



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAMILE PRISCILA DE OLIVEIRA BERANGER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

JAMILE PRISCILA DE OLIVEIRA BERANGER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

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

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B482a Beranger, Jamile Priscila de Oliveira.

Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol / Jamile Priscila de Oliveira Beranger. – Londrina, 2013.

66 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae* – Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 3. *Lactobacilo* – Teses. 4. Álcool – Fermentação – Teses. 5. Testes microbiológicos – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.841.1

JAMILE PRISCILA DE OLIVEIRA BERANGER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE PRODUTOS
NATURAIS SOBRE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA PRODUÇÃO
DE ETANOL**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
UEL – Londrina - PR

Londrina, 22 de março de 2013.

**Dedico esse trabalho a Deus, a minha
família e ao meu marido Roberto, com muito
carinho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade desta existência e por estar sempre ao meu lado.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Jonatas e Francisca, e irmãos, Najla, Junior e Ana, pelo amor, incentivo e apoio que sempre me dedicaram.

Ao meu Marido, Roberto, pelo carinho, paciência, compreensão, companheirismo e auxílio nas horas de dificuldade, motivando e contribuindo para a finalização do trabalho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Galdino Andrade, pela confiança depositada no meu trabalho, por oferecer subsídios para minha aprendizagem e desenvolvimento acadêmico, assim como pela orientação neste trabalho.

Ao Professor e amigo Dr. Admilton Gonçalves Oliveira Júnior, que dedicou seu tempo e sua amizade ensinando, auxiliando, discutindo, orientando, com grande paciência e entusiasmo, que participou diretamente de minha formação acadêmica e de cada etapa deste trabalho, sendo indispensável para sua conclusão, será sempre uma referência profissional e grande amigo.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), Junior, Viviana, Flávia Spago, Bárbara, Carol, Flávia Lassie, Juliana, Luana, Vanessa, Daise, Yuri, Cleverson e em especial para a técnica Marta e as estagiárias Ane e Mayara pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais que contribuíram no meu aprendizado e desenvolvimento, e pela amizade, além da alegria de uma agradável convivência.

Aos meus amigos que me acompanharam por todos esses anos e me ajudaram a superar as dificuldades, me apoiaram e comemoraram todas as vitórias.

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e realização deste trabalho.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”.

Theodore Roosevelt.

BERANGER, Jamile Priscila de Oliveira. **Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O biocombustível etanol é uma alternativa viável à utilização de combustíveis fósseis, principalmente quanto às questões ambientais, pois o etanol é uma fonte energética renovável, e quando comparado a combustíveis como o petróleo apresenta menores taxas de emissão de gases estufa. A produção de etanol é influenciada pela contaminação bacteriana durante o processo fermentativo realizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As bactérias contaminantes na indústria sucroalcooleira são geralmente Gram-positivas, principalmente as espécies de *Lactobacillus*. O controle destes contaminantes geralmente é realizado com o uso de antibióticos, porém devido à seleção de cepas resistentes é necessária a busca de alternativas para este controle. Os produtos naturais como os metabólitos secundários bacterianos são fontes promissoras na prospecção por novos antibióticos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibiótica das frações semi-purificadas de metabólitos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) no controle de *Lactobacillus* sp., contaminante do processo de fermentação etanólica. Os metabólitos produzidos pela cepa LV, foram purificados por métodos cromatográficos. Todas as frações obtidas foram testadas quanto a atividade antibiótica. As Frações F6a, F6a.4, F6a.6, F6a.7 e F6a.8 e principalmente F6a.7.4, F6a.7.5 apresentaram resultados satisfatórios no controle do contaminante *Lactobacillus* sp., sem prejudicarem o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, responsável pela produção do etanol. A concentração inibitória mínima para as frações F6a.7.4 e F6a.7.5 foi de 31, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para F6a.7.6. Os resultados observados neste estudo demonstraram que compostos isolados a partir de metabólitos secundário de *P. aeruginosa*, cepa LV, podem ser uma ferramenta para o controle de *Lactobacillus* sp., importante contaminante na produção de etanol.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. *Lactobacillus* sp. Fermentação alcoólica. *Pseudomonas aeruginosa*. Atividade antibiótica.

BERANGER, Jamile Priscila de Oliveira. **Evaluation of antibiotic activity of natural products on bacterial contamination in ethanol production.** 2013. 66 p. Dissertation (Master's in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The ethanol biofuel is a viable alternative to fossil fuel use, especially on environmental issues, as ethanol is a renewable energy source and when compared to fuels such as oil, has lower rates of greenhouse gas emissions. Ethanol production is influenced by the bacterial contamination during the fermentation process performed by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The bacteria contaminants in the alcohol industry are generally Gram-positive, particularly the species of *Lactobacillus*. The control of these contaminants is usually accomplished with the use of antibiotics, however due to the selection of resistant strains is necessary to seek alternatives to this control. Natural products such as bacterial secondary metabolites are promising sources in prospecting for new antibiotics. In this context, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of semi-purified fractions of metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* (strain LV) in control of *Lactobacillus* sp., Contaminating the ethanol fermentation processes. The metabolites produced by strain VL, were purified by chromatographic methods. All the fractions were tested for antibiotic activity. Fractions F6a, F6a.4, F6a.6, F6a.7 and F6a.8 and especially F6a.7.4, F6a.7.5 showed satisfactory results in controlling contaminant *Lactobacillus* sp., Without harming the growth of the yeast *S. cerevisiae*, responsible for the production of ethanol. The minimal inhibitory concentration for fractions F6a.7.4 and F6a.7.5 was 31, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for F6a.7.6. The results of this study demonstrate that compounds isolated from secondary metabolites of *P. aeruginosa* strain LV, can be na tool for controlling *Lactobacillus* sp. important contaminant in ethanol production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. *Lactobacillus* sp. Alcoholic fermentation. *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações ativas F4a, F6a e F8a na concentração de 500 µg	56
Figura 2 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações obtidas pelo fracionamento da F6a por cromatografia flash na concentração de 500 µg	58
Figura 3 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas na primeira CF revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.....	59
Figura 4 – Cromatografia em camada delgada das frações FD e F6a. comparado com perfil das frações ativas obtidas em CF (F6a.4, F6a.6, F6a.7 e F6a.8) revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm	60
Figura 5 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações obtidas pelo fracionamento da F6a.7 por cromatografia flash na concentração de 250 µg	62
Figura 6 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas na segunda CF revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.....	63
Figura 7 – Determinação da concentração inibitória mínima da fração F6a.7.4 obtidas pelo fracionamento da F6a.7 por cromatografia flash nas concentrações de 500 a 0,98 µg. mL ⁻¹	64

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da FD por cromatografia líquida a vácuo, pelo método de Oliveira (2011), na concentração de 1000 µg.....54
- Tabela 2** – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da FD por cromatografia líquida a vácuo, pelo método modificado, na concentração de 1000 µg55
- Tabela 3** – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da F6a por cromatografia flash57
- Tabela 4** – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da F6a.7 por cromatografia flash na concentração de 250 µg.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar nutriente
CCD	Cromatografia em camada delgada
CF	Cromatografia Flash
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
CN	Caldo nutriente
CNg	Controle negativo
D.O	Densidade ótica
FD	Fase diclorometano obtida na partição líquido-líquido
F1	Fração Hexano, obtida na primeira CLV
F2	Fração diclorometano, obtida na primeira CLV
F3	Fração acetato de etila, obtida na primeira CLV
F4	Fração metanol, obtida na primeira CLV
F5	Fração metanol e água, obtida na primeira CLV
F6	Fração aquosa, obtida na primeira CLV
F4A	Fração hexano obtida na segunda CLV
F4B	Fração hexano / diclorometano obtida na segunda CLV
F4C	Fração diclorometano obtida na segunda CLV
F4D	Fração diclorometano / acetato de etila obtida na segunda CLV
F4E	Fração acetato de etila obtida na segunda CLV
F4F	Fração acetato de etila / metanol obtida na segunda CLV
F4G	Fração metanol obtida na segunda CLV
F4H	Fração metanol / água obtida na segunda CLV
F4H	Fração metanol / água obtida na segunda CLV
F4I	Fração aquosa obtida na segunda CLV
F1a e F1b	Fração hexano obtida por CLV
F2a e F2b	Fração hexano / diclorometano obtida por CLV
F3a e F3b	Fração diclorometano obtida por CLV
F4a e F4b	Fração diclorometano / acetato de etila obtida por CLV
F5a e F5b	Fração acetato de etila obtida por CLV
F6a e F6b	Fração acetato de etila / metanol obtida por CLV
F7a e F7b	Fração metanol obtida por CLV

F8a e F8b	Fração metanol / água obtida por CLV
F9a e F9b	Fração aquosa obtida por CLV
F6a.1	Fração da 1º porção da primeira CF
F6a.2	Fração da 2º porção da primeira CF
F6a.3	Fração da 3º porção da primeira CF
F6a.4	Fração da 4º porção da primeira CF
F6a.5	Fração da 5º porção da primeira CF
F6a.6	Fração da 6º porção da primeira CF
F6a.7	Fração da 7º porção da primeira CF
F6a.8	Fração da 8º porção da primeira CF
F6a.9	Fração da 9º porção da primeira CF
F6a.7.1	Fração da 1º porção da segunda CF
F6a.7.2	Fração da 2º porção da segunda CF
F6a.7.3	Fração da 3º porção da segunda CF
F6a.7.4	Fração da 4º porção da segunda CF
F6a.7.5	Fração da 5º porção da segunda CF
F6a.7.6	Fração da 6º porção da segunda CF
F6a.7.7	Fração da 7º porção da segunda CF
F6a.7.8	Fração da 8º porção da segunda CF
LV	Lesão velha
MCC	Meio Caldo de cana clarificado
MIC	Concentração inibitória mínima
R_f	Fator de retenção
TTC	Cloreto de 2, 3, 5-trifenil - 1H - tetrazólio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	BIOCOMBUSTÍVEIS	17
3.1.1	A Importância do Etanol.....	17
3.2	PRODUÇÃO DE ETANOL.....	19
3.2.1	Etapa Agrícola	19
3.2.2	Etapa de Corte, Carregamento e Transporte (CCT).....	20
3.2.3	Etapa Industrial	20
3.3	FATORES QUE INTERFEREM A PRODUÇÃO DE ETANOL	21
3.3.1	Contaminantes Bacterianos	22
3.3.1.1	Alternativa no controle da contaminação	24
3.4	PRODUTOS NATURAIS NA PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS.....	25
3.4.1	Metabólitos Bacterianos: Produtos naturais bioativos.....	26
3.5	PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	27
3.5.1	Cromatografia por Adsorção	28
3.5.2	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	29
	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ARTIGO – Avaliação da atividade antibiótica de produtos naturais sobre contaminação bacteriana na produção de etanol	35

1 INTRODUÇÃO

A busca para a produção e utilização de biocombustíveis é uma necessidade eminente, devido a alta demanda energética mundial, à dependência do petróleo (fonte não renovável) e às consequências ambientais pelo uso de combustíveis fósseis, como a emissão de gases que resultou no protocolo de Kyoto, sendo assim, o etanol, biocombustível produzido a partir de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é uma alternativa promissora (LEITE, LEAL, 2007).

Estudos indicam que os combustíveis fósseis, considerando as reservas disponíveis no momento, seriam suficientes para suprir o mercado por cerca de mais 40 anos. Entretanto, a emissão de gases e seus problemas consequentes, como efeito estufa e aquecimento global, são preocupações mundiais. Um indicativo é o compromisso dos países desenvolvidos em reduzirem a emissão de gás carbônico pela queima de petróleo em 5%, afirmado pelo protocolo de Kyoto (ANDRIETTA et al., 2007). Dessa forma, a substituição do petróleo por um biocombustível como etanol pode minimizar os impactos no meio ambiente.

No Brasil, o etanol combustível é produzido principalmente a partir da fermentação da cana-de-açúcar, devido a alta concentração de sacarose, matéria-prima para a fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e consequente produção de etanol, o que é bastante vantajoso para a indústria na produção de álcool, segundo Andrietta et al. (2007) o rendimento é de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar.

A produção de etanol é influenciada por diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos que alteram o rendimento da fermentação, tais como temperatura, pressão osmótica, pH, quantidade de nutrientes e fatores relacionados a levedura *S. cerevisiae* (espécie, linhagem e quantidade de células viáveis), além da contaminação bacteriana (LIMA et al., 2001). A contaminação bacteriana é propiciada pelas condições de fermentação como alta concentração de nutrientes presentes no mosto, presença de água, pH e temperatura ótima (CHERUBIM, 2003). Portanto, um dos problemas mais relevantes na indústria sucroalcooleira é a contaminação do mosto por bactérias, pois elas resultam em uma diminuição da eficiência da levedura *S. cerevisiae* no processo fermentativo para a produção de álcool devido a competição por nutrientes, inclusive a sacarose e pela produção e

liberação de metabólitos prejudiciais para a levedura (ANDRIETTA et al., 2007). Além disso, a contaminação bacteriana pode levar a floculação, ou seja agregação e precipitação das células de levedura que resulta na diminuição da velocidade de fermentação (OLIVA-NETO, YOKOYA, 1997). Os principais contaminantes da fermentação alcoólica são bactérias Gram-positivas, sendo o gênero *Lactobacillus* e *Bacillus* os representantes de maior prevalência. (GALLO, 1989; SKINNER, LEATHERS, 2004; ANDRIETTA et al., 2007).

O controle destes contaminantes geralmente é realizado pela adição de antibióticos ao mosto. Essa medida é de grande preocupação, pois o uso indiscriminado desses antibióticos pode levar à seleção de bactérias resistentes, dificultando ainda mais a eliminação destes contaminantes do processo fermentativo, além de elevar os custos para a indústria sucroalcooleira e o impacto destes antibióticos no meio ambiente (AMORIM, LEÃO, 2005).

Produtos naturais obtidos a partir do metabolismo de micro-organismos, plantas ou animais são promissores na prospecção de novas drogas para diversas indicações terapêuticas, inclusive novos antibióticos. A vantagem da utilização destes metabólitos é a alta interação biológica específica, considerando sua origem em organismos que possuem semelhanças bioquímicas (BÉRDY, 2005).

Os metabólitos secundários com atividade antibiótica podem ser produzidos por diversos organismos procariotos (bactérias) e eucariotos (fungos, plantas e animais). Dentre os procariotos estes compostos são produzidos principalmente por actinomicetos (*Streptomyces* e actinomicetos raros) e outras bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (BÉRDY, 2005).

Compostos do metabolismo secundário produzidos por espécies antagonistas, quando em competição, podem apresentar atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2011). O uso de metabólitos secundários com atividade antibiótica pode ser útil no controle de contaminantes da indústria sucroalcooleira, reduzindo perdas operacionais durante a fermentação etanólica, como a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, prejuízos causados pelos micro-organismos contaminantes (OLIVA-NETO, YOKOYA, 1997).

Visto a importância do etanol combustível e os problemas causados pela contaminação bacteriana, durante o processo agroindustrial para a produção deste combustível, é importante a busca de alternativas no controle destes micro-organismos contaminantes, dessa forma os produtos naturais, como os metabólitos

secundários bacterianos, podem contribuir para a minimização dos problemas na indústria sucroalcooleira.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibiótica de compostos semi-purificados do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV), no controle de *Lactobacillus* sp., contaminante bacteriano isolado durante processo agroindustrial de fermentação etanólica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir compostos antibióticos do metabolismo secundário da cepa LV com atividade antibióticas contra *Lactobacillus* sp.
- Purificar os metabólitos secundários da cepa LV com uso de métodos cromatográficos.
- Determinar qual(is) fração(ões) purificada(s) terá(ão) maior atividade antibiótica *in vitro* no controle de *Lactobacillus* sp.
- Determinar a concentração inibitória mínima do composto(s) semi-purificado(s) com maior atividade antibiótica frente a *Lactobacillus* sp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis são fontes energéticas renováveis, o que os diferencia dos combustíveis fósseis, como o petróleo, e são importantes no suprimento da demanda energética mundial que está em expansão, dessa forma diminuindo a dependência do petróleo. Além disso, o principal benefício dessa fonte energética é a redução do impacto ambiental causado pela diminuição da emissão de gases a atmosfera como o gás carbônico, envolvido no efeito estufa (LEITE, LEAL, 2007).

As fontes para a obtenção de biocombustíveis podem ser primárias ou secundárias, as primárias se baseiam na produção de etanol a partir de açúcares e amidos provenientes de culturas como cana-de-açúcar, beterraba, milho, trigo e mandioca e a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais como soja, mamona, dendê, além da gordura animal. As fontes secundárias utilizam materiais lignocelulósicos como resíduos agroflorestais e estão em desenvolvimento tecnológico, por exemplo, a utilização do bagaço e da palha da cana-de-açúcar pode levar a um aumento de até 50% na produção de etanol (LEITE, LEAL, 2007).

3.1.1 A Importância do Etanol

O Brasil é um importante produtor de biocombustíveis, principalmente o etanol extraído da cana-de-açúcar. A expansão na produção desta fonte energética renovável ocorreu após a crise do petróleo de 1973/1974, quando foi implementada uma política de incentivo da produção de etanol no país, o programa Pró-Álcool, que tinha como objetivo a diminuição da dependência da importação de petróleo e a substituição dos combustíveis fósseis (KOHLHEPP, 2010).

Desde 2006 o Brasil é autosuficiente na produção de petróleo, portanto, a continuidade em investimentos na ampliação da produção de biocombustíveis pode estar relacionada a necessidade de redução do impacto ambiental causado pela emissão de CO₂, assunto de grande preocupação internacional, devido às alterações climáticas causadas por estes gases na

atmosfera. Entretanto, outros interesses do país na produção de etanol estão na substituição do combustível no mercado interno e o potencial no mercado externo (KOHLHEPP, 2010).

O Brasil é território favorável para a produção de biocombustíveis devido às condições ambientais. Dessa forma, é um país com grande potencial no mercado internacional de etanol (KOHLHEPP, 2010).

Brasil e Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, chegando a 90% do mercado global (FAO, 2008). Nos Estados Unidos a produção de etanol é realizada principalmente a partir do milho (90%), no Brasil a matéria-prima mais utilizada na produção de etanol é a cana-de-açúcar (GAROMA, BEM-KALED, BEYENE, 2011). Segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos (2008), o etanol produzido a partir do milho pode reduzir em cerca de 20% a emissão de gases do efeito estufa em relação a gasolina, podendo alcançar até 52%, futuramente com a utilização do etanol de segunda geração, produzido a partir de celulose, alcançará uma redução de 86%.

A produtividade de etanol utilizando como matéria prima a cana-de-açúcar é aproximadamente dez vezes maior quando comparados ao uso do milho como fonte de açúcares. Além disso, a produção de etanol a partir de milho acarreta em uma maior liberação de gás carbônico em relação ao etanol da cana, especialmente em culturas de clima seco, o saldo também é positivo para a redução da emissão desse gás em relação ao liberado pela gasolina, a cana gera uma redução de 57 a 61% e o milho uma redução é de 43 a 51%, dependente da região a ser cultivada (clima tropical, seco ou temperado), (GAROMA, BEM-KALED, BEYENE, 2011).

Outra vantagem durante a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é o transporte, a cana necessita de menor transporte ocasionado pela proximidade dos locais de produção e a área agrícola, já o milho é transportado para locais intermediários até o processamento industrial, é necessário considerar que esses dados são resultados da produção de etanol da cana no Brasil e etanol do milho nos EUA (GAROMA, BEM-KALED, BEYENE, 2011).

3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL

Em geral a produção de etanol é composta de três etapas: a primeira é a etapa agrícola que consiste nos cuidados desde o plantio da cana de açúcar a manutenção da cultura, a segunda é a etapa de corte, carregamento e transporte (CCT) que envolve o corte da cana que pode ser manual ou mecanizado, o carregamento que geralmente é mecanizado e o transporte da área agrícola para a usina, a terceira etapa é a industrial na qual ocorre o processamento da cana de açúcar, que pode resultar nos produtos: açúcar (recuperação da sacarose), energia (utilização da biomassa) e etanol (processo fermentativo) (PAIVA, 2006).

3.2.1 Etapa Agrícola

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma cultura perene, de fácil plantio e manejo, além de ser uma cultura de baixo custo, apresenta um elevado rendimento (até 120 t/ha/ano), a produtividade é influenciada por fatores como variedade, fertilidade do solo, condições climáticas, práticas culturais, controle de pragas e doenças e método de colheita. A melhor variedade da cana-de-açúcar a ser escolhida é aquela que apresenta alta produtividade, alto teor de açúcar (sacarose), e ideais para as condições de solo e clima, boa capacidade de rebrota, fácil despalha e resistência a pragas e doenças (TOWNSEND, 2000).

As melhores condições da área para o plantio da cana de açúcar é a área com topografia pouco inclinada e quando necessário utilizar técnicas como curvas de níveis ou terraceamento, porém tais procedimentos encarecem o plantio, além disso solos férteis, profundos e sem alagamentos são os ideais (TOWNSEND, 2000).

A produtividade da cana de açúcar esta diretamente relacionada ao preparo do solo, os cuidados necessários para um solo produtivo são adubação, correção de pH, controle de ervas daninhas e patógenos, além de correção dos aspectos físicos do solo como descompactação e sistematização do solo. Devido aos métodos mecanizados utilizados durante grandes períodos no canavial, ocorre o aumento da compactação do solo, sendo ideal refazer o preparo do solo a cada 5 anos aproximadamente (SANTIAGO; ROSSETO, 2013).

A movimentação do solo leva ao aumento da oxigenação local, ocasionando elevação da atividade microbiana, assim aumentando a perda de carbono no solo com sua liberação para a atmosfera, contribuindo com o aquecimento global, portanto o cultivo de cana-de-açúcar com o preparo mínimo do solo (plantio direto ou cultivo mínimo) auxiliam na diminuição do impacto ambiental na produção de cana-de-açúcar (SANTIAGO; ROSSETO, 2013).

3.2.2 Etapa de Corte, Carregamento e Transporte (CCT)

Esta etapa pode ser realizada total ou parcialmente mecanizada e é importante para a manutenção da qualidade da matéria-prima, considerando que a cana-de-açúcar deve possuir o maior valor possível de açúcar redutor total (ART) (quantidade total de açúcares: sacarose, glicose e frutose), além de alta pureza; é recomendado que ocorra em período inferior a 48 horas para evitar a formação de açúcar invertido e dextrana (PAIVA, 2006).

3.2.3 Etapa Industrial

Esta etapa tem início com a pesagem e amostragem para avaliação da qualidade na matéria prima através dos índices: PC (Pol da Cana: teor de sacarose aparente da cana), AR (açúcares redutores: quantidade de glicose e frutose presente na cana), ART (açúcar redutor total: quantidade total de açúcares: sacarose, glicose e frutose), ATR (açúcares totais recuperáveis), brix (porcentagem de sólidos solúveis contida em uma solução de sacarose), fibra e pureza da cana. O processo segue com a lavagem, em seguida a cana é picada, desfibrada e moída, o bagaço pode seguir para a queima, a fim de gerar vapor que alimenta o maquinário ou para cogeração de energia, enquanto o caldo pode resultar na produção de açúcar ou etanol (PAIVA, 2006).

A produção de etanol a partir do caldo de cana pode ocorrer com etapas iniciais comuns à do açúcar: o caldo proveniente da moenda após a decantação (fase que ocorre a separação de impurezas), resulta no caldo clarificado, que é evaporado para concentração e redução do teor de água, resultando no xarope. Após a eliminação de outras impurezas e o cozimento produz-se açúcar e mel, em seguida a centrifugação separa o mel do açúcar. O mel, o

caldo, xarope e água formam o mosto, que é acondicionado na dorna de fermentação com a adição da levedura (fermento), após cerca de sete horas resulta no vinho levedurado, com teor alcólico entre 6 e 10%, após a centrifugação a levedura pode ser reaproveitada para uma nova fermentação, enquanto o vinho é destilado para produção de etanol hidratado e posteriormente etanol anidro (PAIVA, 2006).

3.3 INTERFERENTES NA PRODUÇÃO DE ETANOL

A produção de etanol é influenciada por diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos que alteram o rendimento da fermentação, tais como quantidade de nutrientes, temperatura, pressão osmótica, pH e fatores relacionados à levedura *S. cerevisiae* (espécie, linhagem e concentração), além da contaminação bacteriana (LIMA et al., 2001).

A levedura *S. cerevisiae* exige alguns macro e micronutrientes que muitas vezes é necessário serem adicionados ao mosto para complementar as carências do meio e assim promover a eficiência do processo fermentativo (SILVA, 2008). Segundo Silva et al. (2006) a adição de nutrientes como o nitrogênio na quantidade adequada foi positiva para a redução de metabólitos secundários contaminantes totais (MSCT) (aldeído, acetonas, acetato de etila, metanol, n-propanol, iso-butanol e isoamilico) e o fósforo também apresentou benefício, porém deve ser adicionado em pequenas quantidades.

As temperaturas ótimas para a fermentação etanólica estão na faixa de 26 a 35 °C, mas temperaturas superiores, chegando a 38 °C podem ser utilizadas, dependendo das condições climáticas da região, entretanto temperaturas mais elevadas são mais propícias aos contaminantes bacterianos e aumentam a sensibilidade da levedura ao etanol, levando a formação de metabólitos secundários como o glicerol, além disso, temperaturas superiores podem aumentar a evaporação do etanol, sendo assim, é necessário o controle da temperatura durante o processo fermentativo (LIMA et al., 2001).

O pH ideal para a fermentação etanólica esta na faixa de 4 a 5, porém o processo pode ocorrer em uma ampla faixa de pH. Meios mais ácidos favorecem um maior rendimento no teor etílico e diminuem a contaminação bacteriana. Quando há a reutilização da levedura para um novo processo

fermentativo é necessário realizar a correção do pH com ácido sulfúrico até o pH entre 2,0 e 3,0 a fim de reduzir a contaminação microbiana (LIMA et al., 2001).

A levedura *S. cerevisiae* utiliza como substrato na fermentação etanólica, a partir da cana-de-açúcar, os açúcares glicose, frutose, e sacarose (STECKELBERG, 2001). Perdas de sacarose ocorrem pela ação de enzimas endógenas e exógenas (proveniente da contaminação microbiana) que provocam a inversão de açúcares, além da produção de metabólitos como ácidos orgânicos, etanol e polímeros como a dextrana, podem ocorrer a partir do corte da cana de açúcar, devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, como a variedade e maturidade da cultura, temperatura ambiente elevada, queima pré-colheita, lesões durante a coleta e transporte e contaminação microbiana durante a pós-colheita (SOLOMON, 2000). Esse decréscimo no teor de sacarose pode ser contínuo proporcional às condições de higiene durante o processamento, causando grande prejuízo à indústria sucroalcooleira (SOLOMON, 2000).

A contaminação microbiana é um grave problema para a fermentação etanólica, pois causa redução no rendimento final do processo, devido à diminuição da viabilidade celular de *S. cerevisiae*, consumo de sacarose e nutrientes, produção de metabólitos indesejados, dificuldades na centrifugação, além do aumento do tempo de fermentação e da quantidade de açúcares não fermentáveis (CHERUBIM, 2003).

3.3.1 Contaminação Bacteriana

A contaminação bacteriana é um prejuízo para a fermentação alcoólica desde a etapa agrícola, e é favorecida durante o processamento, a presença de solo juntamente com a cana-de-açúcar carrega grande quantidade de micro-organismos que após a moagem contaminam o caldo e em razão das condições favoráveis como temperatura e pH favorecem o crescimento destes contaminantes (SOLOMON, 2000). Outras condições que favorecem a contaminação bacteriana é a disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos e a alta atividade de água presentes no caldo de cana (GALLO, 1989).

Os principais contaminantes da fermentação alcoólica são bactérias Gram-positivas, sendo o gênero *Lactobacillus* o representante de maior prevalência. Outras bactérias envolvidas na contaminação da indústria, durante a produção de

etanol pertencem aos gêneros *Clostridium*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Weisella* (GALLO, 1989; SKINER, LEATHERS, 2004; ANDRIETTA et al., 2007).

Há prejuízos na indústria sucroalcooleira causados pela presença dos contaminantes, os quais afetam o rendimento fermentativo devido à presença de bactérias lácticas que degradam a sacarose (NARENDRANATH, 1997; OLIVA-NETO & YOKOYA, 1997). A produção de etanol é reduzida pela contaminação, que, e ainda, inibe o crescimento da levedura (MAKANJUOLA et al., 1992, CHANG et al., 1995; NGANG et al., 1990, ; NARENDRANATH et al., 2000).

Vários fatores são atribuídos à diminuição do rendimento da fermentação etanólica, tais como a floculação das leveduras, o que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas (OLIVA-NETO & YOKOYA, 1997). Há também o desvio de muitos nutrientes para a multiplicação das bactérias (NARENDRANATH et al., 1997), sendo que cada molécula de açúcar direcionada para a produção de ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas (INGLEDEW, 1995). Outro fator é a diminuição da viabilidade das leveduras causada pelo microrganismo contaminante (YOKOYA, 1989), devido à produção de metabólitos (principalmente os ácidos láctico e acético) (BEVAN, BOND, 1971) e à competição por nutrientes do meio (NOBRE, HORII, ALCARDE, 2007).

Durante a fermentação alcoólica ocorrem várias interações entre leveduras e bactérias, esta interação pode levar a inibição do desenvolvimento de leveduras, bactérias como *L. fermentum* e *Bacillus subtilis* reduzem a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* em cultivo misto, de modo que a presença dessas bactérias somada à acidez do meio foram os principais fatores que levaram a prejuízos para levedura (NOBRE, HORII, ALCARDE, 2007).

Oliveira-Freguglia, Horii (1998) também observaram que a contaminação por *Lactobacillus fermentum* causa floculação no processo fermentativo e influencia na viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo reduzir a valores próximos à zero em cerca de 12 horas após o término da fermentação alcoólica, e causam grandes prejuízos às leveduras mesmo depois de tratados com antimicrobianos ou calor, devido à toxicidade dos produtos metabólicos de *L. fermentum*.

Outros autores relataram perdas na produção causadas por *Lactobacillus* sp. (HYNES et al., 1997; NARENDRANATH et al., 1997), e tal estudo é relevante pois qualquer redução na produção de etanol tem importantes consequências econômicas para a indústria do álcool combustível, na qual as margens de lucro costumam ser muito baixas (MAKANJUOLA et al., 1992).

3.3.1.1 Alternativas de controle da contaminação

Há alguns processos que têm sido desenvolvidos para o controle da contaminação durante a fermentação alcoólica. No Brasil a produção de etanol é atualmente realizada pelo processo de fermentação em batelada alimentada ou contínuo, com reciclo de células de leveduras, de forma que contaminantes bacterianos são também reciclados e podem causar problemas devido à competição pelo mesmo substrato (MENEHIN et al., 2008). O controle bacteriano é feito pela adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento ou utilizando-se biocidas.

A adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento é um dos processos mais usados para o controle bacteriano (SIMPSON, HAMMOND, 1989; MENEHIN et al., 2008;), nele o ácido sulfúrico é usado para ajustar o pH durante a fermentação. A adição de ácido sulfúrico, segundo Gallo (1989), reduz até 44,56% da população de bactérias contaminantes, além de ter custo reduzido e contribuir na redução da floculação, entretanto, não é satisfatório nos processos contínuos em que as células das leveduras são recicladas.

O uso de antibióticos como a penicilina G, estreptomicina, tetraciclina, a virginiamicina (HYNES et al., 1997; ISLAM et al., 1999), e outras misturas é também um processo muito utilizado para o controle da contaminação bacteriana na indústria sucroalcooleira (DAY et al., 1954; AQUARONE, 1960). Antibióticos como a penicilina e virginiamicina, de fato são usados na produção de bioetanol atualmente (HYNES et al., 1997; BAYROCK et al., 2003). Entretanto, o uso de antibióticos no processo industrial tem gerado controvérsias. Métodos que envolvem antibióticos como b-lactâmicos são muito caros (AQUARONE, 1960; DAY et al., 1954). Além disso, o uso inadequado de antibióticos pode contribuir para seleção de cepas resistentes a antibióticos (KHACHATOURIANS, 1998).

Segundo Bayrock et al. (2003), o modo da adição do antibiótico também interfere no controle da contaminação. Um número menor de células viáveis de *L. paracasei* em cultivo conjunto com *S. cerevisiae* e maior aumento na concentração de etanol foi encontrada quando a adição do antibiótico é feita de forma pulsada ao invés de contínua.

Desta maneira, outros métodos de controle são estudados, Meneghin et al. (2008) utilizaram dióxido de cloro como biocida para controlar a contaminação da fermentação alcoólica, que resultou no controle das bactérias contaminantes do processo fermentativo, porém as leveduras também foram sensíveis ao mesmo.

Peróxido de hidrogênio, metabissulfito de potássio, 3, 4, 4 - trichlorocarbanilide e antibióticos foram igualmente usados como controle do crescimento de bactérias lácticas o (CHANG et al., 1997; NARENDRANATH et al., 2000; BAYROCK et al., 2003)

3.4 PRODUTOS NATURAIS NA PESQUISA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS

A vantagem da utilização de produtos naturais em relação aos produtos químicos deve-se a capacidade natural de realizar interações biológicas específicas, podendo resultar em novos mecanismos de ação e novas ações terapêuticas. Além disso, os produtos microbianos podem possuir semelhanças a metabólitos de outros organismos, por exemplo, podendo facilitar a absorção e metabolização quando utilizado como droga em mamíferos (BÉRDY, 2005).

A maioria dos produtos naturais bioativos é derivada de micro-organismos procariontes e eucariontes (que são os maiores responsáveis pela produção de antibióticos, exceto os protozoários), além de plantas superiores e animais. As plantas superiores representam de 500 a 600 mil metabólitos como alcaloides, flavonoides, terpenos, esteroides, carboidratos, entre outros (BÉRDY, 2005).

Os produtos naturais podem ou não exercer uma interação com os organismos vivos, quando há interação, ou seja, a atividade biológica, ela pode ser específica, manifestada com baixas doses (bioativo) ou inespecífica (efeito tóxico). Tais compostos podem ter origem no metabolismo primário ou secundário de organismos vivos, sendo o primário essenciais aos sistemas biológicos como

carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucléicos, enquanto os metabólitos secundários possuem baixo peso molecular, estrutura química e funções diversas, específico de cada organismo produtor (BÉRDY, 2005).

Estes metabólitos secundários de micro-organismos geralmente possuem atividade específica sobre outros organismos (bioativos), sendo importantes na pesquisa de novos antibióticos (BÉRDY, 2005).

Os produtos naturais são compostos com estruturas privilegiadas selecionadas por pressões evolutivas para interagir com uma diversidade de proteínas e outros alvos biológicos, para ações específicas, portanto os produtos naturais são promissores no desenvolvimento de medicamentos com diversas indicações terapêuticas (KOEHN, CARTER, 2005).

3.4.1 Metabólitos Bacterianos: Produtos Naturais Bioativos

A pesquisa por antibióticos tem sido intensificada desde a descoberta de Fleming, sendo que nos últimos anos milhares de produtos naturais derivados do metabolismo microbiano tornaram-se conhecidos. Nas décadas de 40 e 50 foram descobertos os principais antibióticos como tetraciclinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos, nas décadas de 50 a 70 seguiu-se o sucesso da quimioterapia, os antibióticos deste período eram produzidos principalmente de espécies de *Streptomyces* (70 a 80%). Entre os anos de 70 e 90 produtos microbianos bioativos destacaram-se com diversas ações farmacológicas e agrícolas, nesta época também acompanhada pelo problema da terapia com os patógenos multirresistentes, neste período houve o predomínio de produtos obtidos a partir de Actinomicetos (65 a 70%) e Actinomicetos raros (mais de 30%). A partir da década de 90 ocorreu um aumento no número de metabólitos principalmente sem ação antibiótica, porém com diversas ações farmacológicas e agrícolas, além disso, ocorreu o aumento de metabólitos fúngicos e síntese química. Em 1970 eram conhecidos cerca de 2500 antibióticos, a partir disto o número de metabólitos microbianos bioativos dobrava a cada década, chegando em 2000 a aproximadamente 20000 compostos antibióticos, em 2002 totalizaram 22000 metabólitos secundários bioativos, inclusive antibióticos, publicados (BÉRDY, 2005).

Dentre os procariotos os compostos com atividade antibiótica são produzidos principalmente por bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e

Pseudomonas (SHODA, 2000; RAAIJMAKERS, VLAMI, SOUZA, 2002; BÉRDY, 2005). A estrutura química dos antibióticos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* geralmente são peptídeos ou peptídeos modificados, heterocíclicos simples (fenazinas) e compostos alifáticos (derivados de ácidos graxos), mas a ocorrência de outros tipos de produtos químicos (por exemplo, complexos macrolactonas) é relativamente rara (BÉRDY, 2005).

Os produtos naturais originados de metabólitos microbianos apresentam uma diversidade e complexidade estrutural que os potencializam como fontes no desenvolvimento de novas drogas, inclusive de agentes antimicrobianos, além disso, os avanços científicos e tecnológicos como biossíntese combinatória e genômica pode facilitar a descoberta de novas drogas, muitos produtos naturais tem potencial como novas classes de agentes antibacterianos, com mecanismos de ação e propriedades distintas dos medicamentos atualmente utilizados (LAM, 2007).

O extrato de bruto obtido a partir de produtos naturais bioativos podem possuir várias substâncias ativas que inibem uma a outra, causando problemas no teste de seleção de substâncias de interesse biológicos, sendo assim, é necessária a realização de um fracionamento, porém é um processo lento e oneroso (PELAEZ, 2006). Os métodos cromatográficos e outras técnicas de separação, além das avaliações espectroscópicas para a elucidação da estrutura das substâncias são de grande importância nessa prospecção de novas drogas (KOEHN, CARTER, 2005).

3.5 PURIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Os métodos cromatográficos permitem facilmente a separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, podem ser utilizados associados a outros métodos instrumentais analíticos como espectrofotometria ou espectrometria de massas. A cromatografia é um processo físico-químico de separação, que ocorre devido à interação dos componentes presentes na amostra entre a fase estacionária e a fase móvel, onde se desloca sobre a fase estacionária e os componentes da amostra migram seletivamente entre as duas fases (COLLINS, 2006).

A cromatografia pode ser classificada como planar ou em coluna, considerando a fase estacionária que pode ser adicionada sobre superfície plana ou

em coluna, estas podem ser variáveis quanto ao diâmetro da coluna, as colunas de 6 a 50 mm de diâmetro interno são as colunas preparativas, de 2 a 6 mm as colunas analíticas, de 1 a 2 mm as colunas com microdiâmetros e as menores de 1 mm são as colunas capilares (COLLINS, 2006).

A cromatografia pode ser classificada também quanto à fase móvel, na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte, na cromatografia líquida, um líquido e na cromatografia supercrítica a fase móvel é um fluido supercrítico (fluido com temperatura e pressão acima do seu ponto crítico), e ainda, a fase estacionária pode estar sólida, líquida ou quimicamente ligada (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida em coluna pode ser classificada como cromatografia líquida clássica, que utiliza colunas de vidro e baixa pressão, geralmente apenas pela força da gravidade (cromatografia líquida por força da gravidade) e como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), frequentemente utiliza colunas metálicas e alta pressão (COLLINS, 2006).

3.5.1 Cromatografia Líquida por Adsorção

A cromatografia líquida de adsorção geralmente utiliza uma coluna de vidro recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel (líquida), na qual a sorção isotérmica (adsorção) entre as superfícies das fases móvel e estacionária resulta na separação dos componentes. É tecnicamente mais simples não exigindo equipamentos caros. Conforme o tamanho da coluna usada, é facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente, por cromatografia em camada delgada. A velocidade de separação de um componente depende de sua adsorção pela fase estacionária, isto é, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápido é sua passagem pela coluna, e vice versa. Conclui-se, portanto, que quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto (terá maior grau de pureza). A separação dos componentes de uma mistura é devido às diferenças nas forças de adsorção (forças eletrostáticas de van der Waals) entre eles e o adsorvente (COLLINS, 2006).

3.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD é um método de separação baseada no princípio da adsorção, dessa forma ocorre a migração diferencial dos compostos de uma amostra sobre a camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana, no caso de fases estacionárias modificadas a separação pode ocorrer por partição ou troca iônica, possibilitando o uso do método para substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas (LOPES, 2006) .

Esta técnica é bastante utilizada por ser rápida, versátil, reprodutível, baixo custo, além de fácil compreensão e execução. Pode ser analítica ou preparativa, dependendo da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise. Os adsorventes geralmente utilizados são a sílica, alumina, terra diatomácea, celulose ou poliamida (LOPES, 2006).

A CCD permite, também a avaliação da atividade antimicrobiana através do teste de bioautografia. Nesta, os produtos químicos adsorvidos na superfície das placas cromatográficas entram em contato com um meio de cultivo sólido inoculado com culturas bacterianas ou fúngicas que precisam ser controladas. Caso haja atividade inibitória é possível identificar zonas inibição, porém um fator limitante da metodologia é a solubilidade do composto com atividade antimicrobiana, pois aqueles com baixa solubilidade em água podem não ser detectados (CHOMA; GRZELAK, 2011).

4 CONCLUSÃO

O etanol é um biocombústível importante para o suprimento energético mundial, além de reduzir o impacto ambiental e a dependência do petróleo. Entre os problemas enfrentados durante a produção de etanol a contaminação bacteriana é um dos mais graves, pois leva a redução do rendimento produtivo, causando prejuízos a indústria sucroalcooleira, portanto o controle dessa contaminação é fundamental. Os produtos naturais, como os produtos do metabolismo bacteriano, com atividade antibiótica podem contribuir para minimização dos problemas causados pela contaminação bacteriana durante o processo fermentativo para a obtenção de etanol.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Editora Pancrom, 2005.
- ANDRIETTA, M.G.S. et al. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**. 109: 195-200, 2007.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**. 8:263–268, 1960.
- BAYROCK, D.P.; THOMAS, K. C.; INCLEDEW, W. M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentation by constant or pulsed addition of penicillin G. **Applied Environmental Microbiology**. 62 : 468-502, 2003.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Jornal of Antibiotics**. 58: 1–26, 2005.
- BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill - a preliminary survey. In: **Conference of the queensland society of sugar cane tecnologists**, 38., Cairns. Proceedings. Brisbane: Watson Ferguson, p.137-143, 1971.
- CHANG IS.; KIM B.H.; SHIN P.K.; LEE WK. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 5:309-314, 1995.
- CHANG, IS.; KIM, B.H.; SHIN, P.K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied Environmental Microbiology**., 63: 1-9,1997.
- CHERUBIN, A.R. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP, 124p, 2003.
- CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**. 1218: 2684–2691, 2011.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: Collins CH, Braga GL, Bonato OS. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas-SP, 2006.
- DAY, W. H.; W. C. SERJAK, J. R.; STRATTON.; STONE, L. Antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2:252–258, 1954.
- DOE (Departamento de energia dos Estados Unidos). Biofuels & Greenhouse Gas Emissions: Myths versus Facts. **Department of Energy**: United States, 2008.

FAO. The State of Food and Agriculture: Biofuels: Prospects, Risks, and Opportunities. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**: Rome, 2008.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas: **Tese de Doutorado** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989, 388p.

GAROMA, BEM-KALED, BEYENE, Comparative resource analyses for ethanol produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal of Energy Research**. 36: 1065–1076, 2011.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. 18: 284-291, 1997.

INGLEDEW, W.M. The biochemistry of alcohol production In: LYONS, T.P.; KELSALL, D.R.; MURTAGH, J.E. (Ed.) **The alcohol textbook**. Nottingham: Nottingham University Press, p.55-79, 1995.

ISLAM, M.; TOLEDO, R.; HAMDY, M.K. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. **Biomass and Bioenergy**. 17:369–376, 1999.

KHACHATOURIANS, G.G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association Journal**. J 159:1129–1136, 1998.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. 4, 206, 2005.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, 24 (68), 2010.

LAM, K. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends Microbiology** 15, 279-289, 2007.

LEITE, R.C.C.; LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos** - CEBRAP, n. 78, p 15-21, 2007.

LIMA, U.A. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora: Edgard Blucher, 1 ed. cap. 1, p. 1-40, v.3, 2001.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: Collins CH, Braga GL, Bonato OS. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas-SP, 2006.

MAKANJUOLA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. 1992. Some effects of lactic acid on laboratory scale yeast fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. 14: 351– 357, 1992.

MENEGHIN, S.P.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**. 39(2), 337-343, 2008.

NARENDRANATH N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast - catalyzed ethanol fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 4158–4163, 1997.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of Lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, 66: 4187-4192, 2000.

NGANG, J.J. E. F. LETOURNEAU, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology** 31:125-128, 1990.

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

OLIVEIRA, F. R.M; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agricola** v.55 n. 3 Piracicaba 1998.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; 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**. 56, 125–131; 2011.

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

PAIVA, R.P.O. Um modelo baseado em seleção de processos e dimensionamento de lotes para o planejamento agregado da produção em usinas de açúcar e álcool. 182 f. **Dissertação de Mestrado** em Eng. de Produção, Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

PELAEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products— Can history repeat? **Biochemical pharmacology**, 71: 981 – 990, 2006.

RAAIJMAKERS, J. M., VLAMI, M., SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Kluwer Academic Publishers**. Holanda, 81: 537-547, 2002.

SANTIAGO, A.D.; ROSSETO, R. Cana-de-açúcar – Preparo do solo. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Disponível em:**
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeaacucar/arvore/CONTAG01_20_711200516716.html> Acesso em: 14 mar. 2013.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521; 2000.

SOLOMON, S. Post-Harvest Cane Deterioration and its Millin Consequences. **Sugar technology**, 2 (1&2) : 1 – 18, 2000.

SILVA, J.A., SILVA, F.L.H., ALVES, R.R.N, SANTANA, D.P. Influências das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção de metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, 29, (4): 695-698, 2006.

SILVA, J.A., LIMA, B.P.G., SILVA, F.L.H., MADRUGA, M.S., SANTANA, D.P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**. 31 (5), 2008.

SIMPSON, W.J.; HAMMOND, J.R.M. The response of brewing yeast to acid washing. **Journal of the Institute of Brewing**. 95: 347-354, 1989.

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

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

TOWNSEND, C.R. Recomendações técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar forrageira em Rondônia. **EMBRAPA-CPAF, Rondônia**, 21, 2-5, 2000.

YOKOYA, F. Microbiologia do processo de fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, p.1-22, 1989.

Avaliação da atividade antibiótica de compostos extracelulares produzido por *Pseudomonas aeruginosa* no controle de *Lactobacillus* sp. na produção de etanol

Beranger, Jamile P.O.; Oliveira, Admilton G.; Simionato, Ane; Stanganelli, Mayara M.; Góis, Cintia G; Andrade, Galdino

RESUMO: O etanol é uma alternativa viável à utilização de combustíveis fósseis, como fonte energética renovável e emissão de gases reduzida. A produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* é influenciada pela contaminação bacteriana, principalmente do gênero *Lactobacillus*. Os produtos naturais são fontes promissoras na prospecção de novos antibióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibiótica de metabólitos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) no controle de *Lactobacillus* sp. Os metabólitos produzidos pela cepa LV, foram purificados por métodos cromatográficos e as frações foram testadas quanto a atividade antibiótica. As frações obtidas apresentaram resultados satisfatórios no controle de *Lactobacillus* sp. sem inibir *S. cerevisiae*. A concentração inibitória mínima da fração com maior atividade antibiótica (F6a.7.4) foi de 31, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados demonstraram que compostos isolados a partir de metabólitos secundários de *P. aeruginosa*, cepa LV, podem ser uma excelente ferramenta no controle de *Lactobacillus* sp., importante contaminante na produção de etanol.

Palavras chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus* sp., fermentação alcoólica, *Pseudomonas aeruginosa*, atividade antibiótica.

1 INTRODUÇÃO

A busca para a produção e utilização de biocombustíveis é uma necessidade eminente, devido a alta demanda energética mundial, à dependência do petróleo (fonte não renovável) e as consequências ambientais pelo uso de combustíveis fósseis, como a emissão de gases do efeito estufa, sendo assim, o etanol, biocombustível produzido a partir de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é uma alternativa promissora (Leite, Leal, 2007).

Estudos indicam que os combustíveis fósseis seriam suficientes para suprir o mercado por mais algumas décadas, entretanto, problemas como efeito estufa e aquecimento global, são preocupações mundiais, um indicativo é o compromisso dos países desenvolvidos em reduzirem a emissão de gás carbônico pela queima de petróleo em 5%, afirmado pelo protocolo de Kyoto (Andrietta et al.,

2007). Dessa forma a substituição do petróleo por um biocombustível como etanol pode minimizar os impactos ao meio ambiente.

O Brasil é um importante produtor de etanol combustível, produzido principalmente a partir da fermentação da cana-de-açúcar, as condições ambientais favorecem o país com potencial no mercado interno e externo (Kohlhepp, 2010). De acordo com Garoma, Bem-Kaled e Beyene (2011) a cana-de-açúcar como matéria-prima na produção de etanol apresenta um desempenho superior tanto no rendimento quanto na redução da emissão de gases do efeito estufa, quando comparada ao milho. Segundo Andrietta et al. (2007) o rendimento é de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar.

A produção de etanol é influenciada por diversos fatores que alteram o rendimento da fermentação, tais como temperatura, pressão osmótica, pH, quantidade de nutrientes e fatores relacionados a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (espécie, linhagem e quantidade de células viáveis), além da contaminação bacteriana (Lima et al. 2001).

A contaminação bacteriana é propiciada pela grande quantidade de micro-organismos provenientes da etapa agrícola, além das condições favoráveis durante o processamento na indústria sucroalcooleira como pH e temperatura ótima (Solomon, 2000). Dessa forma, um dos problemas mais relevantes na indústria sucroalcooleira é a contaminação do mosto por bactérias, pois elas resultam em uma diminuição da eficiência da levedura *S. cerevisiae* no processo fermentativo para a produção de álcool devido a competição por nutrientes, inclusive a sacarose e pela produção e liberação de metabólitos prejudiciais para a levedura. (Andrietta et al., 2007). Além disso, a contaminação bacteriana pode levar a floculação, ou seja agregação e precipitação das células de levedura que resulta na diminuição da

velocidade de fermentação (Oliva-Neto, Yokoya, 1997). Os principais contaminantes da fermentação alcoólica são bactérias Gram-positivas, sendo os gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus* os representantes de maior prevalência (Skinner, Leathers, 2004; Andrietta et al., 2007).

O controle destes contaminantes geralmente é realizado pela adição de antibióticos ao mosto. Essa medida é de grande preocupação, pois o uso indiscriminado desses antibióticos pode levar a seleção de bactérias resistentes dificultando ainda mais a eliminação destes contaminantes do processo fermentativo, além de elevar os custos para a indústria sucroalcooleira e o impacto destes antibióticos no meio ambiente (Amorim, Leão, 2005).

Produtos naturais obtidos a partir do metabolismo de micro-organismos, plantas ou animais são promissores na prospecção de novas drogas, inclusive novos antibióticos, a vantagem da utilização destes metabólitos é a alta interação biológica específica (Bérdy, 2005). Os metabólitos secundários com atividade antibiótica podem ser produzidos a partir de procariotos, principalmente por actinomicetos (*Streptomyces* e actinomicetos raros) e outras bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (Bérdy, 2005).

Compostos do metabolismo secundário produzidos por espécies antagonistas, quando em competição, podem apresentar atividade antimicrobiana (Oliveira et al., 2011). O uso de metabólitos secundários com atividade antibiótica pode ser útil no controle de contaminantes da indústria sucroalcooleira, reduzindo perdas operacionais durante a fermentação etanólica como a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, prejuízos causados pelos micro-organismos contaminantes (Oliva-Neto, Yokoya, 1997).

Considerando os problemas que a contaminação bacteriana apresenta para a indústria sucroalcooleira na produção de etanol, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibiótica de composto(s) semi-purificado(s) do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV), no controle de *Lactobacillus* sp., contaminante bacteriano isolado durante processo agroindustrial de fermentação etanólica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

As cepas *Lactobacillus* sp. e *S. cerevisiae* foram isoladas a partir do mosto coletado durante o processo de fermentação na Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA, em Jandaia do Sul, Paraná, após um estudo da comunidade bacteriana que indicou a predominância de *Lactobacillus* sp., compondo mais de 90% da comunidade. As cepas foram cultivadas em meio MCC (caldo de cana-de-açúcar clarificado diluído com água destilada para $5.0 \pm 0,1^\circ$ brix, extrato de levedura 10 g, peptona 10 g para 1 litro de meio de cultura) (Nobre, Horii, Alcarde, 2007).

A cepa *P. aeruginosa* (cepa LV), produtora de metabólitos secundários com atividade antibiótica foi isolada a partir de lesão de cancro cítrico proveniente de um pomar no Município de Astorga, Paraná, Brasil (Oliveira et al., 2004). As cepas utilizadas nos experimentos foram criopreservadas em solução de glicerol 40% em nitrogênio líquido.

2.2 Produção, Extração e Purificação de Metabólitos Secundários Bacterianos

2.2.1 Produção de Metabólitos Secundários Bacterianos

A produção dos compostos antibióticos produzidos pela bactéria antagonista *P. aeruginosa* (cepa LV) foram realizados de acordo com a patente intitulada “Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas”, 10 de setembro de 2008 (PI 0803350- 1A2) e descrita por Oliveira et al. (2011). O cultivo líquido após o tempo de incubação foi centrifugado, e o sobrenadante livre de células foi concentrado em evaporador rotativo (Büchi® R 215) à 73 °C a fim de reduzir para um décimo o volume do sobrenadante. A amostra concentrada foi armazenada a 4 °C para posterior extração.

2.2.1 Extração de Metabólitos Secundários Bacterianos

Para a extração dos compostos antibióticos do sobrenadante do cultivo de *P. aeruginosa* (cepa LV) foi utilizado o método de partição líquido-líquido com o uso do solvente orgânico diclorometano. A fase diclorometano (FD) foi concentrada em evaporador rotatório (Büchi® R 215) a 40 °C, em seguida, o volume final foi evaporado a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A FD foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada (Jouan® LP3). A FD liofilizada foi testada quanto a sua atividade antibiótica por método de difusão em ágar e bioautografia.

2.2.3 Purificação de Metabólitos Secundários Bacterianos

2.2.3.1 Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV)

O fracionamento da FD foi realizado por CLV, baseado no método descrito por Oliveira et al. (2011), com algumas modificações.

No método modificado foi utilizada uma coluna de vidro (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo - 100 mmHg, 500 mg de amostra (FD), como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Macherey–Nagel[®]) e como fases móveis solventes orgânicos grau HPLC com polaridade crescente (Panreac[®]); cada fase móvel foi dividida em duas frações de 200 mL cada (a e b): hexano (F1a e F1b); hexano / diclorometano (1 : 1; F2a e F2b); diclorometano (F3a e F3b); diclorometano/acetato de etila (1 : 1; F4a e F4b); acetato de etila (F5a e F5b); acetato de etila/metanol (1 : 1; F6a e F6b); metanol (F7a e F7b); metanol/água (1 : 1; F8a F8b) e água (F9a e F9b). As frações foram concentradas em evaporador rotatório (Büchi[®] R 215), congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (Jouan[®] LP3).

Todas as frações foram testadas quanto a sua atividade antibiótica pelo método de difusão em ágar e as frações ativas foram testadas por bioautografia para a determinação da maior atividade antibiótica entre as frações, direcionando o processo de purificação.

2.2.3.2 Cromatografia Flash (CF)

A fração com maior atividade antibiótica obtida por CLV (F6a) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna. Para a primeira CF foi utilizado

uma coluna de vidro (8 mm Φ x 650 mm altura) com pressão de 5 psi, a coluna foi montada com 29 g de sílica gel (0,04 – 0,063 mm, Macherey–Nagel[®]) equilibrada com a primeira mistura de solvente e posteriormente adicionado uma mistura da amostra com sílica gel (250 mg por vez). O sistema eluente (Panreac[®]) utilizado, em proporção volumétrica, foi: 150 mL clorofórmio/metanol (95 : 5), 150 mL clorofórmio / acetona / metanol (75 : 20 : 5), 150 mL clorofórmio / acetona / metanol (60: 15: 25), 50mL acetona/metanol (60: 40), 50 mL metanol (100%) e 50 mL metanol / água destilada (50 : 50). As amostras foram coletadas em 300 tubos com aproximadamente 2 mL cada, analisadas por CCD e agrupadas por semelhança cromatográfica, sendo obtidas 9 frações (F6a.1 à F6a.9). As frações foram concentradas em ventilador a temperatura ambiente ao abrigo da luz e testadas quanto sua atividade antibiótica pelo método de difusão em ágar e bioautografia.

A segunda CF foi realizada a partir das frações com maior atividade antibiótica obtida na primeira CF (F6a.6; F6a.7 e F6a.8). As três frações foram reunidas resultando na fração denominada (F6a.7). Para esta CF foi utilizada uma coluna de vidro (8 mm Φ x 450 mm altura) com pressão de 5 psi , a coluna foi montada com 10 g de sílica gel nas condições anteriores, a partir de 60 mg de amostra por vez. O sistema eluente utilizado, em proporção volumétrica, foi: 20 mL acetonitrila (100%), 15 mL acetonitrila / metanol (83 : 17), 15 mL acetonitrila / metanol (72 : 28), 15 mL acetonitrila / metanol (64 : 37), 10 mL acetonitrila / metanol (66 : 44), 10 mL acetonitrila / metanol (50 : 50), 20mL metanol (100%). As amostras foram coletadas, analisadas por CCD e agrupadas por semelhança cromatográfica, sendo obtidas 8 frações (F6a.7.1 à F6a.7.8). As frações foram concentradas a temperatura ambiente ao abrigo da luz e testadas quanto sua atividade antibiótica

pelo método de difusão em ágar e para as frações com maior atividade antibiótica foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM).

2.2.3.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD foi realizada para avaliação qualitativa dos componentes das frações obtidas nos processos de separação, utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®) em suporte de alumínio. O sistema eluente usado para o desenvolvimento das cromatoplasmas foi: clorofórmio/metanol ou ciclohexano / acetato de etila / metanol em diferentes proporções volumétricas para as diferentes frações testadas. As manchas foram identificadas sob luz UV à 254 nm e 366 nm e determinado o valor de R_f (fator de retenção).

2.3 Ensaio de Atividade Antibiótica das Frações Obtidas na CLV e CF

As frações obtidas em CLV e CF foram testadas quanto à atividades pelo método de halo de inibição com uso de disco de papel (Laborclin®) de 6 mm de diâmetro. O inóculo da bactéria *Lactobacillus* sp. e da levedura *S. cerevisiae* foram obtidos a partir de cultura em fase exponencial a uma concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O 0.14 para *Lactobacillus* sp. e D.O 0.22 para *S. cerevisiae*, $\lambda = 590$ nm), e inoculados com swab em placa de Petri com ágar de cana-de-açúcar clarificado (MCC) com azul de bromotimol. Este corante foi utilizado para facilitar a visualização da zona de inibição, na presença deste corante às colônias apresentam coloração amarela. Alíquotas de 10 μ L de cada fração foram transferidas para os discos contendo 1000 μ g para as frações obtidas na CLV, 500 μ g ou 250 μ g para as

frações obtidas por CF e como controle foi utilizado uma alíquota de 10 μL de solvente orgânico (solventes usados na diluição de cada fração). As placas foram incubadas a 34 °C por 24 h e a leitura realizada através da mensuração do diâmetro dos halos de inibição (mm).

2.4 Bioautografia das Frações Obtidas na CF

Foi realizado teste de bioautografia com as placas de CCD de todas as frações. As placas de CCD já com as frações aplicadas e devidamente eluídas, foram depositadas em placas de Petri contendo 1 mL do inóculo bacteriano (*Lactobacillus* sp. ou *S. cerevisiae*) e 20 mL de ágar nutriente (AN). Através do método de “pour-plate”, as placas de CCD foram incorporadas ao meio de cultivo adicionado de cada inóculo que foi obtido a partir de cultura em fase exponencial determinado nas condições anteriores. As placas foram incubadas a 34 °C 24 h⁻¹ e a leitura foi através da presença de zona de inibição (mm) após revelação com uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil - 1H - tetrazólio (TTC) a 1% após a incubação a 34 °C por 2 h.

2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada utilizando microplacas de fundo plano com 96 poços. Foram utilizadas 10 concentrações das frações com maior atividade antibiótica obtidas em CF, com 2 repetições cada. Para o controle negativo foi utilizado caldo MCC (200 μL) e para o controle positivo 180 μL de caldo MCC e 20 μL de suspensão em caldo MCC de *Lactobacillus* sp. a 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O 0.14, $\lambda=$

590 nm), resultando na concentração final de 10^7 UFC mL⁻¹. Nos tratamentos foram adicionados 20 µL da suspensão de *Lactobacillus* sp. na mesma concentração descrita acima, e 180 µL de cada fração com atividade antibiótica diluída em caldo MCC nas concentrações (500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 µg mL⁻¹), foi realizado um controle de esterilidade do composto, no qual foram adicionados 180 µL de cada diluição da fração ativa e 20 µL de caldo MCC. As placas foram incubadas por 24 h à 34 °C e a leitura foi realizada em leitor de microplaca (ASYS modelo UVM 340, $\lambda = 590$ nm) e em seguida foi adicionado 10 µL de uma solução de cloreto de cloreto de 2, 3, 5-trifenil - 1H – tetrazólio (TTC) a 1% com incubação por 2 h a 34 °C. A segunda leitura foi visual através da mudança de cor, os poços que não apresentaram crescimento permaneceram sem alteração de cor, enquanto que aqueles com crescimento ficaram com a coloração rosa-avermelhada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da Atividade Antibiótica

Segundo Oliveira et al. (2011), os metabólitos das frações semi-purificadas da cepa LV, apresentaram resultados significativos quanto à atividade antimicrobiana frente ao fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cepa 306), resultando na busca de novos estudos destes compostos no controle de outras bactérias como o *Lactobacillus* sp., contaminante da dorna na indústria sucroalcooleira, durante processo fermentativo para produção de etanol.

Das frações com atividade antibiótica a FD apresentou reduzido halo de inibição frente à *Lactobacillus* sp. (Tabela 1 e 2), isto se deve ao fato desta fração ser o extrato bruto, ou seja, é um concentrado de todos os compostos extraído do meio de cultivo da bactéria antagonista *Pseudomonas* sp. cepa LV, sendo assim, a(as) substância(as) com atividade antibiótica pode estar diluída ou inibida por outros compostos também presente nesta fração.

Para o método de Oliveira et al. (2011) após a primeira CLV as frações F3 (acetato de etila) e F4 (metanol) apresentaram halos de inibição de 22 e 13 mm de diâmetro. Após a segunda CLV, a partir de F4, as frações F4D (diclorometano/acetato de etila), F4E (acetato de etila), F4F (acetato de etila/metanol) e F4G (metanol) apresentaram halos de inibição de 31, 8, 12 e 10 mm, respectivamente, frente ao *Lactobacillus* sp.. Entretanto, pelo método modificado após a primeira CLV resultou em 3 frações ativas (Figura 1) F4a (diclorometano / acetato de etila), F6a (acetato de etila / metanol) e F8a (metanol / água) com halos de inibição de 40, 22 e 12 mm, respectivamente, frente ao *Lactobacillus* sp. Estes dados indicam que a modificação resultou em uma maior eficiência na purificação, considerando que com uma única CLV obtiveram halos de inibição maiores quando comparados com o anterior, o qual necessitou de dois processos consecutivos de CLV, porém com menor atividade inibitória. O melhor desempenho destas frações semi-purificadas deve-se a gradativa elevação do grau de pureza de acordo com a realização dos métodos cromatográficos, portanto os compostos com atividade antibiótica encontram-se mais concentrados nestas frações quando comparado a FD.

As frações F3, F4D, F4E e F4a apesar de apresentarem atividade inibitória frente ao *Lactobacillus* sp. também foram ativas frente à levedura *S.*

cerevisiae, portanto, não são interessantes na utilização durante o processo industrial para produção de álcool, pois levaria a redução de rendimento da produção etanólica durante a fermentação do mosto pela levedura. Um resultado semelhante foi evidenciado por Oliva-Neto e Yokoya (2001) que testaram diversos produtos no controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, apesar de alguns destes produtos como Metilditiocarbamato, Tiocianato, bromofenato e *n*-alquildimetilbenzil cloreto de amônio serem eficazes na inibição dos contaminantes, apresentaram efeito negativo no crescimento da levedura, na sua maioria em concentrações semelhantes à utilizada para reduzir a contaminação.

Embora as frações F3, F4D, F4E e F4a não sejam interessantes para a utilização no controle dos contaminantes na indústria sucroalcooleira, tais frações demonstram um potencial com atividade inibitória frente a outras leveduras e bactérias. Uma destas aplicações foi descrita por Oliveira et al. (2011). Segundo o autor a fração F3 apresentou atividade frente ao fitopatógeno *X. axonopodis* pv. *citri*. Além disso, outros trabalhos são desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, para a investigação do potencial e aplicabilidade de tais frações no controle de micro-organismos.

Com os resultados obtidos nos testes de atividade antibiótica das frações obtidas por CLV confirmaram a escolha da metodologia para separação primitiva das substâncias de interesse foi adequado, porém o interesse de obter uma substância com alto grau de pureza mostrou-se fundamental na continuação das pesquisas quanto à natureza da substância com atividade antagônica ao contaminante presente no processo fermentativo da indústria sucroalcooleira, *Lactobacillus* sp.

A necessidade de elevar o grau de purificação, o baixo rendimento da produção do composto e a facilidade dessa metodologia, foi realizada a purificação por cromatografia flash e monitorada por CCD. O emprego da CF resultou na primeira separação em 320 frações que após análise por CCD foram reunidas em 9 frações (F6a.1 à F6a.9).

O teste de difusão em ágar das frações obtidas após a primeira CF apresentou atividade inibitória em 4 frações na concentração de 500 µg (F6a.4, F6a.6, F6a.7, F6a.8) com halos de inibição de 8,5; 21; 27 e 17 mm, respectivamente, e 3 frações ativas na concentração de 250 µg (F6a.6, F6a.7, F6a.8), com halos de 18,5; 26,5 e 13 mm. Este fato indicou um avanço no grau de purificação pelo aumento da atividade das frações quando comparada a fração de inicial (F6a) com halo de 21 mm na concentração de 500 µg e a sua respectiva sub-fração F6a.7 apresentou halo de inibição de 27 mm na mesma concentração. Fato importante é que nenhuma das frações foi capaz de inibir *S. cerevisiae* nas concentrações testadas. Entretanto o rendimento deste processo é baixo, pois após 4 repetições da CF o rendimento obtido foi de 14% (F6a.6), 3,2 % (F6a.7) e 3,6 % (F6a.8) (frações mais ativas) (Tabela 3) e (Figura 2) e também houve uma perda de 10% neste método cromatográfico.

A CCD foi uma ferramenta importante no auxílio do monitoramento dos processos de purificação, nos testes iniciais de atividade antimicrobiana por bioautografia e também como parâmetro na definição das frações da cromatografia flash. Através deste método foi possível o monitoramento da purificação por CF, auxiliando na separação das frações pela comparação do perfil cromatográfico (Figura 3) e verificar a evolução do grau de purificação das substâncias quando comparados os cromatogramas da fração FD e F4 e F6a com as fração mais

purificadas (Figura 4). Nas primeiras frações foi possível observar a presença de diversas bandas com valores de R_f próximos, já nas últimas, as frações apresentam-se com pureza superior e com as bandas bem distintas.

Os sistemas eluentes que apresentaram melhor resolução para a maioria das frações foi a mistura dos solventes ciclohexano / acetato de etila / metanol (20 : 70 : 10) (Figura 3) e clorofórmio / metanol 90 : 10 (Figura 4). Na técnica de CCD pôde-se constatar a presença de várias bandas (manchas cromatográficas) sendo todos visíveis sob lâmpada UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm (Figuras 3 e 4). É possível observar que a fração F6a.7 (fração com maior atividade inibitória obtida na primeira CF) apresenta uma quantidade menor de bandas, já a fração F6a.6 apresenta uma maior quantidade de bandas apolares e F6a.8 maior intensidade de bandas polares, portanto a fração F6a.7 possui maior grau de pureza comparada às outras duas, e por isso, provavelmente justifica sua atividade mais intensa

A análise pelo método de bioautografia das frações ativas (F6a.4, F6a.6, F6a.7, F6a.8) na concentração de 500 µg demonstrou-se sensível para determinar frações com potencial antibiótico, sendo possível através do cálculo de R_f relacionar a banda do perfil cromatográfico com a atividade antibiótica, e dessa forma direcionar melhor os próximos métodos de purificação a fim de isolá-la. A fração F6a.4 apresentou três pequenas zonas de inibição com valores de R_f de 0,15, 0,56 e 0,64 e as frações F6a.6, F6a.7, F6a.8 também apresentaram uma zona de inibição com valor de R_f de 0,64, que possivelmente represente o composto ativo presente na F4a, mais apolar, que apresenta atividade inibitória para o *Lactobacillus* sp., porém também interfere no crescimento da levedura, conforme verificado pelos testes de disco difusão. Além disso, as frações F6a.6, F6a.7, F6a.8 apresentaram

intensas zonas de inibição distintas com valores de R_f s de 0,125, 0,22 e 0,325, eluidas com o sistema 90 : 10 (clorofórmio : metanol). Portanto estas 3 frações apresentam atividade possivelmente referente aos mesmos compostos, pois a banda ativa possui mesmo R_f , a diferença nos valores de halo de inibição obtidas no método de difusão em ágar provavelmente seja relacionado à proporção de outros compostos presentes na fração, pois através do perfil cromatográfico é possível verificar que a fração F6a.7 possui menos bandas quando comparados às frações F6a.6 e F6a.8 (Figura 4) .

A segunda CF resultou em 90 frações e após análise e comparação do perfil cromatográfico foram reunidas em 8 frações (F6a.7.1 à F6a.7.8), que foram testadas quanto a atividade antibiótica pelos métodos de difusão em ágar e para as frações com maior atividade antibiótica foi determinada a concentração inibitória mínima.

Os testes de difusão em ágar das frações da segunda CF demonstraram atividade antibiótica para sete das oito frações obtidas (F6a.7.2, F6a.7.3, F6a.7.4, F6a.7.5, F6a.7.6, F6a.7.7 e F6a.7.8), com halos de 9; 9; 23; 13; 11; 10 e 9 mm de diâmetro, respectivamente, sendo que a fração F6a.7.7 também apresentou um halo parcial (halo com crescimento reduzido, ao redor do halo de inibição) de 14 mm de diâmetro (Tabela 4) e (Figura 5). Estes resultados indicam que o processo de purificação pode não ter sido eficiente, pois o(s) composto(s) com atividade antibiótica parece estar dispersos pelas frações, considerando que a maioria das frações apresentou halo de inibição, apesar dos perfis cromatográficos destas frações serem distintos (Figura 6). O resultado pode se justificar pelo uso da fase estacionária (sílica gel, fase polar) ser pouco adequada as características da amostra já que a mesma apresenta caráter polar (alta afinidade a metanol e água).

Dessa forma a amostra demonstrou alta adsorção à fase estacionária, sendo necessário a utilização de solventes com alta polaridade como acetonitrila e metanol, capazes de promover a dessorção da amostra, deslocando-a, resultando, porém, numa baixa separação dos compostos nela presente. Segundo Vichenewski (2006) uma das características ideais de uma fase móvel para uma separação eficiente é que ela seja fracamente adsorvida pela fase estacionária, demonstrando que a fase móvel e estacionária utilizadas não foram adequadas.

O perfil cromatográfico das frações obtidas na segunda CF permitiu observar a diferença entre as frações, através da quantidade de manchas cromatográficas. O sistema eluete que apresentou melhor resolução para a maioria das frações foi a mistura dos solventes clorofórmio / metanol (90 : 10), sendo possível constatar a presença de várias bandas, todas visíveis sob lâmpada UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm (Figura 6).

As frações com maior atividade antibiótica obtidas na segunda CF (F6a.7.4; F6a.7.5 e F6a.7.6) apresentaram resultados decrescentes quanto aos halos de inibição (23; 13 e 10 mm de diâmetro), enquanto o perfil cromatográfico (Figura 6) demonstrou grau de purificação crescente, observado pela diminuição de manchas cromatográficas. Houve uma concentração na região de R_f s característico da substância ativa (R_f verificado pelo teste de bioautografia da fração F6a.7 :0,125, 0,22 e 0,325). Estes resultados sugerem um possível sinergismo, o qual consiste em compostos que potencializam uma determinada ação quando estão em conjunto, um evento comum na medicina natural como extratos de plantas e pode ser causa das dificuldades de isolamento de tais compostos (Duke, Godwin, 1998). Dessa forma este efeito pode estar presente em produtos do metabolismo bacteriano, considerando sua complexidade semelhante ao metabolismo das plantas.

A CIM das frações F6a.7.4; F6a.7.5 e F6a.7.6 resultou que $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para F6a.7.4; F6a.7.5 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a fração F6a.7.6, são as concentrações mínimas necessárias para a inibição de *Lactobacillus* sp. (Figura 7). Ressalta-se a possibilidade de sinergismo já que a fração F6a.7.6, possui maior grau de purificação, em relação às frações F6a.7.4; F6a.7.5 quando comparado aos perfis cromatográficos, entretanto a CIM é maior para F6a.7.6. Além disso, a determinação da CIM permitiu verificar o aumento do grau de pureza após os métodos cromatográficos, devido à diminuição do valor de CIM para as frações ativas obtidas por CF em relação ao resultado quando utilizado a fração F4, da cepa LV pelo método de Oliveira, et al. (2011), a CIM a partir de F4 foi de $1562 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Lactobacillus* sp.

Sendo assim, as frações obtidas após a realização dos métodos cromatográficos apresentaram uma elevação no grau de purificação e consequentemente resultando no aumento da atividade inibitória após os métodos cromatográficos, indicando que os compostos do produto de metabolismo de *P. aeruginosa* (cepa LV) tem um potencial no controle do contaminante *Lactobacillus* sp. para a indústria sucroalcooleira. Porém, a sequência de purificação empregada não foi suficiente para o isolamento da composto(s) com a atividade antibiótica. Mais estudos devem ser realizados a fim de determinar essa atividade durante o processo fermentativo, assim como, continuar as etapas de purificação para isolar e identificar a substância(s) responsável por esta atividade, além de investigar a possibilidade de sinergismo.

4 AGRADecIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitaram a realização deste estudo concedendo bolsas de estudos para PIBIC, MSc. E Phd.

1 5 REFERÊNCIAS

2

3 Amorim, HV; Leão, RM (2005). **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.**

4 Piracicaba: Editora Pancrom

5

6 Andrietta, MGS et al. (2007). Bioethanol – 30 years of Proalcool. **International**

7 **Sugar Journal 109**: 195-200.

8

9 Bérdy, J (2005). Bioactive microbial metabolites. **Jornal of Antibiotics**. 58, 1–26.

10

11 Duke, JA, Bogenschutz-Godwin, MJ. (1998). The Synergy Principle at Work in:

12 **Plants, Pathogens, Insects, Herbivores, and Humans**, p. 183-205.

13

14 Garoma, Bem-Kaled, Beyene, (2011). Comparative resource analyses for ethanol

15 produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal**

16 **of Energy Research**. 36: 1065–1076, 2011.

17

18 Kohlhepp, G. (2010). Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no

19 Brasil. **Estudos avançados**, 24 (68).

20

21 Leite, RCC; Leal, MRLV. (2007). O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos 79**:

22 15-21.

23

24 Lima, UA. (2001). **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos.

25 São Paulo:

- 1 Editora: Edgard Blucher, 1ª edição. . cap. 1, p. 1-40, v.3.
2
- 3 Nobre, TP; Horii, J; Alcarde, AR (2007). Viabilidade celular de *Saccharomyces*
4 *cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação
5 alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos 27(1): 20-25**
6
- 7 Oliva-Neto P, Yokoya, F. (1997). Effects of nutritional factors on growth of
8 *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic
9 fermentation. **Revista de Microbiologia 28: 25-31.**
10
- 11 Oliva-Neto, P; Yokoya, F. (2001). Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and
12 lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds.
13 **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.1, p.10-14, São Paulo.
14
- 15 Oliveira, JS. (2005) Caracterização, Extração e Purificação por Cromatografia de
16 Compostos de Urucum (*Bixa orellana L.*). **Tese de doutorado**. Universidade Federal
17 de Santa Catarina.
18
- 19 Oliveira, AG, Murate, LS, Spago, FR, Lopes, LP, Beranger, JPO., San Martin, JAB.,
20 Nogueira, MA, Mello, JCP, Andrade, CGTJ., Andrade, G (2011).Evaluation of the
21 antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain
22 against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain, **Biological Control**. 56, 125–131;
23 2011.
24

- 1 Patent, (2008). Process of production, purification and obtation of substances with
2 antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants September 10th.
3
- 4 Solomon, S. (2000). Post-Harvest Cane Deterioration and its Millin Consequences.
5 **Sugar technology**, 2 (1&2) : 1 – 18.
6
- 7 Skinner, KA, Leathers, TD. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production.
8 **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 31: 401–408.
9
- 10 Vichenewski, W (2006). Cromatografia por adsorção. In: Collins CH, Braga GL,
11 Bonato OS. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Campinas-SP.

6 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da FD por cromatografia líquida a vácuo, pelo método de Oliveira (2011) na concentração de 1000 µg.

Amostra	Halo de inibição (mm)	Inibição para <i>Cerevisiae</i>	S. Rendimento
FD	11	+	-
F1	-	-	
F2	-	-	
F3	22	+	
F4	13	-	
F5	-	-	
F6	-	-	
F4A	-	-	3,4%
F4B	-	-	5,0%
F4C	-	-	2,9%
F4D	31	+	4,6%
F4E	8	+	17,7%
F4F	11	-	17,5%
F4G	10	-	10,4%
F4H	-	-	7,2%
F4I	-	-	21,2%
CNg	-	-	-

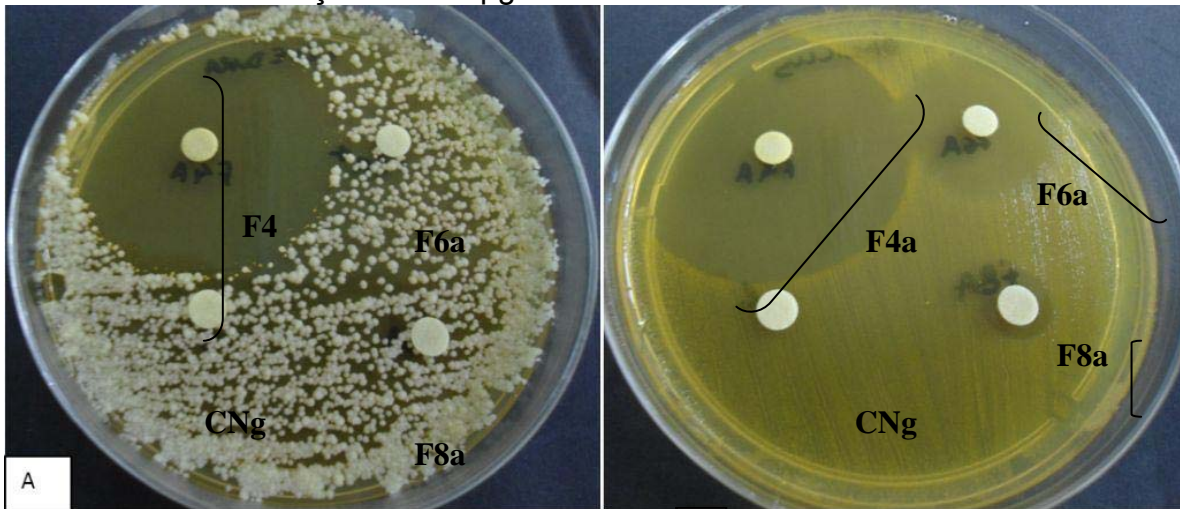
Diâmetros de halo de inibição em mm para *Lactobacillus* sp. Inibição para *S. Cerevisiae*: (-) Ausência de halo de inibição; (+) Presença de halo de inibição. FD: Fase Diclorometano; F1 a F6 (Frações obtidas a partir de FD na primeira CLV); F4A a F4I (Frações obtidas a partir de F4 na segunda CLV); CNg: controle negativo, solventes utilizados para solubilizar as frações.

Tabela 2 – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da FD por cromatografia líquida a vácuo, pelo método modificado na concentração de 1000 µg.

Amostra	Halo de inibição (mm)	Inibição <i>S. Cerevisiae</i> para <i>Lactobacillus</i> sp.
FD	11	+
F1a	-	-
F1b	-	-
F2a	-	-
F2b	-	-
F3a	-	-
F3b	-	-
F4a	40	+
F4b	-	-
F5a	-	-
F5b	-	-
F6a	22	-
F6b	-	-
F7a	-	-
F7b	-	-
F8a	12	-
F8b	-	-
F9a	-	-
F9b	-	-
CNg	-	-

Diâmetros de halo de inibição em mm para *Lactobacillus* sp. Inibição para *S. Cerevisiae*: (-) Ausência de halo de inibição; (+) Presença de halo de inibição. FD: Fase Diclorometano; F1a a F9b (Frações obtidas a partir de FD em uma única CLV); CNg: controle negativo, solventes utilizados para solubilizar as frações.

Figura 1 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações ativas F4a, F6a e F8a na concentração de 500 µg.



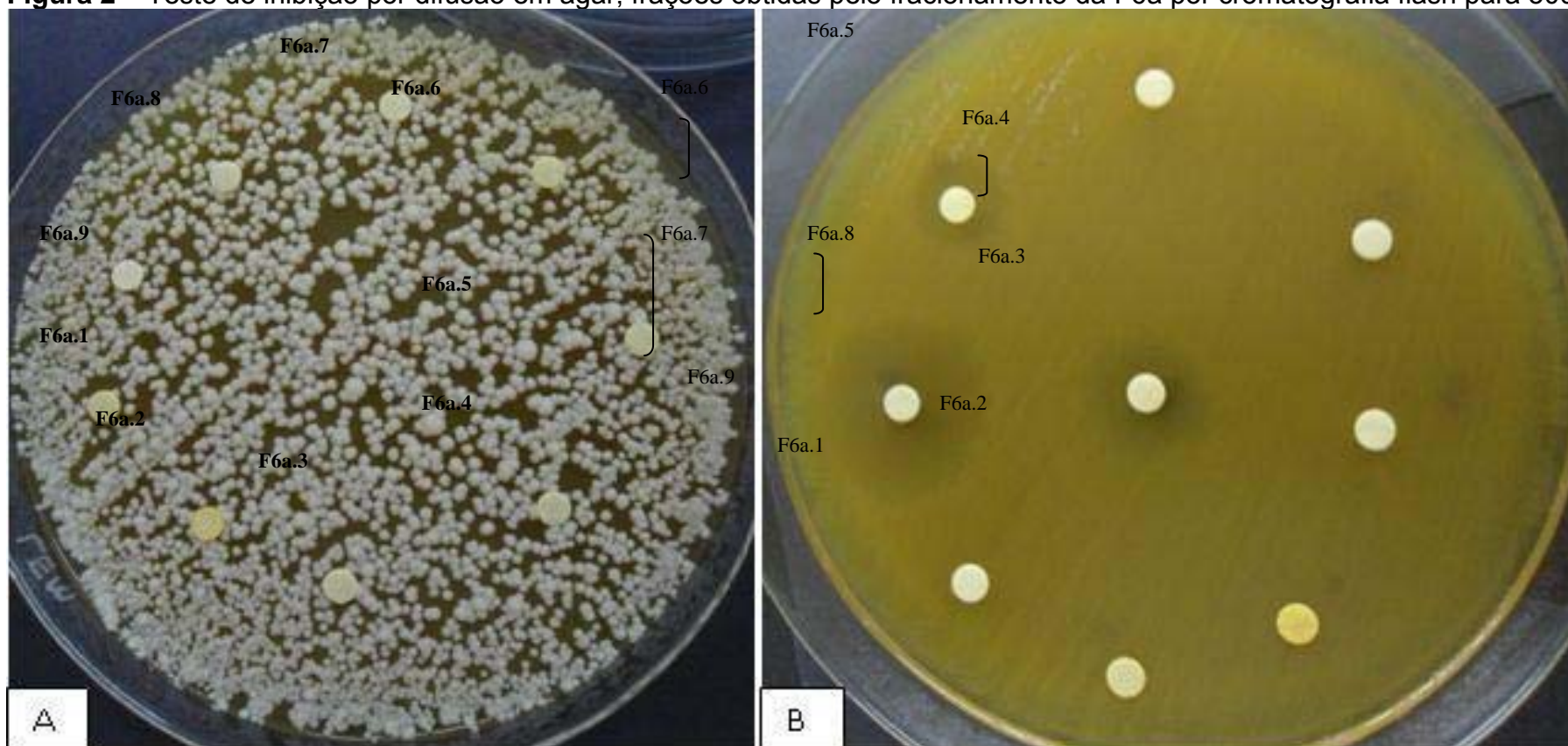
(A) halo de inibição de *S. cerevisiae* e (B) halo inibição de *Lactobacillus* sp. CNg: solventes diclorometano e metanol.

Tabela 3 – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da F6a por cromatografia flash.

Amostra	Halo de inibição (mm) para <i>Lactobacillus</i> sp. 250 µg	Halo de inibição (mm) para <i>Lactobacillus</i> sp. 500 µg	de Inibição <i>S. Cerevisiae</i>
F6a.1	-	-	-
F6a.2	-	-	-
F6a.3	-	-	-
F6a.4	-	8,5	-
F6a.5	-	-	-
F6a.6	18,5	21	-
F6a.7	26,5	27	-
F6a.8	13	17	-
F6a.9	-	-	-
CNg	-	-	-

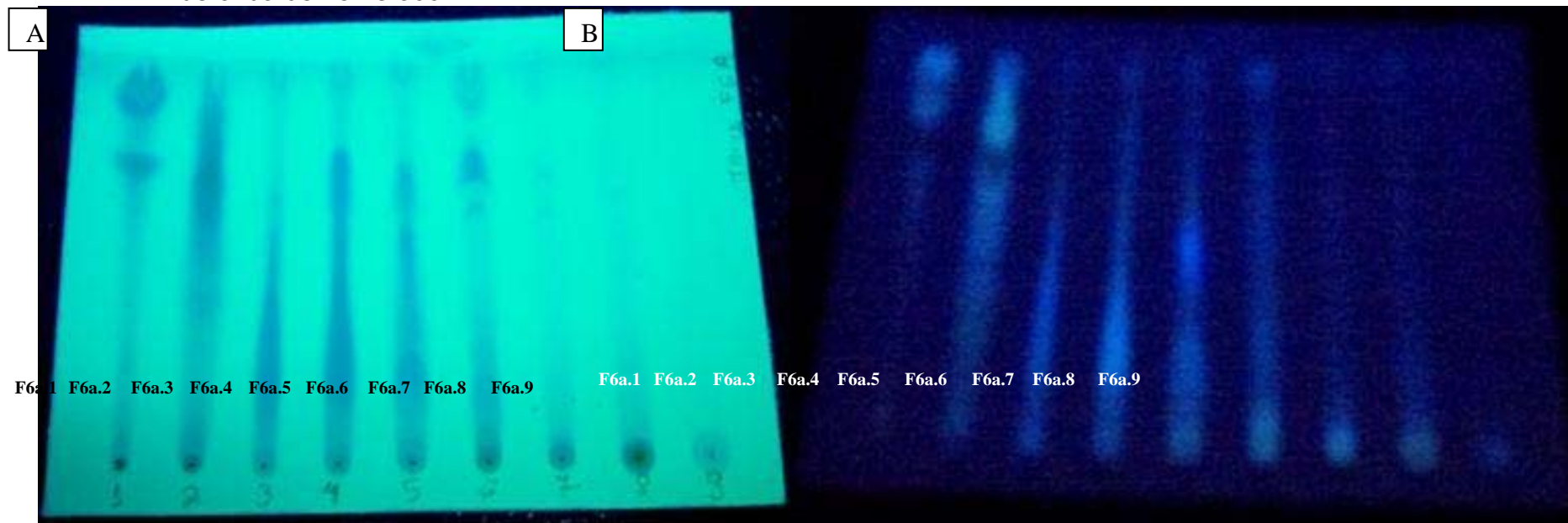
Diâmetros de halo de inibição em mm para *Lactobacillus* sp. Frações obtidas a partir de F6a na primeira CF (F6a.1 à F6a.9), na quantidade de 250 e 500 µg. Inibição para *S. Cerevisiae*: (-) Ausência de halo de inibição. F6a foi utilizado como controle positivo e como controle negativo (CNg) metanol.

Figura 2 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações obtidas pelo fracionamento da F6a por cromatografia flash para 500 µg.



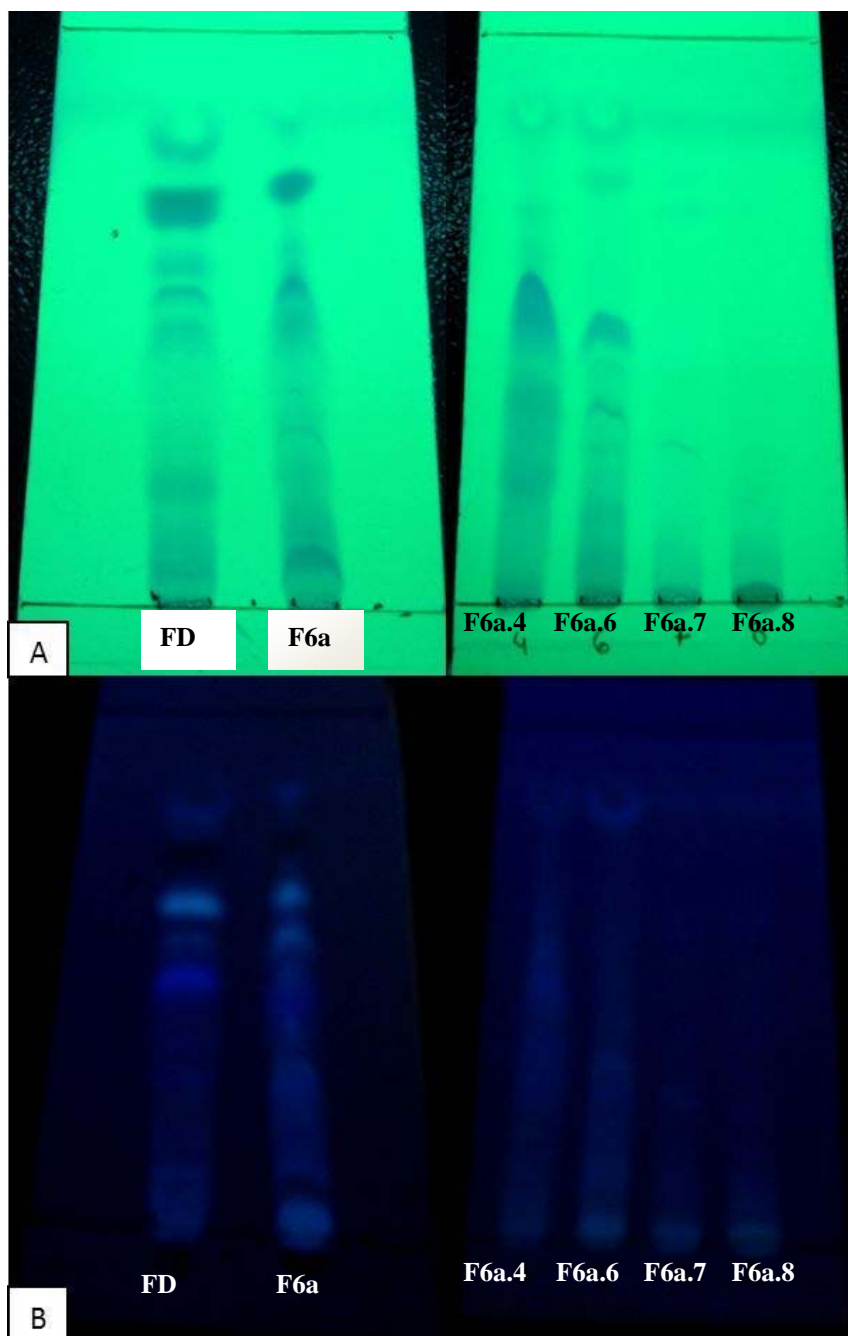
(A) Ausência de halo de inibição para *S. cerevisiae* e (B) halo de inibição para *Lactobacillus* sp. em F6a.4 (8,5 mm), F6a.6 (21 mm), F6a.7 (27 mm) e F6a.8 (17 mm).

Figura 3 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas na primeira CF revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.



(A) comprimento de onda de 254 nm, (B) comprimento de onda de 366 nm.

Figura 4 – Cromatografia em camada delgada das frações FD e F6a. comparado com perfil das frações ativas obtidas em CF (F6a.4, F6a.6, F6a.7 e F6a.8) revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.



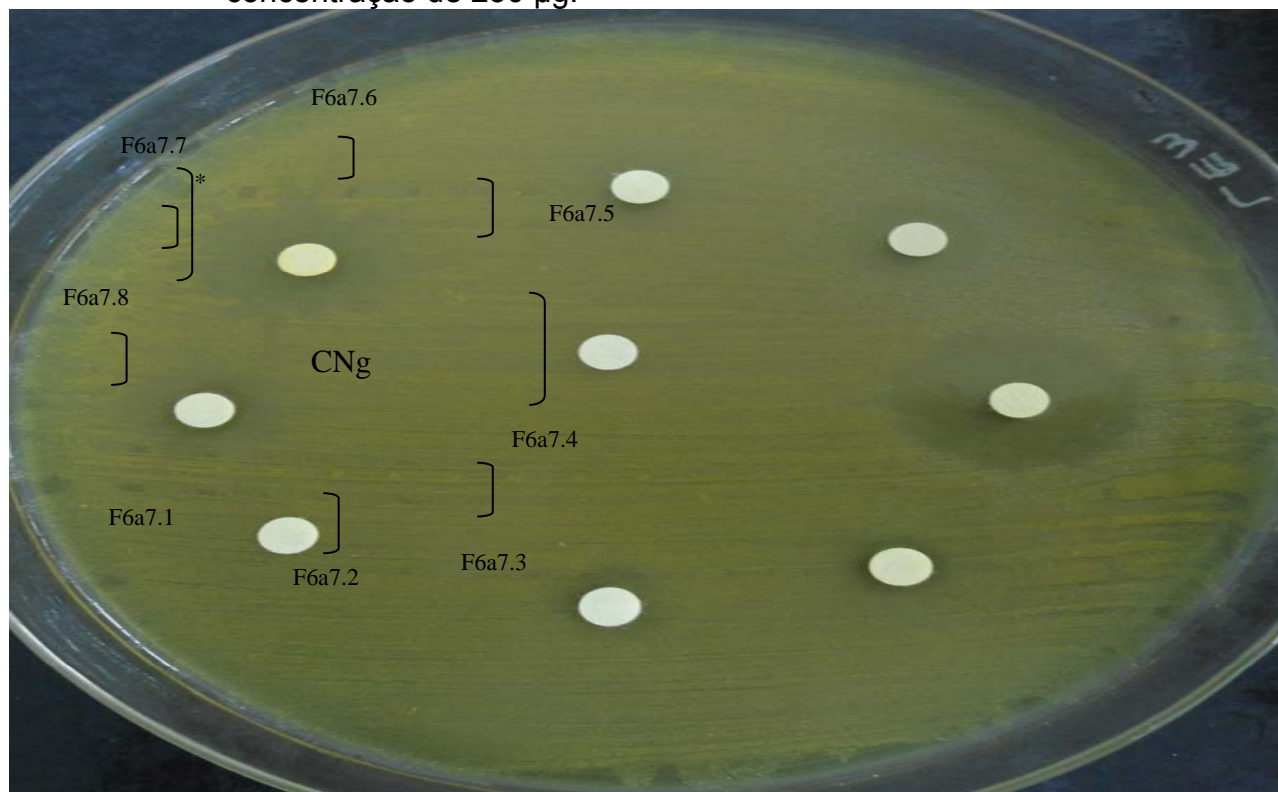
(A) comprimento de onda de 254 nm, (B) comprimento de onda de 366 nm

Tabela 4 – Atividade inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da F6A.7 por cromatografia flash na concentração de 250 µg.

Amostra	Halo de inibição (mm) para <i>Lactobacillus</i> sp. 250 µg	Inibição <i>S. Cerevisiae</i>
F6A.7.1	-	-
F6A.7.2	9	-
F6A.7.3	9	-
F6A.7.4	23	-
F6A.7.5	13	-
F6A.7.6	11	-
F6A.7.7	10/14*	-
F6A.7.8	9	-
CNg	-	-

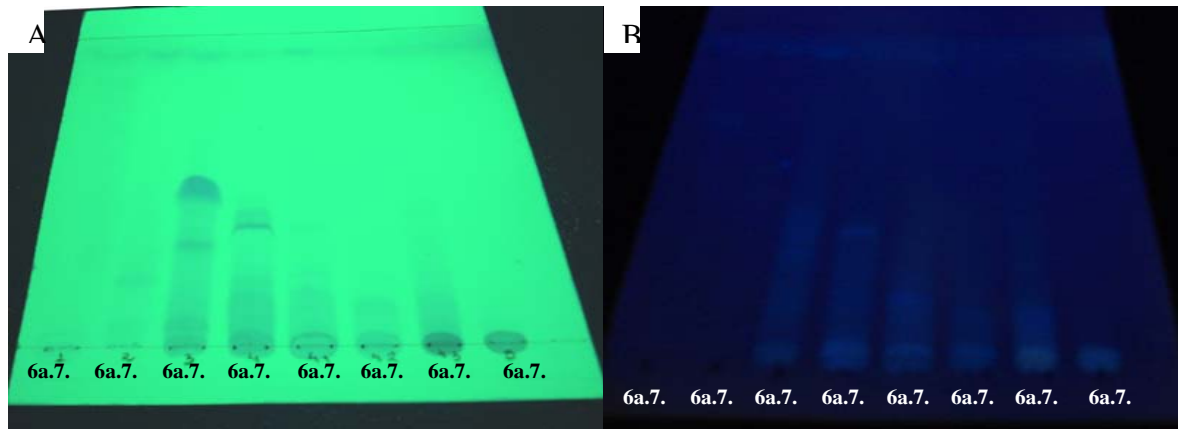
Diâmetros de halo de inibição em mm para *Lactobacillus* sp. Frações obtidas a partir de F6a.7 na segunda CF (F6a.7.1, F6a.7.2, F6a.7.3, F6a.7.4, F6a.7.5, F6a.7.6, F6a.7.7, F6a.7.8), na quantidade de 250 µg. Inibição para *S. cerevisiae*: (-) Ausência de halo de inibição; (+) Presença de halo de inibição. Como controle negativo (CNg) metanol. * Presença de halo parcial, com crescimento reduzido de 14 mm, além do halo de inibição total de 10 mm.

Figura 5 – Teste de inibição por difusão em ágar, frações obtidas pelo fracionamento da F6a.7 por cromatografia flash na concentração de 250 µg.



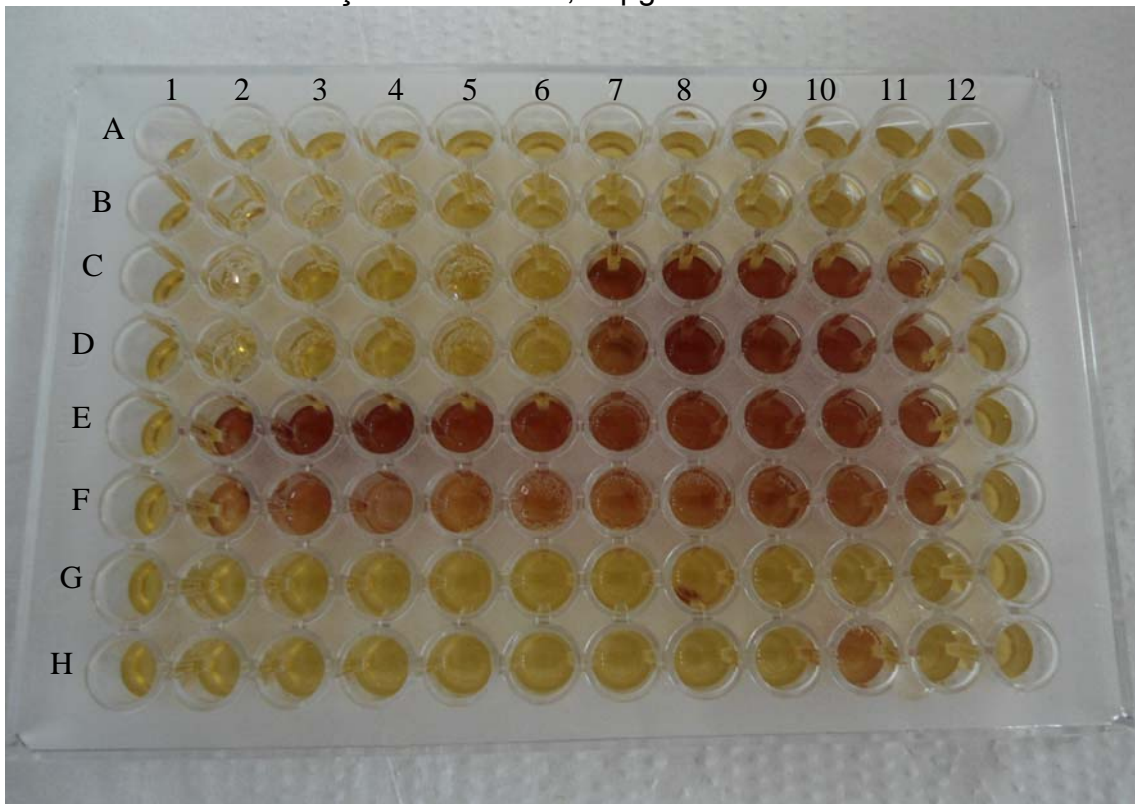
Halo de inibição para *Lactobacillus* sp. frente as frações obtidas na segunda CF (F6a.7.2 à F6a.7.8). CNg: controle negativo com metanol. * Presença de halo parcial, crescimento reduzido ao redor do halo de inibição.

Figura 6 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas na segunda CF revelada sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm.



(A) comprimento de onda de 254 nm, (B) comprimento de onda de 366 nm

Figura 7 – Determinação da concentração inibitória mínima da fração F6a.7.4 obtidas pelo fracionamento da F6a.7 por cromatografia flash nas concentrações de 500 a 0,98 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.



Linha (B) da coluna 2 a 11: controle de esterilidade das diluições da fração F6a.7.4. Linhas (C) e (D) da coluna 2 a 11: tratamento nas concentrações de 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente. Linhas (E) e (F): controle positivo, *Lactobacillus* sp. Demais poços: controle negativo: Caldo MCC. Concentração inibitória mínima de 31,25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.