

# TESTE DE SENSIBILIDADE IN VITRO AOS ANTIBIÓTICOS DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DE UMA USINA SUCROALCOOLEIRA NO INTERIOR DO PARANÁ

Murilo Brandão Lopes\*  
Thaís Medeiros Boldrin Silva\*\*

**RESUMO:** Durante o processo fermentativo das usinas sucroalcooleiras é comum que ocorra o desenvolvimento de diferentes tipos de microrganismos. Isso ocorre devido às etapas de processamento das matérias primas. Assim, o controle microbiológico se faz necessário. O Teste de Sensibilidade *in vitro* é importante para o processo fermentativo nas usinas sucroalcooleiras, pois é através da realização desta análise que ocorre a avaliação de qual antibiótico terá melhor ação bacteriana. Por meio da realização deste teste foi possível classificar os antibióticos através do seu efeito de ação, ficando classificado como: eficiente, menos eficiente, pouco eficiente e não eficiente. Após a realização do teste, foi possível concluir que os antibióticos que possuem a monensina como princípio ativo não se apresentaram tão eficazes conforme o esperado, já o antibiótico que possui princípio ativo extrato de lúpulo, que é um antimicrobiano natural, pode ser considerado eficaz, porém se degrada mais rápido, não mantendo resíduos na fermentação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Levedura; Teste de Sensibilidade *in vitro*; Antibiótico.

---

\* Graduado em Ciências Biológicas na Faculdade de Apucarana – FAP. E-mail: brandao82@hotmail.com

\*\* Discente da Especialização em Gestão Ambiental na Faculdade Metropolitana de Maringá – UNIFAMMA. E-mail: thaiboldrin@hotmail.com

## IN VITRO SENSITIVITY TEST IN ANTIBIOTICS FROM THE FERMENTATION PROCESS IN A SUGAR-ALCOHOL PLANT IN THE STATE OF PARANÁ, BRAZIL

**ABSTRACT:** Since the development of different types of microorganisms is common during the fermentation process in sugar-alcohol plants, due to the processing states of prime matter, microbiological control is mandatory. *In vitro* sensitivity test is highly important for the fermentation process at sugar-alcohol plants since the type of antibiotic with the best antibacterial activity is evaluated. The test classifies antibiotics through their effects, namely, efficient, less efficient, slightly efficient and inefficient. Results show that whereas antibiotics with monensin as active ingredient were not efficacious as expected, antibiotics with the natural antimicrobial lupulus extract are effective, albeit with a fast degradation rate and without any waste in the fermentation process.

**KEYWORDS:** Yeast; *In vitro* Sensitivity Test; Antibiotics.

### INTRODUÇÃO

A descoberta de microrganismos que podiam modificar um determinado substrato possivelmente foi feito ao acaso, como, ao perceber que a carne seca resistia à deteriorização, ou que, ao deixar o leite azedar, era possível retirar o líquido do coalho para fabricar queijo ou, ainda, que, ao secar os grãos antes da estocagem, era possível evitar o aparecimento de fungos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006).

No processo fermentativo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a utilizada para realizar a fermentação. Isto ocorre, principalmente, pela capacidade desta levedura de produzir e tolerar altas concentrações de etanol (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica é o processo de oxidação anaeróbica parcial da

glicose. Inicialmente, pela via glicolítica a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato por meio de dez reações catalisadas por diferentes enzimas. As duas moléculas de piruvato, sob condições anaeróbicas, são descarboxiladas pela ação da enzima piruvato descarboxilase, formando duas moléculas de acetaldeído e duas de gás carbônico. As moléculas de acetaldeído são reduzidas a duas moléculas de etanol pelo álcool desidrogenase (CARDOSO, 2006).

O desenvolvimento de infecção na fermentação pode gerar dano como: consumo de açúcar; formação de goma, que gera maior viscosidade ao caldo, pode causar o entupimento de tubulações, centrífuga, peneiras e trocador de calor; causa a perda de células de levedura pelo fundo das dornas, diminuição da viabilidade celular das leveduras devido às toxinas dos ácidos orgânicos excretados no meio, e também a redução na produtividade da fermentação (ALTERTHUM et al., 1984; AMORIN; OLIVEIRA, 1982; AMORIN; OLIVEIRA; CAMPOS, 1981; EGUCHI et al., 1989; YOKOYA, 1991).

Para Ball e Atkinson (1975), a perda da viabilidade das células de levedura, em condições aeróbias, está relacionada com o consumo de reservas por células.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de acumular dois carboidratos de reserva, que são a trealose e o glicogênio, quando em condições especiais estes polissacarídeos exercem importante função na manutenção, diferenciação e sobrevivência das leveduras (PANEK; WOOLLEY, 1990).

No entanto, a contaminação bacteriana é certamente um dos fatores preponderantes dentre aqueles que podem afetar a fermentação alcoólica, pois está sempre presente em processos industriais de produção de etanol por via fermentativa (NOBRE; HORII; ALCARDE, 2005).

Segundo Barbosa e Torres (1998), o crescimento da população de microrganismos inicia-se a partir da inoculação de um determinado número de indivíduos em um volume fixo de um dado meio.

Os mesmos autores dizem que o crescimento populacional, neste sistema, processa-se com uma cinética que pode ser dividida em quatro fases, a fase lag, a fase exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio.

A fase lag é um período de intensa atividade celular, caracterizada pelo aumento

de massa celular, esta fase consiste, portanto, em uma etapa de crescimento individual. A velocidade de crescimento aumenta quando a concentração desta proteína é modulada de acordo com a flutuação do suprimento de nutrientes (BARBOSA; TORRES, 1998).

Na fase exponencial o crescimento ocorre tanto no número de indivíduos quanto a massa da cultura dobrando, assim, a cada geração. Esta fase está ligada diretamente com a divisão celular, ou seja, a replicação do cromossomo bacteriano (BARBOSA; TORRES, 1998).

Dá-se o início desta fase a partir do final da fase de crescimento exponencial, quando o meio de cultura passa a apresentar condições inadequada para o crescimento populacional.

Com o consumo dos nutrientes do meio de cultura pela células, ocorre a escassez deste meio. Com isso as células começam a ficar desnutridas e o meio do inóculo, devido ao intenso metabolismo, encontra-se com acúmulo de produtos tóxicos, principalmente ácidos orgânicos. A partir deste momento inicia-se a degradação da parede celular e das reservas das células (BARBOSA; TORRES, 1998).

A fase de declínio vem após a fase estacionária. Como a fase estacionária varia de uma espécie para outra de bactéria, a sua viabilidade pode durar mais tempo em algumas espécies.

O número de indivíduos da população começa a diminuir devido à morte celular. A morte ocorre devido à impossibilidade de produzir energia suficiente para a sustentação dos processos vitais e pela grande produção de enzimas autolíticas que desempenham funções importantes como a quebra de ligações peptidoglicanas na parede celular, e estão sempre presentes nas células vivas (BARBOSA; TORRES, 1998).

Para o controle da infecção bacteriana e de suas consequências no processo de obtenção de etanol visando a uma fermentação sadia, rápida e eficiente, é fundamental a busca de soluções práticas e viáveis para atenuar ou eliminar a floculação do fermento nas destilarias, reduzindo assim o custo de produção do etanol (LUDWIG; OLIVA-NETO, 2001).

A utilização de agentes antimicrobianos reduz os danos causados pelos contaminantes, além de medidas como limpeza das moendas, tubulações, instalações da fermentação e vários outros procedimentos, tais como descarte de fundo de dorna, returbinação do fermento e tratamento ácido. Porém, o eficiente controle só é conseguido com o uso de antimicrobianos adequados e na dosagem correta, pois a aplicação racional desses produtos deve visar apenas à população de bactérias e não à de leveduras (ANTONINI, 2004).

O Brasil foi o primeiro país no mundo a desenvolver um programa de combustível alternativo para substituição da gasolina e é o maior produtor de aguardente (NOBRE; HORII; ALCARDE, 2005). Nos anos 70 o governo brasileiro criou o programa Proálcool (Programa Nacional do Álcool). Eles não tinham a dimensão do impacto deste programa no século XXI (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

O teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) tem como função indicar qual o antibiótico mais eficaz para o controle da infecção na fermentação. Ele mede a resistência de uma bactéria ou agentes antimicrobianos e contribui também de maneira econômica, pelo fato de indicar, através do teste de sensibilidade, o antibiótico que apresentou melhores resultados. Com isso não ocorrerão gastos desnecessários com antibióticos que não apresentaram resultados tão eficazes (RISTOW, 2009).

Os antibióticos são substâncias elaboradas por fungos, bactérias entre outros seres vivos e sintéticos e têm como atividade eliminar os microrganismos contaminantes (USITEC, 2008).

O uso indevido e incorreto de antibióticos pode trazer consequências agravantes na fermentação; as bactérias têm a capacidade para criar resistências aos antibióticos através de vários mecanismos (PELCZAR JR.; CHAN; KRIGG, 1997).

Segundo Pelczar Jr., Chan e Krigg (1997), os mecanismos podem ser os seguintes: 1 - a bactéria pode ser capaz de produzir enzimas que destroem ou modificam a estrutura do antibiótico; 2 - os antibióticos podem ser incapazes de penetrar na superfície bacteriana; 3 - a bactéria pode possuir uma via bioquímica

alternativa que desvia a reação particular que é inibida pelo antibiótico; 4 – a bactéria pode possuir tipos de enzimas, ribossomos ou outros componentes celulares que não são afetados pelo antibiótico.

Este trabalho teve o objetivo principal de mostrar a importância da realização do Teste de sensibilidade *in vitro* ou teste de antibiograma, nas indústrias do setor sucroalcooleiro e de avaliar os resultados obtidos através do teste de sensibilidade *in vitro*.

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

Para a realização deste trabalho foi utilizada a metodologia do Teste de Sensibilidade *in vitro*, fornecida pela fermentecção às usinas.

Foram coletadas cinco amostras no processo fermentativo de levedo. As coletas das amostras ocorreram a cada cinco dias. Não foram levados em consideração os fatores que influenciam o processo industrial e o isolamento e a identificação das bactérias do meio. Todas as análises do teste foram realizadas em triplicata, sendo apresentado no trabalho apenas a média simples da média de absorbância.

### **2.1 PREPARO DO MEIO DE CULTIVO (MAYEUX; COLMER, 1961)**

#### **2.1.1 Preparo do meio de cultivo**

Composição para 1000 ml: extrato de levedura 20,0 g, proteose – peptona 5,0 g, dextrose 10,0 g, fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2,0 g, água destilada 1000,0 ml. Em um béquer de dois litros foram adicionados todos os componentes e aquecido no aparelho de microondas, mexendo várias vezes para o que meio se dissolva de maneira mais eficaz. Foram pipetados 15,0 ml de meio de cultura para os tubos de ensaio com tampa de rosca. Em seguida os tubos foram colocados na autoclave por 20 minutos a 121°C. Logo após foram armazenados na geladeira.

### **2.1.2 Preparo da Solução de Actidiona**

Para obter 100 ml de solução, foram pesados 0,1g de actidiona. Flambada a boca do frasco de vidro e dissolvida a actidiona em 100 ml de água destilada esterilizada. Logo após foi armazenada na geladeira.

### **2.1.3 Antibióticos**

Para obter os antibióticos testados, foram pesados 0,01g da amostra de antibióticos, solubilizados em algumas gotas de álcool. Em seguida foi flambada a boca do tubo de vidro e adicionada o antibiótico em 100 ml de água destilada esterilizada. Logo após foram armazenados na geladeira.

### **2.1.4 Preparo dos tubos de ensaio para inoculação**

Foram preparados três tipos de tubos: o branco, a testemunho e o tratamento. O tubo branco continha 15 ml de meio de cultivo líquido esterilizado, o tubo testemunho possui 15 ml de meio de cultivo líquido esterilizado mais 0,15 ml de da solução de actidiona e foram homogeneizados através do agitador de tubos. Já os tubos de tratamento continham 15 ml de meio de cultivo líquido esterilizado mais 0,15 ml de actidiona, e foram adicionados mais 0,30 ml da solução de antibiótico e homogeneizados. O inóculo é preparado a partir de uma amostra de levedo coletado das dornas de fermentação, transferindo 5,0 ml deste para o tubo de ensaio e homogeneizado no agitador de tubos. Da amostra de levedo foram transferidos 0,15 ml para os tubos de tratamento e testemunho, os tubos foram agitados novamente.

Através do espectrofotômetro B582 da Micronal, com o comprimento de onda para 520nm e calibrado com a amostra do tubo branco, foi realizada a leitura da hora inicial do teste e os tubos com inóculo encaminhados para a estufa de crescimento por 24 horas, quando ocorreu segunda e última leitura seguindo o mesmo procedimento.

### **3 RESULTADO E DISCUSSÃO**

Os antibióticos que foram utilizados para realização do teste de sensibilidade estão nomeados conforme o seu princípio ativo e são os seguintes: penicilina, virginiamicina 100 %, monoensina, penicilina + tetraciclina, cloranfenicol + oxitetraciclina, extrato de lúpulo, salinomicina 50%.

Segundo Tilbury (1968), uma das formas de ocorrer a contaminação se dá por ferramentas utilizadas no corte. Alguns estudos evidenciaram a relação entre a contaminação microbiana com o tipo de corte sendo estes, manual ou mecânico da cana-de-açúcar (EGAN, 1965).

O tempo de armazenamento da cana-de-açúcar após a queima é um outro fator importante na contaminação da mesma (STROPPIA, 1998). O mesmo afirma que o processo de lavagem da cana-de-açúcar, dependendo da qualidade microbiológica da água empregada, pode representar um foco de contaminação na matéria-prima.

Amorin e Oliveira (1982) citam como principais contaminantes da fermentação alcoólica *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

**Tabela 1** Valores da absorvância (média) das amostras coletadas da dorna 2.

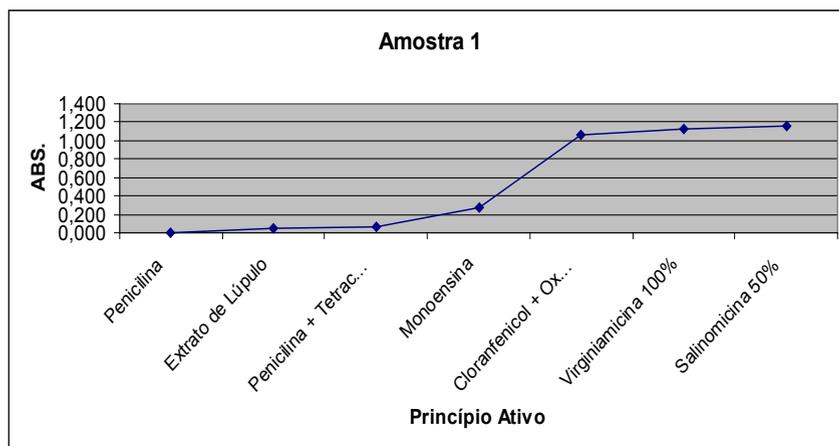
		MÉDIA DA ABSORBÂNCIA				
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Princípio Ativo	Branco	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Testemunho	1,385	0,646	0,339	0,477	1,690
	Monoensina	0,270	-0,111	-0,008	0,370	0,742
	Penicilina + Tetraciclina	0,057	-0,449	-0,035	0,428	1,935
	Cloranfenicol + Oxitetraciclina	1,063	0,950	0,401	0,110	1,075
	Penicilina	0,001	-0,677	0,383	0,147	1,668
	Virginiamicina 100%	1,129	0,162	-0,009	0,087	1,249
	Salinomicina 50%	1,193	0,026	-0,089	0,514	1,851
	Extrato de Lúpulo	0,044	0,269	0,391	0,315	1,634

A tabela acima indicam somente os valores da média final da absorvância para melhor visualização e interpretação dos resultados obtidos de cada amostra.

Os resultados obtidos foram classificados em ordem de mais eficiente, melhor atividade antimicrobiana, para o que se apresentaram menor eficiência: penicilina, virginiamicina 100%, monoensima, penicilina + tetraciclina, cloranfenicol + oxitetraciclina, extrato de lúpulo, salinomicina 50%.

Para a melhor avaliação dos resultados separaram-se os cinco mais eficientes princípios ativos de cada amostra, os quais conseguiram eliminar ou diminuir o crescimento dos microrganismos patogênicos presentes nas amostras de levedo, de um total de sete que foram testados por amostra. Considerando este padrão, o princípio ativo penicilina obteve maior eficiência em três amostras, sendo que em duas acabou sendo o mais eficiente, mas não pode ser afirmado que o composto beta-lactâmico é o único princípio ativo que gera a eficácia do produto.

A Figura 1 apresenta os resultados da primeira amostra:



**Figura 1** Representa os resultados da amostra 1, sendo a média da absorvância.

Os três melhores resultados na amostra 1 foram: penicilina (0,001), extrato de lúpulo (0,044), penicilina + tetraciclina (0,057).

Analisando a média final do testemunho que foi de 1.385, o qual não possui nenhum tipo de antimicrobiano e comparando este com o princípio ativo penicilina, que teve a média final de 0,001, esta comparação mostra claramente que a eficiência deste foi excelente; como também comparando este com o salinomícina 50%, que teve a média final de 1,193, pode-se afirmar que este princípio não possui eficiência no que diz respeito à atividade antimicrobiana. Sendo assim, seu resultado entre os sete analisados nesta amostra, este foi classificado como não eficiente.

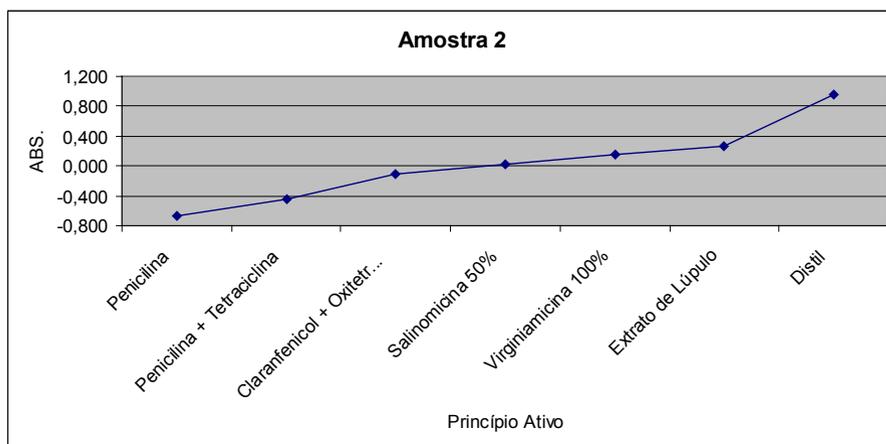
O princípio ativo extrato de lúpulo é recomendado sua utilização de, no mínimo, 5,0 ppm até 10,0 ppm, e nesta pesquisa este foi adicionado em uma concentração de 40% a menos do que a o valor mínimo recomendado pelo fabricante. E utilizando uma concentração menor, este ficou sendo o segundo melhor antibiótico na amostra 1 com relação à boa eficiência, como demonstra a tabela 2, podendo ser considerado o mais eficiente dentre os analisados o extrato de lúpulo, que se torna eficiente contra as bactérias do gênero Gram + e determinados fungos.

O princípio ativo cloranfenicol e oxitetraciclina que, segundo Pelczar Jr., Chan e Kricg (1997), são bacteriostáticos, são considerados pelo fabricante como bactericida, mas, como não contém informações complementares da composição do antibiótico, não se pode afirmar que sua função é bacteriostática, pois pode ser que tenham compostos que fazem que sua eficiência seja bactericida.

As bactérias *Streptococos*, *E. Coli*, *Klebsiella* já se conhece sua bioquímica e morfologia que apresentam uma resistência inferior a 25% ao antimicrobiano cloranfenicol, porém no grupo de tetraciclina têm uma resistência de 75% para a bactéria estreptococos e 25% para as outras bactérias citadas acima, segundo Pelczar Jr., Chan e Kricg, (1997).

Oliva-Neto (1995) afirma que a penicilina foi, dentre os antibióticos testados, um dos produtos que apresentou melhores resultados na inibição de *L. fermentum*. Já Stroppa (1998) relata que o antibiótico kamoran com o princípio ativo monoensina, nas dosagens de 3,0 e 6,0 ppm, apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *L. fermentum*; porém, em suas pesquisas o autor trabalhava com bactérias isoladas e o antibiótico acima citado foi testado somente na linhagem de *L. fermentum*, podendo, assim, apresentar melhores resultados. E como a amostra em questão neste trabalho foi o fermento, ressaltando-se que este composto pode ter vários microrganismos como bactérias, e até mesmo outros tipos de leveduras.

A Figura 2 apresenta resultados finais da média da absorbância da segunda amostra.



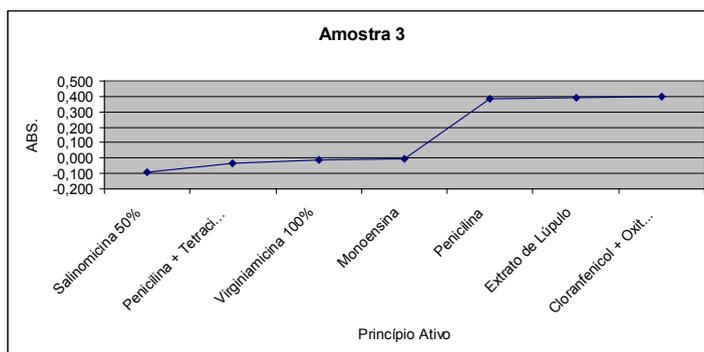
**Figura 2** Representa os resultados da amostra 2, sendo a média da absorvância.

O antimicrobiano penicilina permaneceu em primeiro lugar como mostra o gráfico 2: na hora inicial foi o de maior turbidez no meio tendo uma média de absorvância de 1,073; porém, na hora final a média foi de 0,396, tornando-o de menor valor de absorvância após as 24 de incubação, demonstrando ser o antibiótico mais eficaz dentre todos os outros comparados.

Os gráficos 2 e 3 mostram uma atividade diferente das demais tabelas apresentadas: a eficiência de alguns antimicrobianos de maneira satisfatória pelo motivo de que, além de não permitir crescimento bacteriano nas amostras, eles também apresentaram a capacidade de serem bactericidas.

Todos os antibióticos têm sua função bactericida prescrita pelos fornecedores, mas é somente nas amostras 2 e 3 que se pode verificar esta atividade bem característica. Com isso é importante observar que os antibióticos com resultados de absorvância negativo são classificados como eficientes, pois tiveram uma boa atividade antimicrobiana, como demonstraram os resultados nos gráficos.

A Figura 3 apresenta resultados finais da média da absorvância da terceira amostra.



**Figura 3** Representa os resultados da amostra 3, sendo a média da absorvância.

Na amostra 3 o princípio ativo penicilina, que foi o mais eficiente nas amostras anteriores, nesta, ele se encontra em quinto lugar da classificação geral, tendo uma média de absorvância maior do que o próprio testemunho junto com o extrato de lúpulo e cloranfenicol + oxitetraciclina também obtiveram resultados com valores maiores do que o testemunho, o qual não possui nenhum antimicrobiano.

Nesta amostra verificou-se que três dos antimicrobianos analisados contêm resultado de absorvância maior do que o testemunho. Estes antibióticos poder ser classificados em não eficientes. Para uma análise mais crítica destes resultados, e lembrando que estas análises foram feitas em triplicatas com valores de diferenças pequenas, consideradas aceitáveis, pode-se dizer que estes produtos não tiveram uma função de bactericidas como descrita pelos seus fornecedores, mesmo levando em consideração o seu espectro de ação e mesmo o antimicrobiano extrato de lúpulo, o qual, neste teste, foi utilizado uma concentração de 40% a menos do que o recomendado pelo fabricante. Mesmo que estes antibióticos não tenham a sua função de bactericida ativa por algum motivo, o crescimento de bactérias na amostra, como demonstra os valores de absorvância, não poderiam ser maiores que a do próprio testemunho.

A Figura 4 apresenta resultados finais da média da absorvância da amostra quarta

amostra.

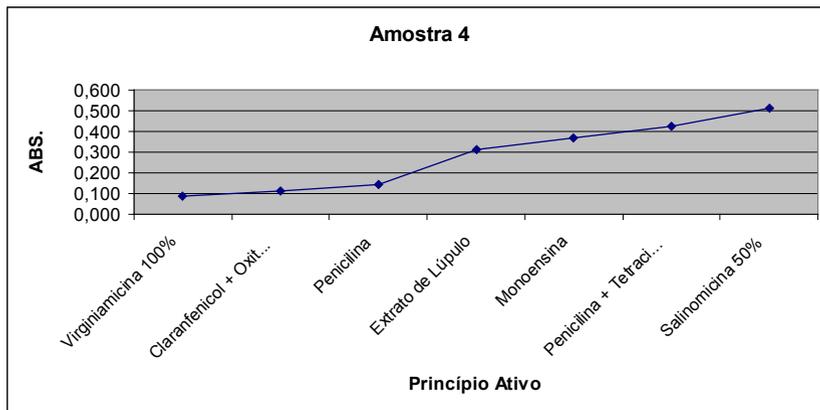


Figura 4 Representa os resultados da amostra 4, sendo a média da absorvância.

O princípio ativo salinomicina 50%, que ficou em primeiro lugar de eficiência como demonstra o gráfico 3, encontra-se neste gráfico em sétimo lugar, sendo classificado como não eficiente, com 7,75% a mais de absorvância do que o testemunho.

Nesta amostra não houve resultados negativos, demonstrando uma atividade antimicrobiana tão eficaz, como teve nas amostras 2 e 3, que todos os resultados de absorvância da hora final foram menores do que os obtidos na hora inicial.

Se analisarmos por ordem dos cinco melhores, estes foram classificados como menos eficientes: os antimicrobianos virgíniamicina 100%, cloranfenicol + oxitetraciclina, penicilina e o extrato de úpulo, junto com ele a monoensina e a penicilina + tetraciclina, podendo estes serem classificados como pouco eficientes.

A Figura 5 apresenta resultados finais da média da absorvância da quinta amostra.

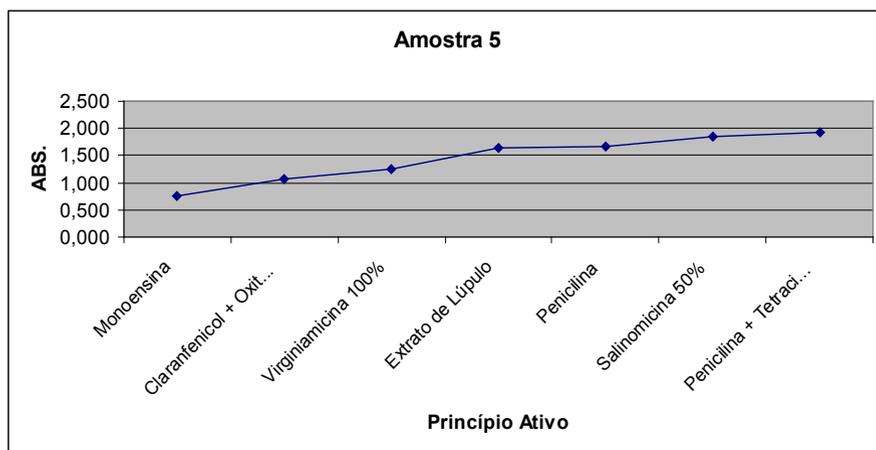


Figura 5 Representa os resultados da amostra 5, sendo a média da absorvância.

O testemunho, em sua hora inicial teve uma leitura óptica de 0,207 de absorvâncias e 1,897 de absorvância em sua hora final, podendo, assim, ser demonstrado que nesta amostra havia uma grande quantidade de bactérias as quais cresceram de modo exponencial.

Esta figura mostra que o menor dos resultados de absorvância é 0,742 do antimicrobiano monoensina, o qual foi considerado um valor alto, demonstrando que a fermentação deste dia estava com um alto grau de infecção de difícil controle microbiológico, tendo, assim, que optar por métodos mais agressivos na fermentação, para que não houvesse a perda da levedura e tendo, assim, que começar uma nova fermentação com uma cepa nova. Nesta usina este método é chamado de “Tratamento de Choque”; adiciona-se uma concentração mais alta de antibióticos em vários outros pontos espelhados por toda a fermentação.

Esta escolha normalmente é feita com base nos melhores resultados do TSA, mas se devem levar em consideração outros fatores como, por exemplo, o problema de rastro de antibiótico, se as quantidades em estoque serão suficientes para manter todo o cronograma de tratamento como também os valores econômicos.

Ao analisar a ocorrência deste tipo de infecção, é importante observar e pesquisar o porquê da ocorrência. Algumas razões podem ser levadas em conta, como o uso incorreto anteriormente na administração dos antibióticos, facilitando, assim, com que as bactérias adquiram resistências aos mesmos e, dessa maneira, dificultem o tratamento.

Fica evidente nesta amostra que, além dos antibióticos não terem suas função de bactericida eficaz e por outros motivos já descritos anteriormente, a fase exponencial de crescimento das bactérias é mais duradoura.

Para melhor entendimento desta situação, pode ser observado o princípio ativo penicilina + tetraciclina, o qual obteve, em sua hora inicial, uma leitura óptica de média 0,200 de absorbância e, após as 24 horas de incubação, a leitura foi de média 2,135 de absorbância, considerando ainda que a concentração utilizada nesta amostra foi os 3,00 ppm recomendado pelo fabricante. E, ainda assim, houve um crescimento de 12,56% a mais do que o próprio testemunho, que não havia nenhum tipo antimicrobiano.

Para obtenção dos resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) são executadas duas leituras durante as 24 horas, sendo uma na hora inicial e a outra na hora final. E, para um melhor estudo dos resultados, foram necessárias mais duas leituras neste intervalo de 24 horas, sendo uma leitura a cada 6 horas, tendo, assim, cinco resultados no final para serem estudados, facilitando a tomada de uma decisão.

A partir destes resultados, pode ser melhor estudada a eficiência do antibiótico através da curva de crescimento bacteriano que foi demonstrado através dos cinco resultados, podendo assim verificar até em qual hora o antibiótico teve a função bactericida e onde começou a função bacteriostática e fazer uma melhor escolha em relação à dosagem do antibiótico podendo ser utilizado em batelada ou contínua.

Como melhoria para o método, a quantidade de antibiótico deve ser conforme a recomendada pelo fabricante e pode ser também testado em outras dosagens, pois, como foi dito, as amostras são com todos os microorganismos presente na levedura, assim os resultados dos testes feitos pelos fabricantes podem variar

conforme a realidade do dia-a-dia de uma usina.

Estas melhorias são cabíveis à realidade da usina, podendo ser acrescentadas às análises diárias do microbiologista. Mas como a sugestão, neste caso, é de maior investimento em quais são as análises de cariotipagem para conhecer quais são as bactérias presentes durante todo o processo e, depois de se conhecer estas bactérias, fazer um acompanhamento mais contínuo do melado, o qual é utilizado para alimentar a fermentação, assim podendo ter uma previsão de como proceder com o tratamento.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises do teste de sensibilidade *in vitro* concluiu-se que esta técnica é de extrema importância para o acompanhamento e tratamento de uma fermentação alcoólica, mantendo esta em condições favoráveis para uma boa produtividade de álcool, evitando e combatendo as infecções presentes nesta fermentação.

Através da realização do teste de sensibilidade, onde foi utilizada amostra de levedo do processo de fermentação alcoólica, podemos observar que os resultados obtidos no teste variaram de positivo para negativo de acordo com cada amostra.

Sendo assim, pode-se concluir que os microrganismos contaminantes presentes no processo fermentativo, mais especificamente no levedo, variam muito no decorrer de cada dia. Com isso, foi possível visualizar que as eficiências de alguns antimicrobianos tiveram muitas variações.

Dentro dos resultados obtidos foram classificados em ordem de mais eficiente com melhor atividade antimicrobiana, para aqueles que apresentaram menor eficiência: penicilina; virginamicina 100%; monoensina; penicilina + tetraciclina; cloranfenicol + oxitetraciclina; extrato de lúpulo; salinomicina 50%.

Dentre os resultados obtidos, o princípio ativo extrato de lúpulo, que ficou em sexto lugar da classificação geral, teve um resultado que foi considerado eficiente, ainda que nos testes fossem utilizados uma quantidade inferior a que

é recomendada pelo fabricante e também pelo fato de seu princípio ativo ser natural, sendo este de fácil degradação. A quantidade recomendada é de 5 a 10 ppm, porém foi utilizado apenas 3 ppm.

Sobre a metodologia utilizada para os teste de sensibilidade *in vitro* ou teste de antibiograma, foi observado que os resultados obtidos são muito superficiais, deixando dúvidas em relação a metodologia da análise, não garantindo assim a total eficiência dos antibióticos.

Houve os princípios ativos os quais apresentaram atividade antimicrobiana com baixa eficiência em alguns dos resultados; nisso foi considerado que as amostras de levedo possuíam bactérias que ali estavam presentes, resistentes a determinados antibióticos. Isso pode ocorrer através do uso incorreto dos antibioticos.

Com isso as empresas do setor sucroalcooleiro devem tomar providências como a realização constante de teste de sensibilidades *in vitro* para verificação dos microrganismos presentes no processo, para que este tipo de problema não ocorra.

## **REFERÊNCIAS**

ALTERTHUM, F. et al.. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB - Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.

AMORIN, H. V.; OLIVEIRA, A. J.. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Alcool**, v. 5, p. 12-18, 1982.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H.. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇÚCAREIROS DO BRASIL, 2., 1981, Rio de Janeiro. **Anais...** Piracicaba, SP: STAB, 1981, p. 158-168.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R.. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência - Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, out. 2006.

ANTONINI, S. R. C.. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de Destilaria**. Curso de treinamento ministrado a unidades pertencentes à Usina de Açúcar Santa Teresinha, Unidade – Iguatemi no período de 19-21 fev. 2004. Iguatemi, PR: UFSCAR, 2004. [Apostila].

BALL, W. J.; ATKINSON, D. E.. Adenylate energy in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. **Journal of Bacteriology**, v. 121, n. 3, p. 975–982, 1975.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.. **Microbiologia Básica**. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 1998.

CARDOSO, M. G.. **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras, MG: UFLA, 2006.

EGAN, B. T.. The infection process in sour storage rot. In: CONFERENCE OF QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS, 32., 1965. **Proceedings...** [S. l.]: [S. n.], 1965. p. 21-24.

EGUCHI, S. Y. et al.. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas, SP: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1989.

LIMA, U. A. et al.. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo, SP: Edgard Blücher, 2001.

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

MAYEUX, J. V.; COLMER, A. R.. Selective medium for Leuconostoc detection. **Journal of Bacteriology**, v. 81, n. 6, p. 1009–1011, 1961.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Campinas, 1995. 183ff. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP: Unicamp, 1995.

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

PANEK, S. L.; WOOLLEY, R.. **Some slime forming of the genus Lactobacillus**. [S. l.]: [S. n.], 1990.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRICG, N. R.. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed.. São Paulo, SP: [S. n.], 1997. v. 2.

RISTOW, L. E.. Antibiograma. In: JORNADA DE CONHECIMENTO TECSA: SUINOCULTURA, 2009. Anais... Belo Horizonte, MG: TECSA, 2009. p. 2–4.

STROPPIA, C. T.. **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP: Unicamp, 1998.

TILBURY, R. H.. Biodeterioration of harvest sugar cane. In: WALTERS, A. H.; ELPHICK, J. J.. **Biodeterioration of materials**. Amsterdam: Elsevier, 1968. p.

717-730.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiology**. 2 ed. [S. l.]: [S. n.], 2006.

USITEC QUÍMICA. **Produtos** – Bactericidas e bacteriostáticos. Sertãozinho, SP: Usitec, 2009. [Folheto].

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

*Recebido em: 31 Outubro 2010*

*Aceito em: 20 Março 2011*