

## Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais

Alessandra Carolina Gonçalves Caetano <sup>(1)</sup>

Leonardo Lucas Madaleno <sup>(2)</sup>

### Resumo

A contaminação bacteriana na fermentação alcoólica é um fator importante a ser considerado, pois pode ocorrer transformação das matérias-primas fermentáveis em substâncias outras que não o produto desejado. Isso provoca perdas irreparáveis no rendimento da fermentação. Muitos antimicrobianos são utilizados para controle desses microrganismos contaminantes; dentre estes se destacam os antibióticos que geram resíduos e causam resistência microbiana. Por isso, tem se tornado cada vez mais frequente o uso de antimicrobianos naturais que não causam resistência de bactérias e não deixam resíduos. O lúpulo, um antimicrobiano natural, já está em uso, e outros produtos com atividade antimicrobiana, como a própolis, o pomelo e o jambolão, podem ser mais estudados para essa finalidade.

**Palavras-chave:** lúpulo, própolis, pomelo, antibióticos.

### Abstract

*Bacterial contamination in alcoholic fermentation is an important factor to be considered, because it could transform raw materials into fermentable substances other than the desired product. This causes irreparable losses in fermentation efficiency. Many antibiotics are used to control microbial contaminants which generate waste and cause microbial resistance. So it has become increasingly frequent the use of natural antimicrobials that do not cause bacterial resistance and leave no residue. Hops, a natural antimicrobial, is already in use, and other products with antimicrobial activity, as propolis, grapefruit and jambolão, can be further studied for this purpose.*

**Keywords:** hops, propolis, grapefruit, antibiotics.

---

<sup>1</sup> Tecnóloga em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC). alessandragcaetano@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo. Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal-SP). Docente da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC). leonardo.madaleno@fatec.sp.gov.br

## **Introdução**

No processo industrial de produção do etanol, a contaminação bacteriana é fator importante a ser considerado, pelo fato de desviar a transformação das matérias-primas fermentáveis em outras substâncias que não o produto desejado. O caldo de cana e o mosto são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias, devido ao elevado conteúdo de nutrientes orgânicos e inorgânicos, presença de água, pH favorável e temperatura ótima para o desenvolvimento de microrganismos (CHERUBIN, 2003). O controle da contaminação em ambiente industrial é bastante complexo, pois, acima de tudo, é necessária adequada compreensão do ecossistema industrial, dos nichos que surgem e são criados continuamente, e dos fatores que colaboram para a seleção e disseminação de microrganismos contaminantes (EGUCHI, 2007).

Os antibióticos são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que inibem ou causam a morte de microrganismos específicos apresentando seletividade quanto aos alvos. Como os alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz à seleção de microrganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Por questões de saúde pública, em muitos países, não é admissível usar uma levedura para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresente resíduos de antibióticos (TAUBE, 2009), tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

Os biocidas naturais estão sendo empregados com amplo sucesso no controle de microrganismos contaminantes da fermentação, mas os resultados são demonstrados de forma isolada. A aplicação das principais formas de controle com biocidas naturais pode auxiliar na tomada de decisão para um tipo de controle que entra em acordo com as exigências atuais de redução de resíduos. Além disso, a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol é de elevado custo, enquanto o controle exercido pelos biocidas apresenta baixos custos de utilização. Torna-se clara a necessidade de tornar os biocidas naturais produtos padronizados para o emprego em larga escala na indústria de produção de etanol. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi fazer uma revisão sobre a utilização de biocidas naturais no controle de contaminantes da fermentação alcoólica.

## Revisão Bibliográfica

### Fermentação alcoólica

A fermentação é um processo catabólico anaeróbio em que há a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de microrganismos (levedura), até a formação de etanol e CO<sub>2</sub>, havendo liberação de energia química e térmica. As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. As leveduras utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas e combustível geralmente são linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (VENTURINI FILHO; MENDES, 2008). A célula de levedura possui no citoplasma celular um aparato enzimático no qual ocorre a transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO<sub>2</sub>, envolvendo 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica (LIMA, 2001).

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA et al., 2001). A ocorrência de fermentações paralelas reduz o rendimento fermentativo, modificando as características do vinho quanto aos teores dos componentes secundários, que neste caso são mais elevados, caracterizando as perdas de açúcares no processo de deterioração microbiana (MUTTON, 2008).

### Contaminação bacteriana no processo de fermentação alcoólica

A agroindústria do etanol representa considerável gerador econômico. Como toda a produção de álcool ocorre por via fermentativa, é fundamental o conhecimento do processo fermentativo, que tem sido constantemente aprimorado. A infecção bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo, tais como: consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007).

No processo de fermentação são descritos os gêneros de microrganismos comumente encontrados no caldo em processo, tais como: *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Leuconostoc*. Todos esses microrganismos produzem quantidades apreciáveis de ácidos orgânicos (butírico, acético, fórmico, láctico) (ANDRIETTA, M.; STECKELBERG;

ANDRIETTA, S. 2006). Diversos autores verificaram influência dos ácidos acético e láctico na inibição do crescimento e na queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a  $10^6$  ou  $10^7$  células/mL de mosto, pode ocorrer significativa queda no rendimento alcoólico (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007).

Entre as bactérias produtoras do ácido láctico, o gênero *Leuconostoc* tem papel importante como contaminante na produção do açúcar e do álcool, utilizando o açúcar do caldo para a produção de goma. Outros microrganismos como *Klebsiella* e *Acetobacter* também formam goma, sendo também citados como habitantes das linhas de condução de caldo na usina. Em extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo, os resultados obtidos revelaram que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo gram-positivo. O gênero *Lactobacillus* foi o mais frequente entre eles (59,75%) (ANDRIETTA, M.; STECKELBERG; ANDRIETTA, S., 2006).

O fator mais crítico da contaminação bacteriana para as fermentações, especialmente nas quais se extrai levedura para secagem, é a floculação. Esse fenômeno ocorre quando há interação entre os lactobacilos e a levedura, potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Tais condições levam as bactérias a se aderirem nas paredes das leveduras, por meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (VENTURA, [s.d.]).

## **Controle da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**

### **Antissépticos e antibióticos**

Para controlar o problema das contaminações, podem ser utilizados antissépticos e antibióticos que atuam de forma diferente, agindo sobre um ou mais grupos de microrganismos. Porém existe a possibilidade de deixarem resíduos nos destilados. O pentaclorofenol foi usado durante alguns anos nas proporções de 0,01 a 0,05g/L de mosto, com bons resultados, porém seu uso é hoje proibido. O hexaclorofenol em dose de 4mg/L de mosto, segundo pesquisas, contribui para boas fermentações. São citados na literatura também sulfato de cobre e colofônia, embora o mais utilizado na indústria seja o ácido sulfúrico que se adiciona nos mostos em fermentações para produção de álcool. Os antibióticos cloranfenicol e tetraciclina também são empregados, embora a penicilina seja economicamente mais

vantajosa com o emprego de 500 a 1000UI (Unidades Internacionais) por litro de mosto (BREGAGNOLI, 2006).

Contudo, não é raro o uso de produtos proibidos em alimentação animal, ou que contenham coadjuvantes inertes prejudiciais à levedura. Recentemente, essa classe de produtos tem sido alvo de monitoramento e regulamentação em levedura seca por parte das autoridades regulatórias dos países compradores desse material, em função da detecção de residual de antibióticos acima do esperado em lotes exportados (VENTURA, [s.d.]). Além disso, o problema da resistência microbiana é crescente, e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

### **Biocidas naturais**

Os biocidas são formulações ou produtos específicos utilizados na desinfecção do mosto, tanques e equipamentos utilizados na fermentação. Vários desses produtos atendem as exigências de agências alimentícias de alguns países, embora alguns não sejam regulamentados para uso em alimentos por não atingirem padrões sanitários mínimos (VENTURA, [s.d.]).

### **Própolis**

A própolis é produzida pelas abelhas para as mais variadas funções na colmeia, sendo um material quebradiço quando frio e dúctil e maleável quando aquecido. A própolis é conhecida por suas propriedades biológicas. Sua propriedade antimicrobiana é amplamente relatada, sendo destacada a ação sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida sp* e sobre inúmeros outros microrganismos. Foi verificado também que as bactérias gram-positivas se mostram mais sensíveis que as gram-negativas ao extrato de própolis (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006).

Até o presente, não se tem dados que respondam o porquê desta menor atividade do extrato de própolis contra bactérias gram-negativas; no entanto, esses agentes, apesar de possuírem estrutura de parede celular menos rígida do que as gram-positivas, possuem parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos. Além disso, esse grupo de bactérias possui teor lipídico maior do que as

gram-positivas. Tais características podem estar envolvidas com a maior resistência dessas bactérias ao extrato de própolis (VARGAS et al., 2004).

Vargas et. al. (2004) analisaram a atividade antibacteriana do extrato de própolis contra os gêneros bacterianos gram-positivos e verificaram que 100% dos isolados de *Nocardia asteroides* se demonstraram sensíveis ao extrato, seguidos de *Staphylococcus sp.* (97,83%), *Streptococcus sp.* (80,95%), *Rhodococcus equi* (80%), *Pseudomonas aeruginosa* (72,41%), *Proteus mirabilis* (33,3%), *Escherichia coli* (25%) e *Salmonella sp.* (22,72%).

Estudos demonstram que o extrato de própolis pode ser utilizado no controle de bactérias contaminantes, uma vez que se mostrou tão eficiente quanto a ampicilina em testes realizados em laboratório (BREGAGNOLI, 2006). Os flavonoides, juntamente com os ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas, são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. O mecanismo de atividade antimicrobiana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006).

### **Jambolão**

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) é planta da família *Mirtaceae*, oriunda da Índia oriental e bastante conhecida na medicina popular indiana e paquistanesa por seus efeitos hipoglicemiantes. Tem como sinônímia os nomes de *Eugenia jambolana* (Lam.), *Myrtus cumini* L., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC e *Eugenia cumini* Druce (LOGUERCIO et al., 2005).

As folhas são ricas em taninos e saponinas. Tanto a casca como as folhas e as sementes são bastante adstringentes. O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (LOGUERCIO et al., 2005).

Estudos têm mostrado que o extrato hidroalcoólico a 10% (m/v) de folhas de jambolão apresenta atividade antibacteriana frente aos isolados bacterianos *Staphylococcus sp.*, *S. aureus*, *S. intermedius*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium sp.*, *Rhodococcus equi*,

*Streptococcus canis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus sp.*, não sendo observada diferença de sensibilidade entre microrganismos gram-positivos e gram-negativos (LOGUERCIO et al., 2005).

## **Lúpulo**

O lúpulo é uma flor da família das Canabidáceas que entra na composição das cervejas. A planta não tem efeito entorpecente, serve para dar à cerveja seu amargor, além de contribuir no aroma da bebida. Essa substância possui antioxidantes naturais potentes, além de apresentar alguns componentes de efeito bactericida. O lúpulo é um dos três fatores que tornam a cerveja um ambiente hostil à presença de bactérias causadoras de doenças, os outros são o álcool e o gás carbônico (NOGUEIRA, 2004).

Os compostos ativos do lúpulo estão presentes nas glândulas das flores femininas da planta, e essas geralmente apresentam de 4 a 5cm de comprimento. O lúpulo constitui-se de óleos essenciais (0,2-3%),  $\beta$ -ácidos, também chamados lupulonas (1,5-9,5%) e de  $\alpha$ -ácidos (2,0-16,0%), também chamados humulonas. As proporções de cada composto dependem da variedade da planta (SILVA; FARIA, 2008).

Os  $\beta$ -ácidos possuem ação bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular e alterando o pH intracelular. A pronunciada ação bacteriostática sobre bactérias gram-positivas parece estar relacionada à interferência do grupo prenil, presente nas cadeias laterais dos  $\beta$ -ácidos, sobre a membrana plasmática das células, inibindo fortemente o seu crescimento (SILVA; FARIA, 2008).

Alguns estudos realizados mostraram que o  $\beta$ -ácido se mostrou muito eficiente na inibição do crescimento da bactéria gram-positiva *Lactobacillus*. O perfil de crescimento do *Bacillus*, bactéria classificada como gram-positiva, manteve-se inconstante, observando-se ligeiras variações conforme as diferentes concentrações de  $\beta$ -ácido. Concluiu-se que a concentração mínima inibitória (IMC) se encontra na faixa de 3 a 5mg/L de biocida, sendo o crescimento celular interrompido nesta faixa. O  $\beta$ -ácido também se mostrou eficiente nos experimentos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que não apresentou alteração no crescimento, visto que a inibição não seria conveniente ao processo fermentativo (OLIVEIRA, [s.d.]).

O Extrato de Lúpulo  $\beta$ -Ácido 45% foi lançado no setor sucroenergético brasileiro em 2007; o produto foi anteriormente testado em laboratório, com diversas dosagens, pela empresa

Fermentec, procedente de Piracicaba-SP. No Brasil, ainda é novidade, entretanto usinas como Santo Antônio, de Sertãozinho-SP, e algumas unidades do grupo Cosan já utilizam o lúpulo. O fabricante ressalta que os produtos são derivados de fontes naturais, possuem grau alimentar, são seguros e de fácil aplicação (líquido), além de possuírem o Certificado Kosher (exigência de alguns países de cultura ortodoxa judaica) (CONTROLE, 2009).

O lúpulo testado por especialistas do ramo de fermentação apresentou vantagens além do controle bacteriano, como a redução do gasto de ácido sulfúrico no tratamento do levedo e incremento no rendimento de etanol. Por ser produto natural, sua utilização tem se mostrado crescente nas usinas que secam levedura comercializada como ração animal. Quanto aos custos para a usina, os produtos se assemelham aos dos antibióticos (CONTROLE, 2009).

#### **2.2.2.4 Pomelo**

O extrato de semente de pomelo é um agente antimicrobiano natural, tanto para uso interno quanto externo. O extrato de pomelo é produto derivado das sementes e da polpa do fruto. A investigação química revelou a presença de flavonoides, ácido ascórbico, tocoferóis, ácido cítrico, limonoides, esteróis e minerais. É comumente relatado por ter poderosa atividade antimicrobiana (CVETNIC; KNEZEVIC, 2004).

A atividade antimicrobiana foi testada contra 794 bactérias e 93 cepas fúngicas. A solução de extrato de pomelo a 0,5% foi eficaz contra bactérias gram-positivas (*Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*), bactérias gram-negativas (*Enterobacter sp.* e *E. coli sp.*), e vários bolores e leveduras (*Cândida*, *Geotrichum*, *Aspergillus* e *Penicillium sp.*). A administração oral do mesmo agente em pacientes com eczema atópico resultou na inibição de *Cândida sp.*, *Geotrichum sp.* e *E. coli*, enquanto *Staphylococcus aureus*, formadores de esporos aeróbicos, e lactobacilos foram apenas inibidos parcialmente (TAKEOKA et al., 2001).

A eficácia antibacteriana, o mecanismo de ação e a toxicidade *in vitro* foram recentemente investigados, sendo constatado que o extrato rompe a membrana bacteriana e libera o conteúdo citoplasmático no prazo de 15 minutos (CVETNIC; KNEZEVIC, 2004). Segundo Bregagnoli (2006), a utilização de extrato de pomelo em experimento realizado para controle de microrganismos contaminantes na produção de cachaça orgânica mostrou-se inadequada no controle de bactérias contaminantes por causar inibição parcial do processo fermentativo.



## Considerações finais

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos tem levado à seleção de microrganismos resistentes a esses compostos, além de deixarem resíduos acima do esperado. O uso de biocida natural, além de não deixar resíduo, também não provoca a resistência bacteriana.

Alguns produtos fabricados com lúpulo já estão sendo utilizados em algumas usinas. Esses produtos oferecem diversas vantagens, inibindo seletivamente os contaminantes, eliminando a formação do ácido láctico e acético oriundos de fermentações paralelas; substituem antibióticos e produtos químicos indesejáveis na fermentação, proporcionam a produção de coprodutos livres de antibióticos, cumprem as regulamentações da União Europeia para aditivos em ração animal, podem aumentar o desempenho da levedura e acelerar a fermentação e ajudam a eliminar perdas de rendimento na produção de etanol.

A própolis, o pomelo e o jambolão também possuem ação antimicrobiana, porém ainda faltam mais estudos sobre seus poderes biocidas na fermentação alcoólica. Portanto, há necessidade de existir a constante pesquisa sobre os biocidas naturais para que novas descobertas tragam vantagens no controle da contaminação e assim haja a preservação da qualidade dos coprodutos, além é claro, dos menores custos e riscos que ainda hoje são ocasionados pelo uso de antibióticos.

## Referências

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

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. In: MULTICIÊNCIA: CONSTRUINDO A HISTÓRIA DOS PRODUTOS NATURAIS, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2006. p.1-16.

BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CONTROLE natural. 2009. Disponível em: < [www.energiamundo.com.br](http://www.energiamundo.com.br) > Acesso em: 15 out. 2010.

CVETNIC, Z.; KNEZEVIC, S. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. **Acta Pharm**, v. 54, p. 243–250, 2004.

EGUCHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo, n.22, p.35-39, 2007. Disponível em: <[http://www.sbcc.com.br/sumario\\_22.htm](http://www.sbcc.com.br/sumario_22.htm)>. Acesso em: 15 nov. 2010

FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis Mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, jan./fev. 2006.

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

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão *Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p.371-376, mar.abr. 2005.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. In: WORKSHOP SOBRE “PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA”, 2008. Lorena. **Anais...** Lorena, 2008. p.9-10. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position\\_paper\\_painel2\\_marcia.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/position_paper_painel2_marcia.pdf)>. Acesso em: 07 nov. 2010

NOGUEIRA, M. O que é lúpulo. **Revista Superinteressante**. n.197, fev. 2004. Disponível em: <[http://super.abril.com.br/superarquivo/2004/conteudo\\_313532.shtml](http://super.abril.com.br/superarquivo/2004/conteudo_313532.shtml)> Acesso em: 11 out. 2010.

OLIVEIRA, M.A.S.; **Avaliação do poder biocida de beta-ácidos do lúpulo como controladores da contaminação na fermentação alcoólica**. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena/ USP, [s.d]. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/Resumos/15Siicusp/3993.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2010.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28 n.4, p. 902-906, out./dez. 2008.

TAKEOKA, G.; DAO, L.; WONG, R.Y.; LUNDIN, R.; MAHONEY, N. Identification of Benzethonium Chloride in Commercial Grapefruit Seed Extracts. **J. Agric. Food Chem.**, n.49, p. 3316-3320, 2001.

TAUBE, J.S. O negócio é ser natural. **Revista Canamix**, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <<http://www.canamix.com.br/revistas>>. Acesso em: 20 dez. 2009.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, jan./fev. 2004.

VENTURA, R. **Potenciais contaminantes em levedura extraída de fermentação alcoólica**, [s.d.] Disponível em: <[http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra\\_ventura.pdf](http://www.quimicareal.com.br/upload/palestra_ventura.pdf)>. Acesso em: 25 out. 2009

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: VILA NOVA, M.X. **Análise das leveduras do mosto da fermentação alcoólica de alambiques artesanais produtores de cachaça em Pernambuco**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.