais e ambientais apropriadas, pode crescer em ambiente tanto com a ausência ou na presença de oxigênio, mas tem melhor crescimento com a presença. São fáceis de crescer *in vitro* e são susceptíveis a mutação e modificação usando as ferramentas genéticas (CHIN-A-WOENG *et al.*, 2000). *Pseudomonas* são saprófitas, difundidas na natureza, particularmente em ambientes úmidos e dotados de potencial patogênico. É uma importante bactéria de solo, particularmente em plantas com raiz sistêmica, capaz de quebrar anéis aromáticos policíclicos hidrocarbonetos. É também um patógeno humano muito comum em pacientes imunodepressivos que apresentam infecções pulmonares.

Pseudomonas produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento ou metabolismo de outros microrganismos (Tabela 2). Algumas cepas produzem compostos antibióticos, antiparasitários, antitumorais e antifúngicos, podem produzir somente uma classe como todas elas.

No Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (UEL), há trabalhos com frações e compostos antimicrobianos isolados do metabolismo secundário da *P. aeruginosa* cepa LV. Alguns exemplos de antimicrobianos produzidos por essa cepa de *P. aeruginosa* são os compostos pertencentes ao grupo das fenazinas, como a fenazina-1-carboxiamida que possui ação frente a cepas multirresistentes Gram positivas (CARDOZO, 2013), fenazina-1-carboxílica que possui ação antifúngica frente ao fitopatógeno *Botrytis cinerea*, composto organometálico que possui ação frente a fitopatógenos como *Xanthomonas citri* pv. *citri* e *X. axonopodis* (de OLIVEIRA et al., 2011, LOPES et al., 2012) e uma fração semi-purificada, apresentou atividade antimicrobiana frente a Gram positivos e ausência de atividade em leveduras (BERANGER, 2013, GÓIS et al., 2013).

Tabela 2. Antibióticos produzidos por *Pseudomonas* sp.

| Antibiótico | Espécie/Cepa | Referências |
|----------------|--|--|
| DAPG | <i>Pseudomonas</i> spp. Q2-87 CHAO F113 PFM2 Pf-5 Q8rl-96 | Vicent <i>et al.</i> , 1991 Keel <i>et al.</i> , 1992 Shanahan <i>et al.</i> , 1992 Levy <i>et al.</i> , 1992 Howell. Stipanovic, 1979 Raaijmakers; Weller, 2001 |
| Fenazinas | <i>Pseudomonas</i> spp. 2-79RN10 30-84 PSG12 In-b-109 PCL1391 PNA1 | Weller, 1983 Pierson; Thomashow, 1992 Georgakopoulos <i>et al.</i> , 1994 Rosales <i>et al.</i> , 1995 Chin-A-Woeng <i>et al.</i> , 1998 Anjaiah <i>et al.</i> , 1998 Shanmugaiah <i>et al.</i> , 2010 |
| Oomicina A | <i>P. fluorescens</i> Hv37a | Gutterson <i>et al.</i> , 1986 |
| Pioluteorina | <i>P. fluorescens</i> Pf-5 CHAO T | Howell; Stipanovic, 1979 Keel <i>et al.</i> , 1992 |
| Pirrolnitrina | <i>P. fluorescens</i> BL915 | Ligon <i>et al.</i> , 2000 |
| Viscosinamide | <i>P. fluorescens</i> DR54 | Nielsen <i>et al.</i> , 1998 |
| Butirolactonas | <i>P. aureofaciens</i> 63-28 | Gamard <i>et al.</i> , 1997 |
| N-BBS | <i>Pseudomonas</i> sp. AB2 | Ki Kim <i>et al.</i> , 2000 |
| Pantocina | <i>P. agglomerans</i> | Wright <i>et al.</i> , 2001 |

¹ DAPG – 2,4-diacetylphloroglucinol, N-BBS – n-butylbenzenosulfonamida. Adaptado de Raaijmakers *et al.* (2002).

3.5.2 Nanopartículas de Prata

Segundo a Especificação Pública Britânica (PAS-UK), nanopartícula é um corpo que possui dimensão na ordem de 100 nm ou menor, com propriedades únicas que diferenciam as nanopartículas dos materiais de origem (FARIA-TISCHER, 2012). O espectro de ação das nanopartículas dependem principalmente do tamanho e formato, que vão de nanoparticulares planares a formatos tridimensionais (KHODASHENAS, GHORBANI, 2015).

As propriedades médicas da prata são estudadas há mais 2000 anos e vários estudos descrevem atividades antimicrobianas deste metal (PRABHU; POULOSE, 2012). A prata em seu estado metálico é inerte, mas sua forma ionizada é altamente reativa. Em microrganismos, em sua forma ionizada, a prata se liga a proteínas da parede celular e do núcleo levando a deformação celular e morte (RAI; YADAV; GADE, 2009). Devido a ação antimicrobiana, estudos em relação ao desenvolvimento e propriedades das nanopartículas de prata vem aumentando a cada dia, principalmente com relação a atividade sinérgica com antimicrobianos comerciais e naturais (MOGHADDAM *et al.*, 2015, GUDIKANDULA; MARINGANTI, 2016).

As nanopartículas de prata podem ser obtidas a partir de métodos químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos e físicos são caros e envolvem a utilização de produtos químicos de alta toxicidade e com alto potencial de risco ambiental e biológico (GUDIKANDULA; MARINGANTI, 2016), tornando os métodos biológicos uma alternativa mais viável.

Os métodos biológicos podem envolver fungos, bactérias e extratos de plantas. A utilização de extratos de plantas se deve ao fato de serem mais acessíveis, seguras, não tóxicas e possuírem uma ampla variedade de metabólitos que podem auxiliar na redução dos íons de prata (GUDIKANDULA; MARINGANTI, 2016, PRABHU; POULOSE, 2012). Já os fungos, possuem uma alta capacidade de produção das nanopartículas de prata por via intra e extracelular por possuírem excreção de enzimas e outros produtos que além de reduzirem a prata, envolvem as

nanopartículas conferindo propriedades diferenciadas, como por exemplo a maior aderência a tecidos.

3.7 PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS POR CROMATOGRAFIA

Diversos métodos de separação cromatográfica têm sido aplicados em milhares de laboratórios ao redor do mundo para decifrar os inúmeros e complexos problemas das mais variadas áreas. Variam desde os métodos mais simples até os de alta sofisticação, com variações de maior ou menor complexidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes em fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se desloca através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006, DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A palavra “cromatografia” é derivada do grego *chrom* (cor) e *grafe* (escrever) e foi atribuída pelo botânico Mikhael Semenovich Tswett em 1906, quando realizou a separação dos componentes de extratos de folhas através de uma coluna de vidros recheada com sólidos finamente divididos, e arrastou através da coluna os diferentes componentes com éter de petróleo. Antes disso, no começo dos anos de 1900, Runge e Schoenbein descreveram experimentos com tintas aplicadas em tiras de papel mergulhadas em solvente, onde foi possível observar a migração da tinta pelo papel conforme o solvente migrava no papel, surgindo assim à cromatografia por camada delgada. Em 1941, Martin e Syange descreveram experimentos cromatográficos conhecidos como cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

3.7.1 Cromatografia por Camada Delgada

A cromatografia por camada delgada (CCD) baseia-se na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. É de fácil compreensão e execução, oferece separações em breve espaço de tempo, com versatilidade, repetitividade e baixo custo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Este processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção. O adsorvente mais utilizado em cromatografias é a sílica (SiO_2). Existem vários tipos de sílica disponíveis no mercado com diferentes características adicionais, por exemplo, aglutinantes, substâncias fluorescentes, adsorventes extra puros, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

A CCD pode ser utilizada como um método quantitativo de análise, diretamente sobre a camada de adsorvente ou com a retirada da área que contenha a substância da placa que então é eluída e quantificada.

A CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas, quando se pretende a separação rápida e a identificação visual. Possui grande valor na análise de substâncias orgânicas e inorgânicas, acompanhada de reações de síntese e de processos de purificação.

3.7.2 Cromatografia por Adsorção

Método cromatográfico na qual se usam uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a adsorção refere-se a um aumento da concentração do soluto, entre as superfícies das fases móvel e estacionária. É um método simples, que não exige instrumentação excepcional. Dependendo do tamanho da coluna utilizada, é facilmente aplicada para fins

preparativos, e deve ser monitorada, principalmente, por CCD (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia em coluna tem a desvantagem de produzir cauda (efeito de difusão) e não apresenta reproduções totalmente reprodutíveis em virtude de que o absorvente de mesmo lote pode ter suas atividades variadas. A resolução pode ser aumentada usando-se um tamanho de partícula menor, desde que não tão pequeno a ponto de impedir o fluxo da fase móvel. Caso aconteça, a vazão da fase móvel através da coluna pode ser conseguida aplicando-se pressão positiva no topo da coluna ou vácuo na saída da coluna (RIBANI *et al.*, 2004).

A fase móvel arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. A velocidade de movimento descendente de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido, mais rápida será sua passagem pela coluna, e vice-versa. Quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto, sendo assim, obtém-se maior grau de pureza (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006, MALVIYA *et al.*, 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de cromatografia por adsorção mais utilizada no mundo. Possui a vantagem de ser em sistema fechado, com colunas bem empacotadas, com alta pressão e detectores acoplados, aumentando a eficiência e sensibilidade da purificação dos compostos e sua identificação (RIBANI *et al.*, 2004).

A CLAE é utilizada para avaliação quantitativa e qualitativa de amostras líquidas. As colunas utilizadas em equipamentos de CLAE vão desde as de separação por polaridade (fase normal e reversa) até as de exclusão por tamanho de molécula. As mais utilizadas são as de fase reversa (RP-HPLC) para compostos orgânicos e a de Bio-afinidade para compostos proteicos. Os solventes orgânicos que podem ser utilizados vão variar conforme o equipamento disponível, mas vão desde os mais polares, como água, até os de mais baixa polaridade, podendo ainda adicionar tampões e ácidos se houver necessidade. Ainda podem ser acoplados detectores mais simples como de detectores de múltiplos comprimentos de ondas (MWD), para identificação de compostos através de diferentes comprimentos de

onda, como mais específicos como de massas, que determina a massa de cada composto após a separação das frações (MALVIYA *et al.*, 2010).

Devido a todas as combinações possíveis de colunas, sistemas eluentes e detectores e juntamente com o alto controle destes parâmetros, a CLAE é a técnica mais versátil e reprodutível de cromatografia por adsorção.

4 ARTIGOS

Artigo 1

Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica

Ane Stéfano Simionato¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino Andrade^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

* Autor Correspondente: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970 Brasil. Fone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobiano, nanopartículas de prata, *Lactobacillus* sp, *Lactobacillus fermentum*, indústria sucroalcooleira.

Resumo

O etanol produzido a partir de cana-de-açúcar é o combustível mais limpo do mundo e é derivado de produtos agrícolas renováveis, sendo uma das soluções para a alta dependência mundial de petróleo. O sistema de produção desse etanol é feita principalmente através da fermentação de caldo de cana-de-açúcar em sistema aberto, o que propicia a contaminação microbiana, diminuindo consideravelmente a produtividade final. Este trabalho teve como objetivo a purificação e identificação dos metabólitos com ação antimicrobiana e a utilização de nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente afim de controlar e melhorar a eficiência atual no controle dos contaminantes em fermentadores. O composto isolado do metabolismo da *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV foi purificado através de métodos cromatográficos. O composto CF9d, dentre os diferentes compostos e frações, apresentou ação antibiótica seletiva frente a bactérias Gram positivas e inerte para *Saccharomyces cerevisiae*. A nanopartícula de prata sintetizada biologicamente, apresentou boa atividade antimicrobiana contra os contaminantes da dorna, tornando-se uma via alternativa de controle. Estes produtos biológicos demonstraram potencial para o desenvolvimento de novos agentes de controle de contaminantes na produção de etanol.

1 Introdução

Avanços tecnológicos relacionados a produção de biocombustíveis como o etanol são desafios importantes a serem conquistados, dada à alta demanda energética, à dependência do petróleo e o impacto ambiental causado pelo uso de combustíveis fósseis (Von Sivers e Zacchi, 1996; Aristidou e Penttilä, 2000).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo e o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. As condições favoráveis de clima e solo que propiciam o cultivo de cana-de-açúcar em praticamente todo território e durante todo o ano, sendo esta cultura utilizada como matéria-prima para produção de etanol (LIMA *et al.*, 2001).

A produção do etanol é feita por fermentação do caldo de cana em dornas abertas. Esse sistema favorece a contaminação bacteriana, a qual resulta em prejuízos ao processo por competição com as leveduras fermentativas pelos carboidratos presentes, formação de goma e floculação do fermento, diminuindo o rendimento da fermentação (Amorim, 2005; Nobre, 2005). Dentre os microrganismos contaminantes, os principais são bactérias Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus* (Gallo, 1989; Skinner e Leathers, 2004; Andrietta *et al.*, 2007).

As principais estratégias para controlar a contaminação microbiana são feitas com a adição de ácido sulfúrico no final de cada ciclo fermentativo, dióxido de enxofre, antimicrobianos químicos convencionais e naturais, como o extrato de lúpulo, e tratamentos térmicos. Mas entretanto a crescente preocupação com o desenvolvimento da resistência aos antibióticos em diversas áreas tais como humana, veterinária, agrícola e industrial, torna as intervenções com alternativas de produtos naturais, fundamentais para tornar o setor mais competitivo com redução do custo e menor impacto ambiental (ASM Report, 2009; Bérdy, 2005).

Considerando a escassez de antimicrobianos naturais de baixa toxicidade ao meio ambiente, torna-se imprescindível a descoberta de novos antibióticos e/ou composições. O objetivo deste estudo foi produzir, purificar e identificar compostos produzidos no metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e nanopartículas sintetizadas biologicamente a partir de *Fusarium oxysporum* contra contaminantes bacterianos durante processo agroindustrial de fermentação alcoólica.

2 Metodologia

2.1 Cepas Bacterianas

Foi utilizado como cepa padrão para este estudo, a cepa de *Lactobacillus* sp. isolada no processo de produção de etanol na Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA (Góis *et al.*, 2013). Foi também utilizada a cepa *Lactobacillus fermentum* CCT 1629 que foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Fernando Bittencourt Luciano da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada foi gentilmente cedida pela Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA.

O agente de biocontrole utilizado foi a *P. aeruginosa* (cepa LV, bactéria selvagem), isolada no Município de Astorga, Paraná, Brasil (Rampazo, 2004).

Todas as cepas estão estocadas em solução de glicerol 40% em nitrogênio líquido, fazendo parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

2.2 Produção e extração do sobrenadante

A ativação da cepa LV a partir do estoque criopreservado foi realizada através da inoculação em ágar nutriente (AN) com adição de 100 mg/L de cobre. A produção dos metabólitos está patenteada (Andrade *et al.*, 2008). Para definir o melhor método de produção e obtenção dos metabólitos com ação antibiótica, a cepa foi cultivada em três diferentes condições: caldo nutriente (CN) modificado (2 g/L de peptona e 1,2 g/L de extrato de carne), CN modificado com adição de 5 mg/L de cloreto de cobre II e CN modificado com adição de 10 mg/L de cloreto de cobre II. Todos os meios foram cultivados por 10 dias a 28 °C, em aeração

constante. Após o cultivo, os meios de cultivo foram centrifugados (9.000 rpm, 15 min, 4 °C) e os sobrenadantes livres de células foram concentrados em Evaporador Rotativo Büchi R-114 a 70 °C para redução de 95% do volume inicial.

Após a concentração, alíquotas de 100 mL dos sobrenadantes de cada cultivo foram transferidos para funis de separação onde foram realizadas as partições líquido-líquido na razão 1:2 (v/v) do sobrenadante e do solvente orgânico. Para cada separação, este procedimento foi repetido 5 vezes com o solvente orgânico diclorometano ou acetato de etila, obtendo-se assim a fase diclorometano (FD) e fase acetato de etila (FA). A FD e FA foram concentradas em Evaporador Rotativo Büchi R-153 a 50 °C, em seguida as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (Jouan LP3).

2.3 Purificação de metabólitos secundários

Para a purificação da FD (fase mais ativa) foi realizado o método de Cromatografia Flash (CF). Para tanto, foi utilizada uma coluna de vidro (10 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de média pressão (50 kPa). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0,04 – 0,063 mm, Macherey-Nagel) e como fases móveis os solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila ([95:05] e [50:50]), acetato de etila:metanol ([90:10]), metanol, metanol: água destilada ([90:10], [50:50]) e água destilada 100%. Foram coletados 2 mL em tubos e analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCD-a) e agrupadas conforme a semelhança química, foram obtidas 11 frações. As frações foram evaporadas e liofilizadas para obtenção dos rendimentos. As frações de média polaridade foram monitoradas quanto sua atividade antibiótica pela técnica de disco difusão e as de alta polaridade pelo método de *spot-on-lawn*. Posteriormente, este processo foi repetido para a obtenção de maior quantidade de material.

A fração CF9, que apresentou atividade antibiótica seletiva contra bactérias Gram positivas sem afetar o desenvolvimento das leveduras fermentativas, foi submetida a mais um processo de purificação através da técnica de Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCD-prep). A placa foi preparada com sílica gel (60G, Merck) em lâmina de vidro (70mm x 25 mm), a sílica foi diluída em água na proporção 2:1, aplicada sob a lâmina e ativada em estufa à 105 °C por 1h. A CF9 foi diluída em metanol e aplicada sob a lâmina. A fase móvel utilizada foi acetato de etila:metanol (50:50, v:v) e as bandas visualizadas em luz UV de 254 nm e 366 nm. As bandas foram marcadas, retiradas da placa e extraídas da sílica com metanol e filtradas em filtro de celulose regenerada de 0,20 μ m e concentrada sob ventilação forçada para obtenção dos rendimentos. As frações foram monitoradas quanto sua atividade antibiótica pela técnica de *spot-on-lawn*. Das cinco frações obtidas, a única que apresentou atividade foi a CF9d. Posteriormente, este processo foi repetido para a obtenção de maior quantidade de material.

A fração CF9d passou por uma purificação fina em CLAE semi-preparativa com coluna de fase reversa C18 (10 mm \times 250 mm, Agilent®, USA) para monitoramento de grau de pureza do composto. Foi utilizado um gradiente linear em 3 etapas: água 95% e acetonitrila 5% por 5 minutos, água 50% e acetonitrila 50% por 5 minutos e 100% acetonitrila por 5 minutos, com fluxo de 2 mL/min e detecção UV à 210 nm. O composto foi coletado separadamente, evaporados e liofilizados para obtenção do rendimento e realização dos testes microbiológicos e análises químicas.

2.4 Avaliação qualitativa dos componentes das frações obtidas

2.4.1 Cromatografia de Camada Delgada analítica (CCD-a)

A CCD-a foi realizada em cromatofolhas de alumínio (sílica – gel 60 F254, Macherey-Nagel) com 0,200 mm de espessura. Como fase móvel, foi utilizado acetato de etila:metanol (95:05, v:v) para as frações polares. As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm. Esta técnica foi utilizada para monitoramento das frações obtidas nos processos de extração e purificação.

2.5 Análises químicas

2.5.1 Espectroscopia no UV/VIS

A amostra CF9d foi solubilizada em solvente grau espectroscópico e adicionada em cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Thermo Electron Corporation BIOMATE 3 entre 190 e 390 nm para determinação do pico máximo de absorção.

2.5.2 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos junto ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massa da Universidade Estadual de Londrina em aparelho QTOF: Sistema Quadruplo e TOF para ultra alta resolução e precisão de massas – COMPACT (Bruker), para determinação da massa molecular do composto isolado.

2.6 Nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (bio-AgNP)

A bio-AgNP foi sintetizada segundo metodologia patenteados (Durán *et al.*, 2006). O fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* cepa 551, da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil), foi cultivado em um meio contendo extrato de malte (2%), extrato de levedura (0,5%) e ágar (2%) a 28 °C durante 7 dias consecutivos. A biomassa crescida foi ressuspensa em água esterilizada a 0.1 g/mL e incubada por 7 dias a 28°C. Após a filtração da biomassa, foi adicionado AgNO₃ (na concentração final de 1 mM) e mantida por vários dias a 28°C em ausência de luz. As nanopartículas de prata foram purificadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ZeraSizer NanoZS (Malvern).

2.7 Análises Biológicas

2.7.1 Disco difusão

Para monitorar frações de média polaridade e quantificar a ação antibiótica das frações, sub-frações e moléculas puras sobre os isolados de contaminantes de fermentação e *S. cerevisiae* foram realizados testes de difusão em ágar, conforme a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966). Para o teste, culturas em fase exponencial a uma concentração de 10⁸ UFC/mL (D.O. 0.14 para os isolados de *Lactobacillus* spp. e D.O. 0.22 para *S. cerevisiae*, $\lambda= 590$ nm) foram inoculadas com *swab* em placa de Petri com ágar caldo de cana-de-açúcar clarificado (MCC). Os discos contendo os compostos (frações e substâncias puras) foram colocados na placa contendo cada isolado de microrganismo. As placas foram incubadas a 34 °C/48 h e a leitura realizada através da mensuração dos halos de inibição (mm).

2.7.2 Spot-on-lawn

Este teste foi utilizado como forma de monitoramento da ação antimicrobiana das frações polares obtidas em cada etapa de produção e purificação, conforme metodologia adaptada de Lewus e Montville (1991). Culturas em fase exponencial em concentração de 10^8 UFC/mL (D.O. 0.14 para os isolados de *Lactobacillus* spp. e D.O. 0.22 para *S. cerevisiae*, $\lambda = 590$ nm)) foram inoculadas com *swab* em placa de Petri com ágar MCC. As frações foram diluídas em água estéril e 10 μ L de cada fração foi transferida para superfície do ágar. As placas foram incubadas a 34 °C/48 h e a leitura realizada através da ausência ou presença do crescimento do microrganismo na gota aplicada.

2.7.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM), bactericida e fungicida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por método de microdiluição em caldo conforme metodologia modificada preconizada pelo CLSI (2011). As placas foram incubadas a 34 °C/48 h. A CIM foi determinada quando houve 100% de inibição de crescimento bacteriano quando comparado com o controle sem adição da substância. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 μ L de cada poço foi transferida para placas de Petri contendo ágar MCC. As placas foram incubadas a 34 °C/48 h e analisadas quanto ao crescimento microbiano. As concentrações referentes às placas com ausência de crescimento bacteriano e fúngico foram consideradas bactericidas e fungicidas, respectivamente.

As cepas utilizadas neste teste foram *Lactobacillus* sp., *L. fermentum* e *S. cerevisiae*. As concentrações utilizadas para os testes de CIM foram: de 5000 μ g mL⁻¹ a 2,4 μ g mL⁻¹ para fração CF9, de 2500 μ g mL⁻¹ a 9,5 μ g mL⁻¹ para CF9d e de 0,5 μ g mL⁻¹ a 0,001 μ g mL⁻¹ μ M para bio-AgNP.

2.7.4 Análise de interação antimicrobiana entre fração CF9 e bio-AgNP

Para determinação da interação antimicrobiana entre a fração semi-purificada e as nanopartículas foi aplicada a fórmula de fração de concentração inibitória (Chin *et al.*, 1997).

$$FIC = FIC_A + FIC_B$$

$$FIC_A = \frac{CIM \text{ A (interação)}}{CIM \text{ A (sozinho)}}$$

$$FIC_B = \frac{CIM \text{ B (interação)}}{CIM \text{ B (sozinho)}}$$

Onde:

FIC é fração de concentração inibitória

CIM A (interação) é o valor de CIM para o composto A na interação

CIM A (sozinho) é o valor de CIM para o composto A sozinho

CIM B (interação) é o valor de CIM para o composto B na interação

CIM B (sozinho) é o valor de CIM para o composto B sozinho

Se:

$FIC \leq 0,5$ = sinergismo

$0,5 < FIC \leq 1$ = aditismo

$1 < FIC \leq 4$ = indiferente

$FIC > 4$ = antagonismo

A técnica de CheckerBoard será utilizada nos testes de sinergismo (CSLI, 2011). As cepas utilizadas neste teste foram *Lactobacillus* sp. e *L. fermentum*.

2.7.5 Avaliação por microscopia eletrônica

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), micro-organismos (*Lactobacillus* sp. e *L. fermentum*) foram incubados com CIM da fração CF9 para cada microrganismo. Alíquotas de 20 μ L dos tratamentos foram transferidas para lâminas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina e colocadas em estufa a 28°C por 1 h para secagem, em seguida, as lâminas foram fixadas em uma solução contendo 2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7) por um período de 12 h. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7) e pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por 1 h. As amostras foram desidratadas em etanol nas concentrações de 70, 80, 90 e 100%, e posteriormente secas em ponto crítico de CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Após a secagem as lâminas foram revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater), e finalmente foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

O procedimento foi realizado no Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

3 Resultados

3.1 Produção e extração dos compostos antimicrobianos

Nos ensaios realizados em diferentes condições de cultivo da cepa LV e com os diferentes extratores utilizados, foi possível observar uma diferença significativa nos rendimentos dos extratos brutos extraídos (Tabela 1) e das atividades antimicrobianas (Tabela 2). Com base nestes resultados, comparando o rendimento em relação a zona de inibição formada, o melhor método de produção de metabólitos ativos pela cepa LV foi com 5 mg/L de cobre, e o melhor solvente extrator foi diclorometano. Com estes resultados foi possível determinar o método de produção e extração de bioativos para todo o estudo.

3.2 Purificação dos Compostos Ativos

Após definida a produção e extração dos compostos, o extrato bruto foi submetido a métodos de purificação por CF. Foram obtidas 11 frações, sendo as frações CF2, CF3, CF4 e CF5 com atividade inibitória frente ao *Lactobacillus* spp. e *S. cerevisiae*, no entanto, somente as frações CF7 e CF9 não apresentaram atividade antimicrobiana frente a levedura (Tabela 3) (a fração CF7 está em purificação, dados não mostrados).

Para os experimentos de controle de contaminantes da produção do etanol combustível, pelo rendimento e atividade antibacteriana seletiva demonstrada, foi selecionado a fração CF9. Esta fração foi purificada através do método de CCD-prep, onde foram extraídas 5 bandas e realizados testes de monitoramento. Uma banda de cor rosa escuro e Rf 0,5, denominada CF9d, demonstrou atividade antimicrobiana frente ao contaminante e ausência de atividade na levedura (Tabela 4). Após sua extração, o rendimento da banda foi de 0,8 mg/L. Através de método desenvolvido em CLAE, foi possível observar a pureza da fração (Figura 1).

3.3 Análises químicas

O composto CF9d apresentou coloração rosa intensa, estrutura amorfa, inodoro, termorresistente e fotossensível, ocorrendo a degradação do composto em dois compostos sem atividade antimicrobiana (verificado por CCD-a, dados não mostrados).

Na varredura espectrofotométrica foi possível observar que a fração pura CF9d apresentaram picos de absorção máxima estimado em 210 nm (Figura Suplementar 1).

Em espectrometria de massas foi possível determinar a massa molecular do composto em 231,10 (Figura Suplementar 2).

3.4 Nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (bio-AgNP)

A bio-AgNP possui o tamanho de 91,84 nm, formato esférico e potencial zeta de -43,1 mV.

3.5 Análises biológicas

3.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM), bactericida e fungicida mínima

A CIM da fração CF9 foi de 39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Lactobacillus* sp. e 156,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. fermentum*, mas a fração também demonstrou atividade frente a *S. cerevisiae* com 78,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa atividade pode não ter sido demonstrada nos testes de disco devido à dificuldade do composto em difundir em meio semissólido.

A amostra pura, fração CF9d, possui uma atividade inibitória contra o *Lactobacillus* spp., apresentando CIM de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ausência de inibição frente a *S. cerevisiae*. A concentração bactericida mínima foi a mesma concentração apresentada na CIM.

A bio-AgNP possui atividade inibitória de 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Lactobacillus* sp., 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. fermentum* e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. cerevisiae*. A concentração bactericida e fungicida mínima foram as mesmas concentrações apresentadas na CIM.

3.5.2 Análise de interação antimicrobiana entre fração CF9 e bio-AgNP

Em combinação, a fração CF9 e bio-AgNP não mostrou redução de CIM para *Lactobacillus* sp em comparação com os valores de tratamento individual, apresentou FIC de 2,0, indicando uma interação indiferente. Já para *L. fermentum*, houve uma ação de aditismo entre os compostos naturais, apresentaram FIC de 0,73 (Tabela 5).

3.5.3 Avaliação populacional e morfológica por microscopia eletrônica

Nas avaliações por MEV de *Lactobacillus* sp e *L. fermentum* não tratadas com o composto CF9, foi observado paredes celulares lisas, sem alterações morfológicas e de tamanho

regulares (Figura 2A, 2B e 3A, 3B). Nas células tratadas com a concentração de $39 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração CF9 em *Lactobacillus* sp. e na concentração de $156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. fermentum* foi observado uma diminuição elevada no número de bactérias após 4 horas de tratamento (Figuras 2C, 2D e 3C, 3D).

Em maior aumento nas células tratadas com CF9, foi possível observar uma superfície celular irregular com grande número de bolhas com tamanho nanométricos (Figura 2D). Já em *L. fermentum*, além do aumento da formação desses pólipos foi possível observar alterações morfológicas com pequenos afundamentos nas células (Figura 3D).

4 Discussão

Com simples modificações nas condições de cultivo da cepa LV, foi possível observar significativo aumento tanto na produção de bioativos antimicrobianos quanto no espectro de ação dos compostos. Existem várias razões para uma grande abundância de compostos naturais com potencial biotecnológicos produzidos no metabolismo de espécies do gênero *Pseudomonas*, como, por exemplo: são isolados facilmente, habitantes comuns do solo, utilizam uma ampla gama de substratos, tem bom crescimento em diferentes condições de cultivo e possui rotas metabólicas riquíssimas (de Oliveira *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2016; Whipps 1997).

Os extratos brutos e compostos purificados produzidos e extraídos do cultivo da *P. aeruginosa* cepa LV, apresentaram importantes atividades antimicrobianas para bactérias isoladas de dornas de produção do etanol combustível (Beranger, 2013; Góis *et al.*, 2013). Estes compostos, podem ser uma alternativa para o controle da contaminação bacteriana no processo produtivo do etanol combustível. O potencial de espécies do gênero *Pseudomonas* em antagonizar patógenos e /ou seus metabólitos brutos, em controlar diferentes microrganismos, já foram demonstrados em vários estudos (Dowling e O'Gara, 1994; Raaijmakers *et al.*, 1997; Haas e Defago, 2005). A partir dos extratos brutos, vários compostos já foram isolados e identificados, incluindo compostos fenazínicos, pirrolnitriinas, compostos pyo, derivados indólicos, peptídeos, lipídeos, glicolipídeos e compostos alifáticos (Fuller *et al.*, 1971; Leisinger e Margraff, 1979; Ligon *et al.*, 2000; Raaijmakers *et al.*, 2002; Haas e Keel, 2003; Paulsen *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2006; Gross e Lopes, 2009).

O maior rendimento dos ativos brutos extraídos do cultivo da cepa LV foi diretamente relacionado com a polaridade do solvente extrator. Este fato se deve a forte afinidade dos compostos com o diclorometano. Os métodos de extração e de purificação utilizados foram, eficientes tanto na obtenção de quantidades para os ensaios laboratoriais quanto para o isolamento dos bioativos de interesse.

Durante o primeiro processo de separação, a fração CF9 demonstrou alta atividade antibacteriana. No entanto, neste grau de purificação, não apresentou seletividade para os contaminantes da produção do etanol combustível. Esse fato deve estar relacionado com uma provável ação sinérgica dos compostos quando em fração semi-purificada. Beranger (2013) observou que compostos polares produzidos no metabolismo secundário de *Pseudomonas* cepa LV quanto maior o grau de pureza menor era a atividade antibiótica, indicando uma provável ação sinérgica de compostos. Por outro lado, observamos que o primeiro composto isolado neste estudo, (CF9d) não perdeu a atividade com o grau de purificação e ainda foi

seletivo aos contaminantes (*Lactobacillus* sp. e *L. fermentum*) e não deletério para *S. cerevisiae*.

Xun *et al.* (2015) realizaram estudos com nanopartículas de prata no controle de contaminantes bacterianos no processo de fermentação de etanol combustível, obtendo CIM de $0,84 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. fermentum*, $1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Lactobacillus brevis* e $1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Pediococcus pentosaceus*. Mas as nanopartículas usada neste estudo foram sintetizadas através de métodos químicos, que envolvem a utilização de produtos químicos de alta toxicidade e com alto potencial de risco ambiental e biológico (Gudikandula e Maringanti, 2016). Além de obtermos CIM menor para *L. fermentum* ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), a bio-AgNP é sintetizada através de métodos biológicos, que são mais baratos e seguros.

Há diversos estudos com relação a interação sinérgica de drogas comerciais com nanopartículas de prata (Fayaz *et al.*, 2010; McShan *et al.*, 2015; Ruden *et al.*, 2009; Graziano *et al.*, 2015) e Cardozo *et al.* (2013) realizaram testes de interação antimicrobiana entre um composto isolado do metabolismo da *P. aeruginosa* cepa LV com bio-AgNP e obtiveram resultados de ação sinérgica entre ele (FIC de 0,281). Com base nesses estudos, foram realizados testes de interação antimicrobiana afim de investigar uma provável ação sinérgica entre os compostos. Entretanto, as combinações entre a bio-AgNP e a CF9 não apresentaram interações com potencial sinérgico, mas sim de aditismo para *L. fermentum*.

Várias estratégias têm sido estudadas e algumas estão sendo utilizadas para controlar a contaminação bacteriana no processo fermentativo durante a produção do etanol. O ácido sulfúrico é usado no final de cada ciclo fermentativo. No entanto, esse procedimento interfere no metabolismo e fisiologia do *S. cerevisiae* (Dorta, 2006). O dióxido de enxofre também pode ser usado, entretanto, o seu uso pode afetar o desenvolvimento de algumas cepas de *S. cerevisiae*. Além destes compostos químicos, o uso de antibióticos convencionais tais como: pentaclorofenol, hexaclorofeno, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e clorotetraciclina, Kamoran e virginiamicina também são estratégias para controlar a contaminação na indústria sucroalcooleira.

Poucos são os produtos naturais utilizados para controle de contaminação bacteriana na produção do etanol combustível, e dentre eles, a maioria tem algum efeito deletério para o *S. cerevisiae*. Segundo Leite (2011), o produto comercial de origem natural BETABIO 45 em concentração de 10 ppm (dose usual no processo fermentativo) reduziu em mais de 90% da população de contaminantes, mas houve uma redução de células viáveis de *S. cerevisiae*, de $2,7 \cdot 10^8$ UFC/mL no início do processo fermentativo para $4,0 \cdot 10^6$ UFC/mL no final do processo. Em ensaios de laboratório, menos de 2 ppm inibe a maioria das bactérias Gram positivas. A vantagem do composto puro CF9d em comparação com o BETABIO 45, é que mesmo em concentrações mais elevadas não há inibição da proliferação do *S. cerevisiae*.

Outro fator importante para o uso de produtos naturais como antimicrobianos, é o menor potencial destes, na contaminação ambiental. Na maioria dos cultivos de cana-de-açúcar são utilizadas as vinhaças provenientes da fermentação do caldo, como adubo, fornecendo macro e micronutrientes para as plantas (Cannellas *et al.*, 2003). Além de problemas apresentados, como alta concentração de metais e matérias orgânicas presente na vinhaça, há também a presença dos antimicrobianos utilizados no processo. Segundo estudo realizado por Lima *et al.* (1999), foram encontrados 73 isolados com resistência múltipla a antibióticos, 38% eram pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e 3 isolados deste gênero eram resistentes a 7 antimicrobianos. Foram testados sulfato de kanamicina, tetraciclina, ampicilina, sulfato de

estreptomicina, virginiamicina, penicilina e ácido nalidíxico, sendo a maioria deles utilizados no controle de contaminantes de fermentação.

O composto puro CF9b demonstrou uma rápida degradação quando exposta a luz natural (dados químicos não mostrados), perdendo sua atividade antimicrobiana. Neste sentido, CF9b possui vantagens frente a seus concorrentes comerciais de origem sintética ou natural, uma vez que, sua atividade antibiótica é rapidamente degradada sob luz visível e desta forma não afetaria a comunidade microbiana do solo e nem acumularia na cadeia trófica.

A ação bactericida da CF9 foi comprovada por MEV. As células de controle não tratadas exibiram uma parede celular lisa. As células que foram tratadas, apresentaram suas superfícies ásperas e apareceram saliências do tipo de pequenas bolhas, como observado por Kaletunç *et al.* (2004) em estudos com *L. mesenteroides* em alta pressão hidrostática. As rugosidades, que dão a característica áspera a superfície celular, podem indicar a perfuração da parede da célula para liberação de material intracelular, ocorrendo a deformação e espessamento da parede, mas essa hipótese só poderia ser comprovada com a realização da microscopia eletrônica de transmissão (Díaz-Visurraga *et al.*, 2010). Na imagem de maior aumento do *L. fermentum* tratada com CF9, além do aparecimento de rugosidades e bolhas, há depressões com pequenas rachaduras, que podem indicar uma reação do microrganismo mais avançada ao efeito da droga.

Novos estudos devem ser realizados afim de serem executados testes em escala semi-industrial. Estudos com desenvolvimento de incorporação da fração CF9 e do composto CF9d em micropartículas de alginato de sódio ou quitosana para a liberação controlada podem aumentar a efetividade e diminuir a quantidade utilizada da substância em dornas. E novas microscopias devem ser realizadas para esclarecer o mecanismo de ação da CF9 nos microrganismos contaminantes.

5 Conclusão

O presente estudo mostrou que a fração semi-purificada (CF9) extraída e purificada do metabolismo secundário da *P. aeruginosa* (Cepa LV), apresentou atividade antimicrobiana contra células planctônicas de contaminantes microbiológicos da produção de etanol. O composto isolado desta fração, CF9d, apresentou atividade antimicrobiana seletiva para bactérias Gram positivas e inerte para *S. cerevisiae*. A bio-AgNP apresentou baixa concentração inibitória mínima para os contaminantes podendo ser uma via alternativa de controle natural, mas não mostrou ação sinérgica com a CF9. A CF9, o composto isolado e bio-AgNP apresentam grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o controle de contaminantes microbiológicos na produção do etanol.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira que possa ser interpretada como um potencial conflito de interesse.

Informação de Financiamento

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal 456656/2014-1).

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fazer este estudo possível mediante a concessão de bolsas de PIBIC, MSc., PhD e produtividade. Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Espectroscopia - ESPEC UEL/FINEP por ajudar com os experimentos de RMN, Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas – LAMM UEL/FINEP por ajudar com os experimentos de massas e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise – LMEM UEL/FINEP por ajudar nos experimentos de microscopia eletrônica. Ao Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) por gentilmente ter cedido a cepa utilizada neste estudo.

Referências

- Amorim, H.V. (2005). org. Leão, R.M. *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba: Fermentec, 2005. 434 p.
- Andrade, G., Violin, M., de Oliveira, A.G. (2008). *Process of production, purification and obtation of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants*. BR Patent No PI0803350-1A. Brazil patent application.
- Andrietta, M.G.S., Andrietta, S.R., Steckelberg, C., Stupiello, E.N.A. (2007). Bioethanol – 30 years of Proálcool. *International Sugar Journal*. 109, 195-200.
- Aristidou, A., Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:187-198.
- ASM Report 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem, <http://academy.asm.org/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=440&Itemid=479> Acesso em: 12.06.2014.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 4:493-496.
- Beranger, J.P.O. (2013). Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol. [dissertação/tese de Mestrado]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 58, 1:1-26.
- Cannellas, L.P., Velloso, A.C.X., Marciano, C.R., Ramalho, J.F.G.P., Rumjanek, V.M., Rezende, C.R., Santos, G.A. (2003). Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 27:935-944.
- Cardozo, V.F., de Oliveira, A.G., Nishio, E.K., Perugini, M.R.E., Andrade, C.G.T.J., Silveira, W.D., Dúran, N., Andrade, G., Kobayashi, R.K.T., Nakazato, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12, 12: 1-8.

- Chin, N. X., Weitzman, I., Della-Latta, P. (1997). In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:4, 850–852.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement. Wayne, PA:CLSI.
- Díaz-Visurraga, J., Cárdenas, G., García, A. (2010). Morphological changes induced in bacteria as evaluated by electron microscopy. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 307-315.
- Dorta, C.O. (2006). Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*. [dissertação/tese de doutorado]. [Rio Claro (SP)]: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.
- Dowling, D.N., O'Gara, F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends. Biotechnol.* 12, 133-141.
- Durán, N., Esposito, E., Souza, G.I. de M.H. de, Marcato, P. (2006). *Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizada por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos*. BR Patente No PI 0605681-4.
- Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T., Venketesan, R. (2010) Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6, 1: 103-109.
- Fuller, A.T., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G. T., Barrow, K. D., Chain, E. B. (1971). Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature*. 234, 416-417.
- Gallo, C.R. (1989) Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. [tese/tese de doutorado]. [Campinas (SP)]: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- Góis, C.G.M., Lopes-Santos, L., Beranger, J.P.O., de Oliveira, A.G., Spago, F.R., Andrade, G. (2013). The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. *Scientific Research*. 3, 194-201.
- Graziano, T.S., Cuzzullin, M.C., Franco, G.C., Schwartz-Filho, O., Andrade, E.D., Groppo, F.C., Cogo-Müller, K.(2015). Statins and antimicrobial effects: simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm. *Plos one*. 1-17.
- Gross, H., Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1408-1446.

- Gudikandula, K.; Maringanti, S.C. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *Journal of experimental nanoscience*. 1–8.
- Haas, D., Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117-53.
- Kaletunç, G., Lee, J., Alpas, H., Bozoglu, F. (2004). Evaluation of structural changes induced by high hydrostatic pressure in *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2:1116-1122.
- Leisinger, T., Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 43, 422-442.
- Leite, I.R. (2011). Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista. [dissertação/tese de mestrado]. [Uberlândia (MG)]: Universidade Federal de Uberlândia.
- Lewus, C.B., Montville, T.J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 13, 145-150.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H. J., van Pée, Karl-Heinz. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest. Manag. Sci.* 56, 688-695.
- Lima, T.C.S., Grisi, B.M., Bonato, M.C.M. (1999). Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiologia*. 30:214-224.
- Lima, U.A.; Basso, L.C.; Amorim, H.V. (2001). Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 01-40.
- McShan, D., Zhang, Y., Deng, H., Ray, P.C., Yu, H. (2015). Synergistic antibacterial effect of silver nanoparticles combined with ineffective antibiotics on drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*. 33, 3: 369-384.
- Nobre, T.P. (2005). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. [dissertação/tese de mestrado]. [São Paulo (SP)]: ESALQ/USP.
- de Oliveira, A.G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes-Santos, L., Beranger, J.P.O., San Martin, J.A.B., Nogueira, M.A., Mello, J.C.P., Andrade, C.G.T., Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*. 56, 125-131.
- de Oliveira, A.G., Spago, F.R., Simionato, A.S., Navarro, M.O., Silva, C.S., Barazetti, A.R., Cely, M.V., Tischer, C.A., San Martin, J.A., Andrade, C.G., Novello, C.R., Mello, J.C., Andrade, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas*

aeruginosa inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontier*. 7, 113. doi:10.3389/fmicb.2016.00113.

- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.I., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S. 3rd, Thomashow, L.S., Loper, J.E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23, 873-8. doi:10.1038/nbt1110
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 699-710.
- Raaijmakers, J., Vlami, M., de Souza, J. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton. Leeuw.* 81, 537-547.
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microb.* 63, 881-887.
- Rampazo, L.G.L. (2004). Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. [dissertação/tese de mestrado]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina.
- Ruden, S., Hilpert, K., Berditsch, M., Wadhwani, P., Ulrich, A.S. (2009). Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 53, 8: 3538-3540.
- Skinner, K.A., Leathers, T.D. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 31,401-408.
- Von Sivers, M., Zacchi, G. (1996). Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. *Bioresource Technology.* 56:131-40.
- Whipps, J. M. (1997). Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. *Advanced Botanical Research.* 26, 1–133.
- Xun, P., Mingyi, Y., Hui, L., Tai, C., Park, W.G., Xuemei, L., Su-mei, Z. (2015). *Application of silver nanoparticles in controlling major contaminating bacteria in fuel ethanol fermentation production process.* CN patente No CN201510006219. China.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Rendimento (mg) dos extratos brutos FD (Fase Diclorometano) e FA (Fase Acetato de etila) obtidos nas extrações com diclorometano e acetato de etila do sobrenadante concentrado dos diferentes meios de cultivo utilizados (sem adição de cobre, 5 mg/L de CuCl₂ e 10 mg/L de CuCl₂)

| Amostras | Concentração (mg/L) | | |
|----------|---------------------|--------|---------|
| | 0 | 5 mg/L | 10 mg/L |
| FD | 26 | 32,56 | 51,11 |
| FA | 35 | 56,47 | 59,92 |

Tabela 2. Halo de inibição (mm) em teste de disco difusão dos extratos brutos FD (Fase Diclorometano) e FA (Fase Acetato de etila) obtidas através das extrações com solventes orgânicos (diclorometano e acetato de etila) do sobrenadante concentrado dos diferentes meios de cultivo utilizados (sem cobre, 5 mg/L CuCl₂ e 10 mg/L de CuCl₂) contra os microrganismos selecionados

| Microrganismos | Amostras | | | | | |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|
| | 0 | | 5 mg/L | | 10 mg/L | |
| | FA | FD | FA | FD | FA | FD |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | 11±2.8 | 15,5±0.7 | 46,5±0.7 | 49,5±0.7 | 40±0.0 | 45±0.0 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 9±2.8 | 13,5±2.1 | 40±0.0 | 37,5±0.7 | 37,5±3.5 | 44±1.4 |

Tabela 3. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas no processo de purificação por Cromatografia Flash (CF) do extrato bruto FD (Fase Diclorometano) através de método de difusão em ágar para os compostos de média polaridade (CF1 a CF6) e por *Spot-on-lawn* para as frações polares (CF7 a CF11).

| Frações | <i>Lactobacillus</i> sp. | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------|--------------------------|---------------------------------|
| CF1 | - | - |
| CF2 | +* | +* |
| CF3 | + | + |
| CF4 | + | + |
| CF5 | +* | +* |
| CF6 | - | - |
| CF7 | + | - |
| CF8 | - | - |
| CF9 | + | - |
| CF10 | - | - |
| CF11 | - | - |

+ Presença de atividade antimicrobiana

- Ausência de atividade antimicrobiana

* Baixa atividade demonstrada

Tabela 4. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas na purificação da fração CF9, obtida através da purificação do extrato bruto FD, por CCD-prep através de método *Spot-on-lawn*.

| Frações | <i>Lactobacillus sp.</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------|--------------------------|---------------------------------|
| CF9a | - | - |
| CF9b | - | - |
| CF9c | - | - |
| CF9d | + | - |
| CF9e | - | - |

+ Presença de atividade antimicrobiana

- Ausência de atividade antimicrobiana

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos biológicos, CF9 e nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (bio-AgNP), isolados e em combinação.

| Bactéria | CIM CF9 ($\mu\text{g/mL}$) | | CIM bio-AgNP ($\mu\text{g/mL}$) | | FIC |
|--------------------------------|------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|------|
| | Isolado | Combinado | Isolado | Combinado | |
| <i>Lactobacillus sp.</i> | 39,0 | 39,0 | 0,25 | 0,25 | 2,00 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 156,2 | 39,0 | 0,5 | 0,25 | 0,73 |

Figura 1. Cromatograma do composto CF9d em coluna C18 CLAE com detecção de 210 nm. A presença de um único pico em 6.237 minutos com absorção em 1187 mAU indica o alto grau de pureza do composto. Absorbância x Tempo de Retenção.

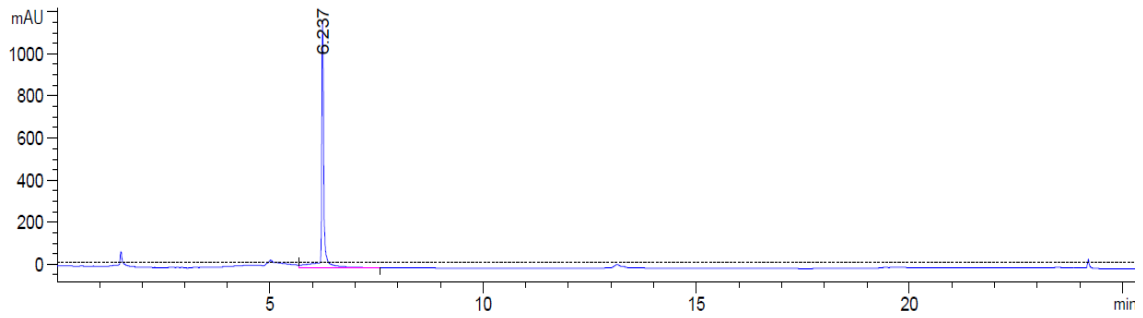


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura do isolado de dorna *Lactobacillus* sp. (A) e (B): bactérias não tratadas com a fração CF9, 4 horas após incubação (controle positivo); (C) e (D): bactérias tratadas com a fração CF9 ($39 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 4 horas do tratamento.

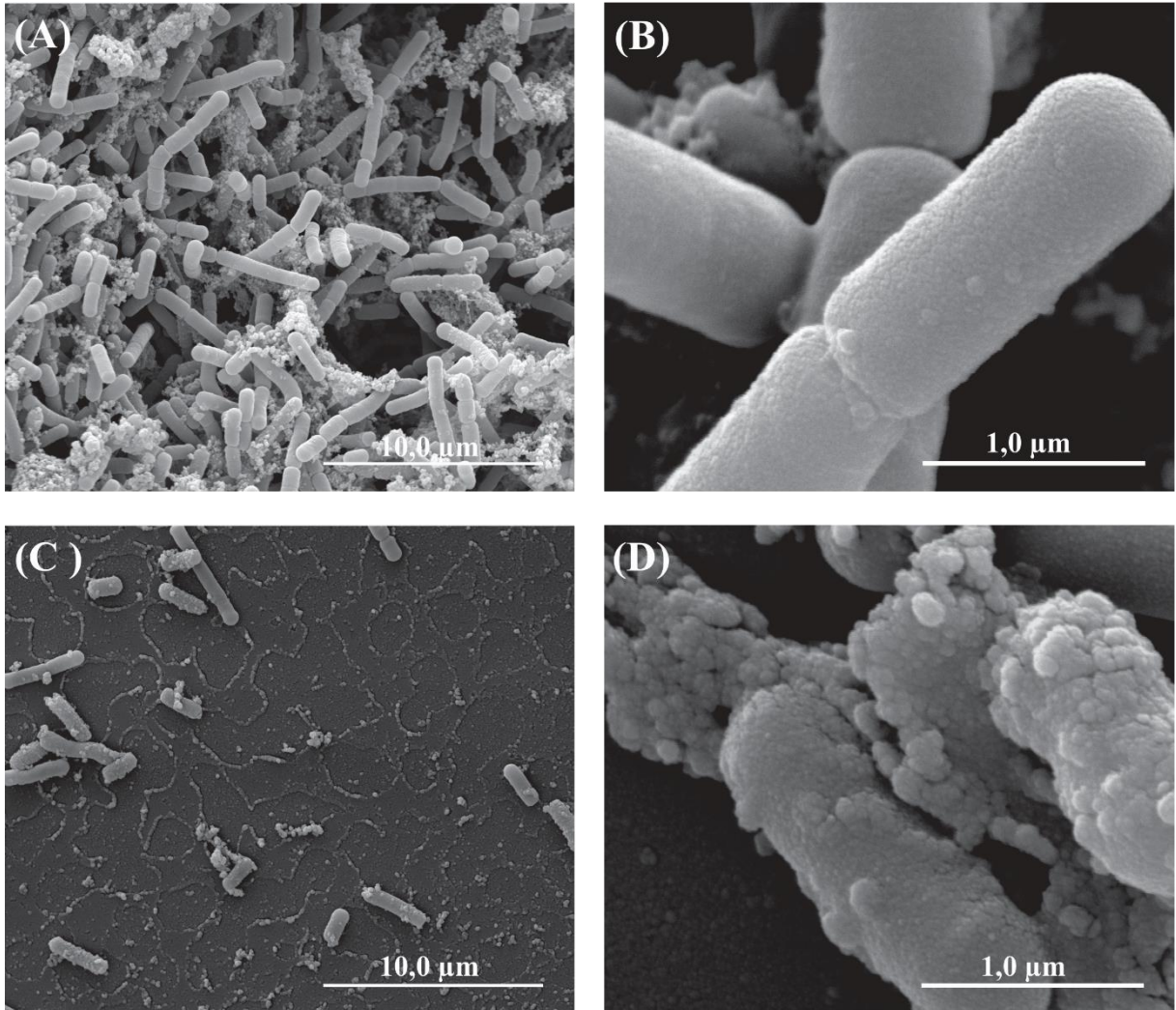
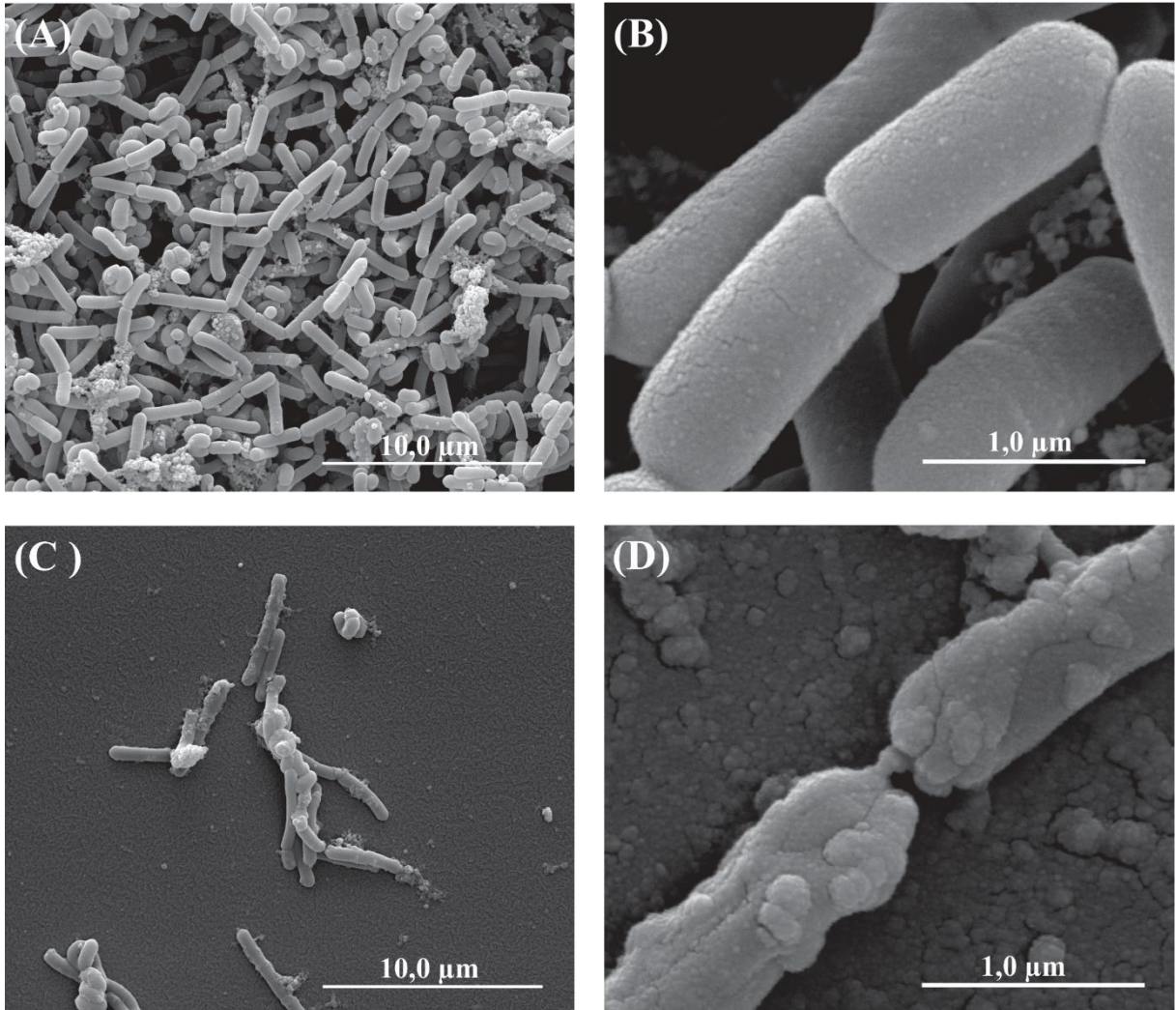


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura do *Lactobacillus fermentum* CCT 1629. (A) e (B): bactérias não tratadas com a fração CF9, 4 horas após incubação (controle positivo); (C) e (D): bactérias tratadas com a fração CF9 ($156,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 4 horas do tratamento.



Material suplementar

Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica

Ane Stéfano Simionato¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino Andrade^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

* Autor Correspondente: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Brasil. Fone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Figura Suplementar 1. Gráfico de varredura por espectrofotômetro da amostra CF9d, entre os comprimentos de onda de 190 nm e 390 nm. Pico máximo de absorção da amostra foi em 210 nm. Absorbância x Comprimento de onda

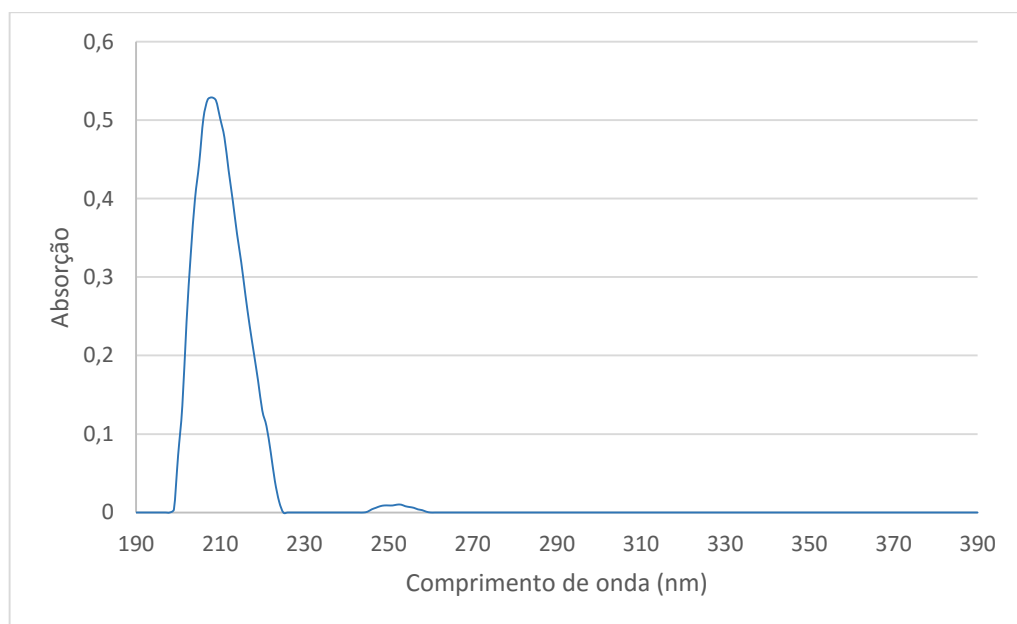
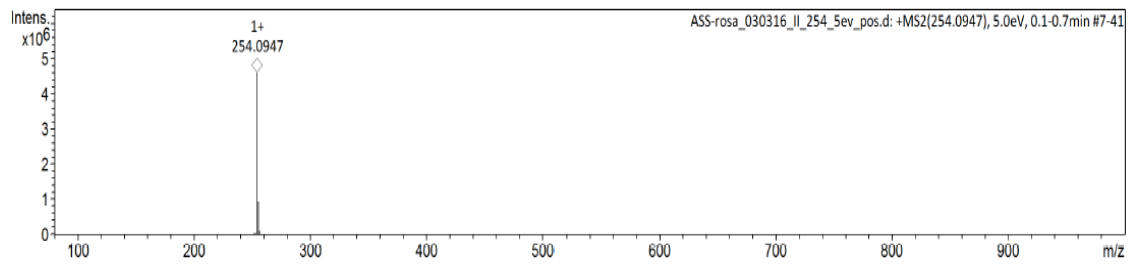


Figura Suplementar 2. Espectro de massas do composto CF9d em modo positivo (ACN LC-MS).



Artigo 2

Bioprodutos para o controle da formação de biofilme na fermentação alcoólica

Ane Stéfano Simionato¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino Andrade^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

* Autor Correspondente: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Brasil. Fone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobiano, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, indústria sucroalcooleira.

Resumo

O etanol é considerado uma solução viável para o aquecimento global e o esgotamento inevitável do abastecimento de energia. Um dos problemas enfrentados pelas usinas sucroalcooleiras é a formação de biofilme nos equipamentos e tubulações utilizados no processo fermentativo. Este trabalho teve como objetivo a purificação e identificação dos metabólitos com ação antimicrobiana afim de controlar a formação de biofilme em fermentadores. O composto isolado do metabolismo da *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV foi purificado através de métodos cromatográficos. Dentre os diferentes compostos e frações isoladas, obteve-se o composto CF4b, que apresentou ação antimicrobiana frente a microrganismos formadores de biofilme. Através da avaliação de formação de biofilme, foi possível observar a inibição de 26,51% com 62,5 µg/mL para *Lactobacillus fermentum* e 34,93% com 31,25 µg/mL para *Leuconostoc mesenteroides*. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o composto isolado é um grande candidato no desenvolvimento de novas drogas para o controle da formação de biofilmes na produção de etanol.

1 Introdução

Com a alta dependência dos benefícios energéticos do petróleo e seu inevitável esgotamento, há um crescente interesse mundial em fontes alternativas de energia (Von sivers e Zacchi, 1996; Aristidou e Penttilä, 2000). O programa brasileiro de etanol foi iniciado para reduzir as importações de petróleo e logo percebeu-se que tinha importantes benefícios ambientais e econômicos, tornando-se o programa de energia de biomassa mais importante do mundo (Moreira e Goldemberg, 1999).

Como matéria-prima para produção de etanol é utilizada a cana-de-açúcar. Seu cultivo ocorre praticamente por todo território nacional e durante todo o ano, devido as condições favoráveis de clima e solo brasileiro (Lima *et al.*, 2001), tornando o país o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol.

Um dos pontos críticos de contaminação por microrganismos no processo fermentativo é a formação de biofilme, que consiste na formação de uma comunidade de células bacterianas de difícil identificação e controle. Geralmente, encontram-se em fendas e cantos de canos, tanques e trocadores de calor, onde a limpeza automática dos equipamentos não consegue removê-los (Skinner-Nemec e Nichols, 2007).

O biofilme formado nos equipamentos pode evoluir para contaminação persistente na dorna de fermentação, diminuindo gradualmente a produtividade (Skinner e Leathers, 2004). Além disso, pode retardar a passagem de líquidos pelos ductos, acelerando a corrosão dos mesmos e a necessidade de troca de toda a tubulação, gerando prejuízos para a usina. Dentre os microrganismos contaminantes, os principais são bactérias Gram positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus* (Gallo, 1989, Skinner e Leathers, 2004, Andrietta *et al.*, 2007).

Para o controle da formação de biofilme, em conjunto com o tratamento térmico, são utilizados os mesmos antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes usados frente a bactérias planctônicas, mas em concentrações mais elevadas, chegando em concentrações até 100 vezes maiores (Torres *et al.*, 2011).

Considerando a escassez de antimicrobianos naturais de baixa toxicidade ao meio ambiente e a crescente preocupação com o desenvolvimento da resistência aos antibióticos (ASM Report, 2009), torna-se imprescindível a descoberta de novos antibióticos e/ou composições para tornar o setor mais competitivo com redução do custo e menor impacto ambiental (Bérdy, 2005).

O objetivo deste estudo foi produzir, purificar e identificar compostos no metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV que possuem ação inibitória na formação de biofilme durante processo agroindustrial de fermentação alcoólica.

2 Metodologia

2.1 Cepas bacterianas

Foi utilizado como cepa padrão para este estudo, a cepa de *Lactobacillus* sp. isolada no processo de produção de etanol na Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA (Góis *et al.*, 2013). As cepas boas formadoras de biofilme *Leuconostoc mesenteroides* CCT 0848 e *Lactobacillus fermentum* CCT 1629 foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Fernando Bittencourt Luciano da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. A cepa de *S. cerevisiae* utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pela Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA. Todos os microrganismos foram cultivados em meio caldo de cana-de-açúcar clarificado (MCC), conforme Nobre, (2005).

O agente de biocontrole utilizado foi a *P. aeruginosa* (cepa LV, bactéria selvagem), isolada no Município de Astorga, Paraná, Brasil (Rampazo, 2004).

Todas as cepas estão estocadas em solução de glicerol 40% em nitrogênio líquido, fazendo parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM) da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

2.2 Produção, extração e purificação dos metabólitos

A ativação da cepa LV foi realizada através da inoculação em ágar nutriente (AN) com adição de 100 mg/L de cobre. A produção dos metabólitos está patenteada (Andrade, 2008). Para a produção e obtenção dos metabólitos com ação antibiótica, a cepa foi cultivada em caldo nutriente (CN) modificado (2 g/L de peptona e 1,2 g/L de extrato de carne) com adição de 5 mg/L de cloreto de cobre II por 10 dias a 28 °C, em aeração constante. Após o cultivo, o meio de cultivo foi centrifugado (9.000 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante livre de célula foi concentrado em Evaporador Rotativo Büchi R-114 a 70 °C para redução de 95% do volume inicial.

Após a concentração, alíquotas de 100 mL do sobrenadante foi transferido para funis de separação de 2000 mL onde foi realizado a partição líquido-líquido na razão 1:2 (v/v) do sobrenadante e do solvente orgânico. Para cada separação, este procedimento foi repetido 5 vezes com o solvente orgânico diclorometano, obtendo-se assim a fase diclorometano (FD). A FD foi concentrada em Evaporador Rotativo Büchi R-153 a 50 °C, em seguida a amostra foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada (Jouan LP3).

Para a purificação da FD (fase mais ativa) foi realizado o método de cromatografia flash (CF). Para tanto, foi utilizada uma coluna de vidro (10 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de média pressão (50 kPa). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0,04 – 0,063 mm, Macherey-Nagel) e como fases móveis os solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila ([95:05] e [50:50]), acetato de etila:metanol ([90:10]), metanol, metanol: água destilada([90:10], [50:50]) e água destilada 100%. Foram coletados 2 mL em tubos e analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCD-a) e agrupadas conforme a semelhança química, foram obtidas 11 frações. As frações foram evaporadas e liofilizadas para obtenção dos rendimentos. As frações de média polaridade foram monitoradas quanto sua atividade antibiótica pela técnica de disco difusão e as de alta polaridade pelo método de *spot-on-lawn*. Posteriormente, este processo foi repetido para a obtenção de maior quantidade de material.

A fração CF4, que apresentou atividade antimicrobiana frente aos contaminantes da dorna e a levedura fermentadora, foi submetida a outro processo de purificação por CF em coluna de vidro (8 mm Φ x 20 mm altura), acoplada a uma bomba de média pressão (50 kPa). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0,04 – 0,063 mm, Macherey-Nagel) e como fases móveis os solventes orgânicos com polaridade crescente (v/v): Éter de petróleo: diclorometano ([70:30]), Éter de petróleo: diclorometano ([30:70]). Foram coletados 2 mL em tubos e analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCD-a) e agrupadas conforme a semelhança química e monitoradas quanto a atividade antimicrobiana. Das cinco frações obtidas, a única que apresentou atividade foi a CF4b. Posteriormente, este processo foi repetido para a obtenção de maior quantidade de material.

A fração CF4b passou por purificação fina em CLAE semi-preparativa com coluna de fase reversa C18 (10 mm \times 250 mm, Agilent®, USA) para monitoramento de grau de pureza do composto. Como fase móvel para o composto CF4b foi utilizado gradiente de água/acetonitrila (70%/30% por 10 segundos, 60%/30% por 50 segundos, 20%/80% por 2 minutos) e sistema isocrático de 3 minutos de acetonitrila, com fluxo de 2 mL/min e detecção à 264 nm. O composto foi coletado separadamente, evaporado e liofilizado para obtenção do rendimento e realização dos testes microbiológicos e análises químicas.

2.3 Avaliação qualitativa dos componentes das frações obtidas

2.3.1 Cromatografia de Camada Delgada analítica (CCD-a)

A CCD-a foi realizada em cromatofolhas de alumínio (sílica – gel 60 F254, Macherey-Nagel) com 0,200 mm de espessura e como fase móvel, foi utilizado diclorometano:acetato de etila (95:05, v:v). As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 366 nm. Esta técnica foi utilizada para monitoramento das frações e isolado obtidos nos processos de extração e purificação.

2.4 Análise química

2.4.1 Espectroscopia no UV/VIS

A amostra CF4b foi solubilizada em solvente grau espectroscópico e adicionada em cubeta de quartzo e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Thermo Electron Corporation BIOMATE 3 entre 190 e 390 nm para determinação do pico máximo de absorção.

2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY) foram obtidos em aparelho Bruker Mod. Avance III de 400 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , com o uso de solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3) para determinação de sua estrutura molecular.

O procedimento foi realizado no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

2.4.3. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos junto ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massa da Universidade Estadual de Londrina em aparelho QTOF: Sistema Quadruplo e TOF para ultra alta resolução e precisão de massas – COMPACT (Bruker).

2.5 Análise biológica

2.5.1 Disco difusão

Para monitorar frações de média polaridade e quantificar a ação antibiótica das frações, sub-frações e molécula pura sobre os isolados de contaminantes formadores de biofilme e *S. cerevisiae* foram realizados testes de difusão em ágar, conforme a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966). Para o teste, culturas em fase exponencial a uma concentração de 10^8 UFC/mL (D.O. 0.14 para o isolados de *Lactobacillus* spp., D.O. 0.22 para *S. cerevisiae*, $\lambda=590$ nm e ajuste na escala 0,5 de McFarland para *L. fermentum* e *L. mesenteroides*) foram inoculadas com *swab* em placa de Petri com ágar MCC. Os discos contendo os compostos (frações e substâncias puras) foram colocados na placa contendo cada isolado de microrganismo. As placas foram incubadas a $34^\circ\text{C}/48$ h e a leitura realizada através da mensuração das zonas de inibição (mm).

2.5.2 Spot-on-lawn

Este teste foi utilizado como forma de monitoramento da ação antimicrobiana das frações polares obtidas em cada etapa de produção e purificação, conforme metodologia adaptada de Lewus e Montville (1991). Culturas em fase exponencial em concentração de 10^8 UFC/mL (D.O. 0.14 para os isolados de *Lactobacillus* spp., D.O. 0.22 para *S. cerevisiae*, $\lambda=590$ nm e ajuste na escala 0,5 de McFarland para *L. fermentum* e *L. mesenteroides*) foram inoculadas com *swab* em placa de Petri com ágar cana-de-açúcar clarificado (MCC). As frações foram

diluídas em água estéril e 10 µL de cada fração foi transferida para superfície do ágar. As placas foram incubadas a 34 °C/48 h e a leitura realizada através da ausência ou presença do crescimento do microrganismo na gota aplicada.

2.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM), bactericida e fungicida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por método de microdiluição em caldo conforme metodologia modificada preconizada pelo CLSI (2011). As placas foram incubadas a 34 °C/48 h. A CIM foi determinada quando houve 100% de inibição de crescimento bacteriano quando comparado com o controle sem adição da substância. Após o período de incubação, uma alíquota de 10 µL de cada poço foi transferida para placas de Petri contendo ágar MCC. As placas foram incubadas a 34 °C/48 h e analisadas quanto ao crescimento microbiano. As concentrações referentes às placas com ausência de crescimento bacteriano e fungico foram consideradas bactericidas e fungicida, respectivamente.

As concentrações utilizadas para os testes de CIM foram: de 15,8 µg mL⁻¹ a 0,06 µg mL⁻¹ para fração CF4b.

2.5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana na formação de biofilme

2.5.4.1 Formação de biofilme

Para formação de biofilme foi realizado o método adaptado de Pierce *et al.* (2008). Foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde foram colocados 200 µL de suspensão bacteriana ajustada na escala de McFarland em 0,5 em caldo MCC e incubados por 24 h à 34 °C sob agitação de 110 rpm. Foram retirados 100 µL, adicionado 100 µL de caldo MCC novo e as placas foram incubadas por mais 24h à 34 °C sob agitação de 110 rpm. O caldo foi retirado novamente, foram adicionados 200 µL de caldo MCC contendo o composto antimicrobiano e as placas foram incubadas por 1 hora à 34 °C sob agitação de 110 rpm. As concentrações utilizadas do antimicrobiano CF4b foram: 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,91 e 1,95 µg mL⁻¹. O grupo controle não recebeu tratamento com o composto bioativo (CF4b). Esta avaliação foi realizada com cada microrganismo contaminante separadamente.

2.5.4.2 Quantificação da massa de biofilme

Para a quantificação da massa de biofilme foi utilizada a técnica por coloração com cristal violeta adaptada de Silva *et al.* (2009). Após o tempo de tratamento, o meio foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com água estéril. Adicionaram-se 200 µL de metanol 99% por 15 minutos para a fixação das células. O metanol foi retirado e os poços secados em fluxo laminar. Após secagem foram adicionados 200 µL de cristal violeta 1% (v/v) por 5 minutos. O cristal violeta foi retirado, os poços lavados três vezes com água estéril e depois secados novamente em fluxo laminar. A corante aderido aos microrganismos foi solubilizado com 200 µL de ácido acético glacial 33% (v/v). Foram transferidos 100 µL de cada poço para uma placa limpa e as absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm (Thermo Electron Corporation BIOMATE 3). As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de formação de biofilme através da comparação com o controle formação de biofilme.

3 Resultados

3.1 Produção, extração e purificação dos metabólitos

O rendimento obtido da extração dos metabólitos com diclorometano foi de 32,56 mg/L. O extrato bruto (FD) foi submetido a métodos de purificação por CF. Foram obtidas 11 frações, sendo as frações CF2, CF3, CF4 e CF5 com atividade inibitória frente ao *Lactobacillus* spp. e *S. cerevisiae*, no entanto, as frações CF7 e CF9 não apresentaram atividade antimicrobiana frente a levedura (Tabela 1).

A fração CF4, entre as frações com atividade não seletiva, apresentou a maior inibição frente aos microrganismos contaminantes e a levedura fermentadora. Sendo assim, esta fração foi selecionada para novo processo de purificação para realização de teste de inibição de formação de biofilme. O composto purificado denominado CF4b, passou pelo método desenvolvido para CLAE (Figura 1) para verificação de possíveis contaminantes e em seguida foram realizados teste de disco difusão em ágar frente ao *L. fermentum* e *L. mesenteroides*, microrganismos formadores de biofilme, onde a fração através do método de disco difusão demonstrou alta atividade antibiótica, 41,5 mm e 40,5 mm de inibição respectivamente.

3.2 Análise química

O composto CF4b apresentou-se com coloração verde escuro, cristais de baixa qualidade, inodoro, resistente a alterações de pH, termorresistente e foto resistente. Na varredura espectrofotométrica foi possível observar que a fração pura CF4b apresentou pico de absorção máxima estimado em 264 nm (dados não apresentados). Os resultados obtidos em RMN (Figura Suplementar 1) e Massas (Figura Suplementar 2) estão sendo analisados para a identificação química do composto isolado. Com bases nos espectros obtidos, o composto bioativo é um antibiótico organometálico (de Oliveira, 2016).

3.3 Análises biológicas

3.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM), bactericida e fungicida mínima

A CIM do composto CF4b foi de 0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. fermentum* e *L. mesenteroides* e 0,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. cerevisiae*. A concentração bactericida e fungicida mínima foram as mesmas concentrações obtidas na CIM.

3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana na formação de biofilme

A melhor concentração de CF4b encontrada para *L. fermentum* em relação a formação de biofilme foi de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esta concentração apresentou menor porcentagem de formação (73,49%) em relação ao controle (Figura 2). Já para *L. mesenteroides* a melhor concentração foi de 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com 65,07% de formação de biofilme em relação ao controle (Figura 3).

4 Discussão

Espécies do gênero *Pseudomonas* possuem um grande potencial em antagonizar patógenos e seus metabólitos brutos em controlar diferentes microrganismos (Dowling e O'Gara, 1994, Raaijmakers *et al.*, 1997; Haas e Defago, 2005). Vários compostos já foram isolados e identificados de extratos brutos provenientes do metabolismo das *Pseudomonas* sp., incluindo compostos fenazínicos, pirrolnitrinas, pyo, derivados indólicos, peptídeos, lipídeos, glicolipídeos e compostos alifáticos (Fuller *et al.*, 1971, Leisinger e Margraff, 1979, Ligon *et al.*, 2000, Raaijmakers *et al.*, 2002; Haas e Keel, 2003; Paulsen *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2006; Gross e Lopes, 2009).

Os extratos brutos e compostos purificados produzidos e extraídos do cultivo da *P. aeruginosa* cepa LV, apresentaram importantes atividades antimicrobianas, tanto para bactérias isoladas de dornas de produção do etanol combustível (Beranger, 2103; Góis *et al.*, 2013) quanto para controle de biofilme produzidos por cepas isoladas do sistema produtivo do etanol. Estes compostos, podem ser uma alternativa para o controle da contaminação bacteriana no processo produtivo do etanol combustível.

O composto isolado neste trabalho (CF4b) reduziu a formação de biofilme dos microrganismos contaminantes testados. As melhores concentrações foram 64 vezes maiores que a CIM para *L. fermentum* e 32 vezes para *L. mesenteroides*. Esse aumento de concentração é esperado, uma vez que os microrganismos presentes no biofilme possuem uma resistência maior a antimicrobianos em comparação com as células planctônicas e geralmente utilizam-se até 100 vezes a concentração da CIM (Torres *et al.*, 2011). A diferença de concentração entre os microrganismos se deve provavelmente ao fato de que *L. fermentum* produz um biofilme mais espesso quando comparado com *L. mesenteroides*, dificultando a passagem do composto pelas camadas do biofilme e reduzindo a sua ação (Leathers e Bishoff, 2011). No entanto, ensaios de atividade metabólica do biofilme e estudos por microscopia eletrônica e confocal deverão ser realizados afim de entender melhor a ação do composto CF4b frente aos diferentes biofilmes.

As ações deste composto em frações semi-purificadas já foram descritas anteriormente contra células planctônicas e de biofilme em fitopatógeno Gram negativo do gênero *Xanthomonas*, onde há a paralisação da formação de biofilme (de Oliveira *et al.*, 2016). Também há estudos contra patógeno multirresistente Gram negativo do gênero *Klebsiella*, onde a fração semi-purificada reduziu drasticamente o número de células e a viabilidade celular com $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 8 horas de tratamento (Kerbaui *et al.*, 2016). Já com *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, a menor concentração capaz de reduzir 60% da formação de biofilme foi de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ e em $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ houve a diminuição de 80% de células viáveis e 50% da inibição da formação de biofilme (Amichi, 2015). Estes estudos dão suporte aos primeiros resultados obtidos com o composto com alto teor de pureza e com bactérias Gram positivas.

Não há muitos estudos com relação ao controle de biofilme em processos fermentativos na produção do etanol combustível a partir de cana-de-açúcar. Estudos com isolado de *Bacillus cereus* cepa MR1 demonstraram atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos contaminantes do processo produtivo do etanol. O sobrenadante da cultura da cepa MR1 em concentração de $\mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu em torno de 50% a formação de biofilme de *Lactobacillus* sp. (Manitchotpisit *et al.*, 2013, Leathers *et al.*, 2014). Estudos com virginiamicina para controle de biofilme na produção de etanol através da fermentação de milho, mostraram que a concentração eficaz foi aproximadamente 10 x maior que a usada para células planctônicas (Rich *et al.*, 2011).

Leathers *et al.* (2014), testaram 3 enzimas comerciais não específicas para controle de formação de biofilme de *Lactobacillus* sp.. A enzima Novozyme 188 reduziu em 95% a formação de biofilme na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes trabalhos sugerem que a combinação destas enzimas com biocidas pode ser uma ótima estratégia para aumentar ação destes compostos sobre os biofilmes.

Novos estudos devem ser realizados a fim de serem realizados testes de atividade metabólica e microscopia eletrônica e confocal para observar a atividade destes compostos no biofilme. A combinação com enzimas comerciais não específicas com o composto CF4b pode resultar em

uma relação sinérgica benéfica, diminuindo a concentração mínima necessária de ambos os produtos, minimizando a utilização de antimicrobianos.

5 Conclusão

Os resultados demonstram que o composto isolado do metabolismo secundário da *P. aeruginosa* (cepa LV), CF4b, apresentou atividade antimicrobiana contra células planctônicas e de biofilme de contaminantes microbiológicos da produção de etanol. A alta atividade antimicrobiana do composto CF4b contra os contaminantes microbianos, torna-o um grande candidato no desenvolvimento de novas drogas para o controle de formação de biofilmes na produção do etanol.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de qualquer relação comercial ou financeira que possa ser interpretada como um potencial conflito de interesse.

Informação de Financiamento

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal - 456656/2014-1).

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fazer este estudo possível mediante a concessão de bolsas de PIBIC, MSc., PhD e produtividade. Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Espectroscopia - ESPEC UEL/FINEP por ajudar com os experimentos de RMN e ao Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas – LAMM UEL/FINEP por ajudar com os experimentos de massas. Ao Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) por gentilmente ter cedido as cepas utilizadas neste estudo.

Referências

- Amichi, D.P. (2015) Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecium*. [dissertação/tese de Mestrado]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina.
- Andrade, G. (2008). *Process of production, purification and obtation of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants*. BR Patent No PI0803350-1A. Brazil patent application.
- Andrietta, M.G.S., Andrietta, S.R., Steckelberg, C., Stupiello, E.N.A. (2007). Bioethanol – 30 years of Proálcool. *International Sugar Journal*. 109, 195-200.
- Aristidou, A., Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. 11, 187-198.

- ASM Report 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem, <http://academy.asm.org/index.php?option¼com_content&view¼category&layout¼blog&id¼40&Itemid¼79> [accessed 12.06.2014].
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 4:493-496.
- Beranger, J.P.O. (2013). Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol. [dissertação/tese de Mestrado]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 58, 1:1-26.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement. Wayne, PA:CLSI.
- Dowling, D.N., O'Gara, F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends. Biotechnol.* 12, 133-141.
- Fuller, A.T., Mellows, G., Woolford, M., Banks, G. T., Barrow, K. D., Chain, E. B. (1971). Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature*. 234, 416-417.
- Gallo, C.R. (1989) Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. [tese/tese de doutorado]. [Campinas (SP)]: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- Góis, C.G.M., Lopes-Santos, L., Beranger, J.P.O., de Oliveira, A.G., Spago, F.R., Andrade, G. (2013). The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. *Scientific Research*. 3, 194-201.
- Gross, H., Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1408-1446.
- Haas, D., Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117-53.
- Kerbaudy, G., Vivan, A.C.P., Simões, G.C., Simionato, A.S., Pelisson, M., Vespero, E.C., Costa, S.F., Andrade, C.G.T.J., Barbieri, D.M., Mello, J.C.P., Morey, A.T., Yamauchi, L.M., Yamada-Ogatta, S.F., de Oliveira, A.G., Andrade, G. (2016). Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 17, 389-397. doi: 10.2174/138920101704160215171649
- Leathers, T.D.; Bischoff, K.M. (2011). Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology Letters*. 33, 3: 517-523.

- Leathers, T.D., Bischoff, K.M., Rich, J.O., Price, N.P.J., Manitchotpisit, P., Nunnally, M.S., Anderson, A.M. (2014). Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresource Technology*. 169, 45-51.
- Leisinger, T., Margraff, R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 43, 422-442.
- Lewus, C.B., Montville, T.J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 13, 145-150.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H. J., van Pée, Karl-Heinz. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest. Manag. Sci.* 56, 688-695.
- Lima, U.A., Basso, L.C.; Amorim, H.V. (2001). Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). Biotecnologia industrial. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher. p. 01-40.
- Manitchotpisit, P., Bischoff, K.M., Price, N.P.J., Leathers, T.D. (2013). *Bacillus* spp. produce antibacterial activities against Lactic Acid Bacteria that contaminate fuel ethanol plants. *Current Microbiology*. 66, 5:443-449.
- Moreira, J., Goldemberg, J. (1999). The alcohol program. *Energy Policy*. 27, 229-45.
- Nobre, T.P. (2005). Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. [dissertação/tese de mestrado]. [São Paulo (SP)]: ESALQ/USP..
- de Oliveira, A.G., Spago, F.R., Simionato, A.S., Navarro, M.O., Silva, C.S., Barazetti, A.R., Cely, M.V., Tischer, C.A., San Martin, J.A., Andrade, C.G., Novello, C.R., Mello, J.C., Andrade, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontier*. 7, 113. doi:10.3389/fmicb.2016.00113.
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.I., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S. 3rd, Thomashow, L.S., Loper, J.E. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23, 873-8. doi:10.1038/nbt1110
- Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tristan, A.R., Wormley J.R., F.L., Mowat, E., Ramage, G., Lopez-Ribot, J.L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*. 3, 9: 1494-1500.
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., de Kock, M. J. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 699-710.

- Raaijmakers, J., Vlami, M., de Souza, J. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton. Leeuw.* 81, 537-547.
- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microb.* 63, 881-887.
- Rampazo, L.G.L. (2004). Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. [dissertação/tese de mestrado]. [Londrina (PR)]: Universidade Estadual de Londrina.
- Rich, J.O, Leathers, T.D., Nunnally, M.S., Bischoff, K.M. (2011). Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology.* 102, 1124-1130.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J. (2009) Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Medical mycology.* 47, 681-689.
- Skinner, K.A., Leathers, T.D. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 31,401-408.
- Skinner-Nemec, K.A., Nichols, N.N. (2007). Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnonology Letters.* 29, 379-383.
- Torres, C.E., Lenon, G., Craperi, D., Wilting, R., Blanco, A. (2011). Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 92:95-103.
- Von sivers, M., zacchi, G. (1996) Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. *Bioresource Technology.* 56, 131-40.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas no processo de purificação por Cromatografia Flash do extrato bruto FD através de método de difusão em ágar para os compostos de média polaridade (CF1 a CF6) e por *Spot-on-lawn* para as frações polares (CF7 a CF11).

| Frações | <i>Lactobacillus sp.</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------|--------------------------|---------------------------------|
| CF1 | - | - |
| CF2 | +* | +* |
| CF3 | + | + |
| CF4 | + | + |
| CF5 | +* | +* |
| CF6 | - | - |
| CF7 | + | - |
| CF8 | - | - |
| CF9 | + | - |
| CF10 | - | - |
| CF11 | - | - |

+ Presença de atividade antimicrobiana

- Ausência de atividade antimicrobiana

* Baixa atividade demonstrada

Figura 1. Cromatograma do composto CF4b em coluna C18 HPLC com detecção de 264 nm. A presença de um único pico em 3.980 minutos indica o alto grau de pureza do composto. Absorbância x Tempo de Retenção.

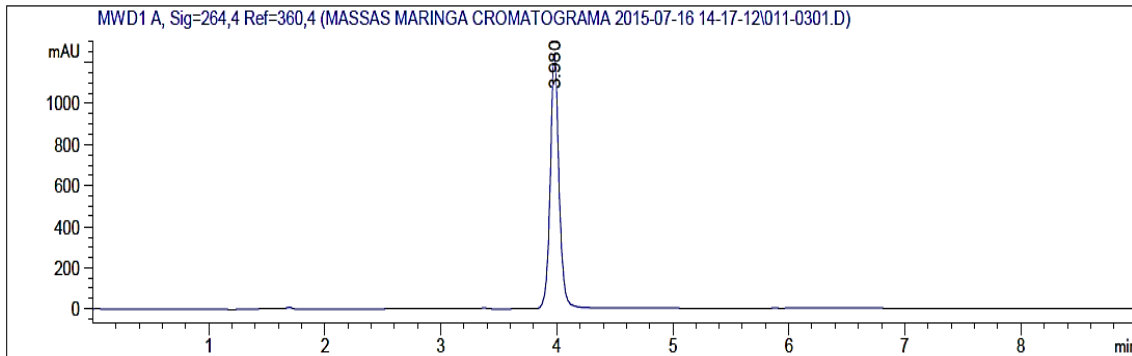


Figura 2. Efeitos das diferentes concentrações do composto CF4b frente ao *Lactobacillus fermentum*, microrganismo formador de biofilme, na formação de biofilme. Porcentagem média e amplitude (8 repetições) de formação de biofilme x Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ da CF4b.

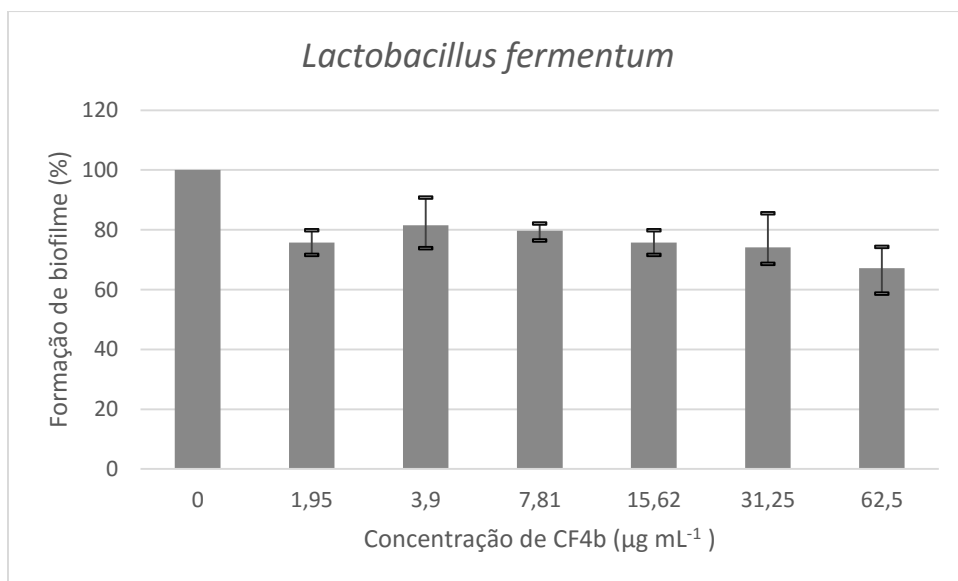
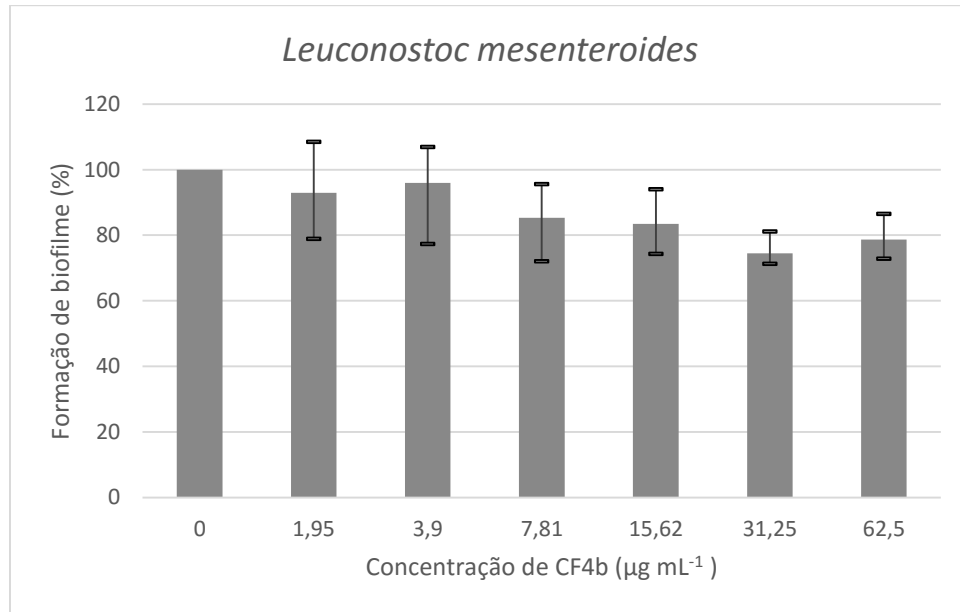


Figura 3. Efeitos das diferentes concentrações do composto CF4b frente ao *Leuconostoc mesenteroides*, microrganismos formadores de biofilme, na formação de biofilme. Porcentagem média e amplitude (8 repetições) de formação de biofilme x Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ da CF4b.



Material Suplementar

Bioprodutos para o controle da formação de biofilme na fermentação alcoólica

Ane Stéfano Simionato¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Galdino Andrade^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

* Autor Correspondente: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Brasil. Fone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Figura Suplementar 1. Espectro de RMN de ¹H do composto natural organometálico (CF4b) produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV (300 MHz; CDCl₃)

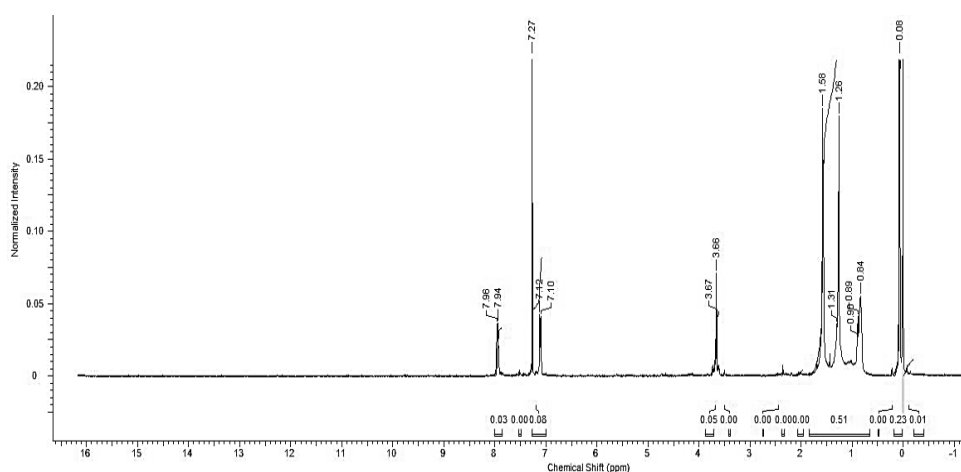
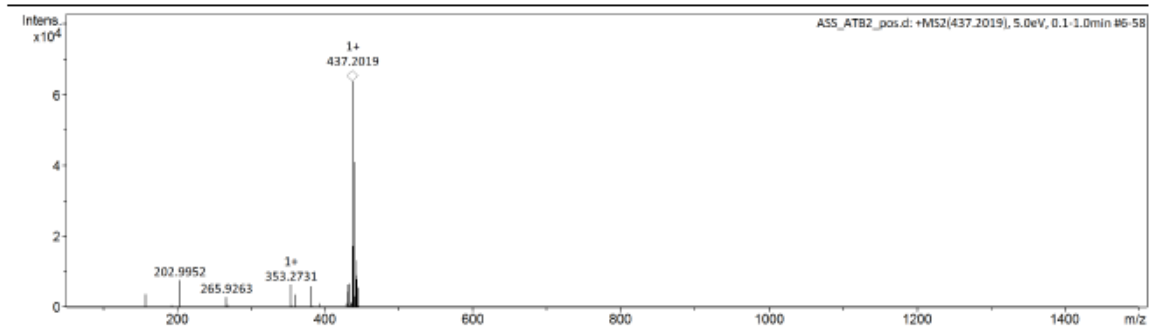


Figura Suplementar 2. Espectro de ESI-MS (modo positivo) do composto natural organometálico (CF4b) produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV.



5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a fração semi-purificada (CF9) extraída e purificada do metabolismo secundário da *P. aeruginosa* cepa LV apresentou atividade antimicrobiana contra células planctônicas de contaminantes microbiológicos da produção de etanol. O composto isolado desta fração, CF9d, apresentou atividade antimicrobiana seletiva para bactérias Gram positivas. A bio-AgNP apresentou baixo CIM para os contaminantes podendo ser uma via alternativa de controle natural, mas não mostrou ação sinérgica com a CF9. O bioativo isolado CF4b apresentou atividade antimicrobiana contra células planctônicas e de biofilme de contaminantes microbiológicos da produção de etanol.

Os compostos extraídos e purificados do metabolismo da cepa LV e a bio-AgNP apresentam grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o controle de contaminantes microbiológicos na produção do etanol.

6 REFERÊNCIAS

ABBE, T.; KOVÁCS, A.T.; KUIPERS, O.P.; van der VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-Positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 172-179, 2011.

ABELSON, M.B.; McLAUGHLIN, J. Of biomes, biofilm and the ocular surface. **Review of Ophthalmology**. 2012. Disponível em: <http://www.reviewofophthalmology.com/content/d/therapeutic_topics/i/2088/c/36412/> Acesso em: 27 mar. 2016.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar Álcool e Subproduto**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.

AMORIM, H.V.; org. LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 434 p.

ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R., STECKELBERG, C., STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2007.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-198, 2000.

ASM Report 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem, Disponível em: <http://academy.asm.org/index.php?option¼com_content&view¼category&layout¼blog&id¼40&Itemid¼79> Acesso em: 12 out 2015.

BERANGER, J.P.O. Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol. 2013. 66 fls. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v.65, p. 385-395, 2012.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERNANDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R., BERCHIELLI, T.T., COAN, R.M. Avaliação da queima e da adição de milho deintegrado com palha e sabugo na ensilagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 269-275, 2007.

BETABIO. Fermentec. 2007. Disponível em: <
<http://www.betabio.com.br/page010.html>>. Acesso em: 08 dez. 2015.

BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; LEATHERS, T.D.; WORTHINGTON, R.E.; RICH, J.O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 117-122, 2009.

BISCHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A.; LEATHERS, T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 739-744, 2007.

CARDOZO, V.F.; OLIVEIRA, A.G.; NISHIO, E.K.; PERUGINI, M.R.E.; ANDRADE, C.G.T.J.; SILVEIRA, W.D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 12, 2013.

CHIN-A-WOENG, T.F.; BLOEMBERG, G.V., MULDER, I.H.; DEKKERS, L.C.; LUGTENBERG, B.J. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 12, p. 1340-1345, 2000.

COLLINS, C.H.; BRAGA, L.G.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 452p.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_23_17_34_53_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf Acesso em: 03 mar 2016.

DAY, W.H.; SERJAK, W.C.; STRATTON, J.R.; STONE, L. Contamination inhibition, antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 252-258, 1954.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 3, p. 21-25, 1998.

DORTA, C.O. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 2006.

FARIA-TISCHER, P.C.S.; TISCHER, C.A. Nanobiotechnology platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 1657-1687, 2012.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808, 2007.

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

GÓIS, C.G.M.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J.P.O.; OLIVEIRA, A.G.; SPAGO, F.R.; ANDRADE, G. The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. **Scientific Research**, v. 3, p. 194-201, 2013.

GUDIKANDULA, K.; MARINGANTI, S.C. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. **Journal of experimental nanoscience**, p. 1 – 8, 2016.

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Petróleo: da crise aos carros flex.** Disponível em:

http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23 Acesso em: 28 set 2015.

KHODASHENAS, B.; GHORBANI, H.R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1 – 16, 2015.

LEATHERS, T.D.; BISCHOFF, K.M. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 3, p. 517-523, 2011.

LEITE, I.R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista**. 2011. 89 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 01-40.

LOPES, L.P.; OLIVEIRA, A.G.; BERANGER, J.P.O.; GÓIS, C.G.; VASCONCELLOS, F.C.S.; SAN MARTIN, J.A.B.; ANDRADE, C.G.T.J.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, G. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 233-238, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. Microbiologia Industrial. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 734-760

MALVIYA, R; BANSAL, V.; PAL, O.P.; SHARMA, P.K. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**. 2, 5:22-26, 2010.

MOGHADDAM, A.B.; NAMVAR, F.; MONIRI, M.; TAHIR, P.M.; AZIZI, S.; MOHAMAD, R. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: a review of their preparation, properties, and medical applications. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16540-16565, 2015. doi: 10.3390/molecules200916540.

MOREIRA, J.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, p. 229-45, 1999.

NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

NOBRE, T.P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) -ESALQ/USP, São Paulo, 2005.

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

de OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J.P.O.; SAM MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125-131, 2011.

de OLIVEIRA, A.G.; SIMIONATO, A.S.; NAVARRO, M.O.P.; ANDRADE, G. Antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos: da busca à identificação. In: YAMADA-OGATA, S.F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M.C.; NOGUEIRA, M.A. **Tópicos especiais em Microbiologia**. 1.ed. Londrina: UEL/ Departamento de Microbiologia, 2015, p. 180-199.

OPEC - Organization of the Petroleum Exporting Countries. **Brief History**. Disponível em: http://www.opec.org/opec_web/en/about_us/24.htm Acesso em: 28 set 2015.

PRABHU, S.; POULOSE, E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v. 2, n. 32, p. 1-10, 2012.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p. 537-547, 2002.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticle as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RIBANI, M.; BATTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SANTOS, M.M.L. **Produção de dextrano e frutose a partir da sacarose com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512**. 1999. 309 fls. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal, 1999.

SILVA, E. Crise atinge um quarto das usinas do país nos 40 anos do Proálcool. **Globo Rural – NovaCana**, 11 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/industria/usinas/crise-usinas-brasil-40-anos-proalcool-111115/>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 401-408, 2004.

SKINNER-NEMEC, K.A.; NICHOLS, N.N. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnonology Letters**, v. 29, p. 379-383, 2007.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 801-804, 2007.

TORRES, C.E.; LENON, G.; CRAPERI, D.; WILTING, R.; BLANCO, A. Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 95-103, 2011.

TUFFANI, M. Dez anos depois, Protocolo de Kyoto falhou em reduzir emissões mundiais. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 16 fev. 2015. Caderno Ambiente. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/ambiente/2015/02/1590476-dez-anos-depois-protocolo-de-kyoto-falhou-em-reduzir-emissoes-mundiais.shtml> Acesso em: 29 set. 2015.

UNICA. Linha do tempo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/linhadotempo/index.html>> Acesso em: 28 set. 2015a.

UNICA. Usina Virtual. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/usina-virtual.php>> Acesso em: 30 out. 2015b.

VAREJÃO, S. O Desafio da Tecnologia. **INOVAÇÃO em pauta**, v. 8, p. 17-20, 2009.

VON SIVERS, M.; ZACCHI, G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. **Bioresource Technology**, v. 56, p. 131