

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E  
BIOPROCESSOS  
MESTRADO PROFISSIONAL

ESTUDO DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO COMO  
ANTIMICROBIANOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE ETANOL

LUCAS FERREIRA MOCHEUTI

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

ARARAQUARA - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO GÁLICO COMO  
ANTIMICROBIANOS NATURAIS NA PRODUÇÃO DE ETANOL

LUCAS FERREIRA MOCHEUTI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

ARARAQUARA - SP

2022

---

**M688e** Mocheuti, Lucas Ferreira.  
Estudo de ésteres derivados do ácido gálico como antimicrobianos naturais na produção de etanol / Lucas Ferreira Mocheuti. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Fermentação alcoólica. 2. Antibióticos naturais. 3. Etanol. 4. Ácido gálico. I. Fusco Almeida, Ana Marisa, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030170P0**

**Esta ficha não pode ser modificada**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Araraquara**



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Estudo de ésteres derivados do ácido gálico como antimicrobianos naturais na produção de etanol.

**AUTOR: LUCAS FERREIRA MOCHEUTI**

**ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Dr. DIEGO DE ARAÚJO FRAZILIO (Participação Virtual)  
Microbiologia e Fermentações / Al Sukkar Biotecnologia Industrial Ltda Me

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 14 de dezembro de 2022

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Elaine e Gilson pelo cuidado, zelo, apoio, amizade e, principalmente, o incentivo de sempre buscar mais e jamais abandonar os estudos ao longo da minha vida.

Agradeço a minha namorada Aline Cadamuro pelo constante apoio, por ter sido meu alicerce ao longo dessa jornada, me mostrando sempre que eu era capaz, por ter sido minha força quando eu mesmo não tive nenhuma e, principalmente, pelo amor e carinho.

Aos meus tios Rosangela e Luiz pelo acolhimento e apoio incondicional ao longo da minha vida toda. Pela sua participação primordial na minha educação, mas também me mostrando que a vida pode ser mais leve e prazerosa.

Aos meus familiares Andrei e Eloisa pela amizade, apoio e pelos conhecimentos compartilhados nessa trajetória. E aos meus demais familiares e amigos que, mesmo não citados, foram presentes na minha vida fazendo de mim quem sou hoje.

A equipe Al Sukkar e, em especial, ao Diego pelo auxílio nos ensaios e pelos conhecimentos trocados.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida pelas contribuições e parceria sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos professores do programa e aos demais professores que tive ao longo da vida por fazerem parte da minha formação que me permitiu desenvolver este trabalho e me tornar um profissional melhor.

## RESUMO

A etapa do processo de produção de etanol que contém o maior percentual de perdas é durante a fermentação alcoólica. A maior parte dessas perdas é proveniente da contaminação por bactérias, em especial as Gram + que compõem 76% do total das bactérias encontradas durante o processo fermentativo. Essas bactérias além de competir com a levedura no consumo dos açúcares, produzem substâncias (ácidos orgânicos e gomas) que inibem a levedura na produção do etanol. Além da diminuição do rendimento fermentativo, essa contaminação causa também um aumento no consumo de produtos, como biocidas, antibióticos e antiespumantes. Atualmente os produtos utilizados na descontaminação do processo fermentativo são substâncias químicas que agem como antimicrobianos e biocidas, mas deixam residual na levedura, restringindo sua comercialização como ração animal, na forma de levedura seca. Além disso, também pode contaminar a vinhaça, lançada na lavoura como fertirrigação. Como alternativa, o uso de substâncias naturais vem sendo empregado como descontaminantes nas etapas de produção de etanol. Porém a eficácia destas substâncias não é satisfatória devido ao seu custo impeditivo para uso em larga escala e sua falta de eficácia diante um amplo espectro de bactérias contaminantes no processo fermentativo industrial. Os testes de concentração inibitória mínima e os ensaios fermentativos realizados mostraram o galato de propila não apresentou resultados favoráveis ao seu uso como descontaminante no processo fermentativo. Já o galato de etila apresentou bons resultados em fermentações em bancada, mas a alta concentração que ele demanda em comparação com antimicrobianos comerciais ainda é um fator impeditivo ao seu uso em larga escala.

**Palavras chave:** fermentação alcoólica; antibióticos naturais; etanol; ácido gálico

## ABSTRACT

The stage of the ethanol production process that contains the highest percentage of losses is during alcoholic fermentation. Most of these losses come from contamination by bacteria, especially Gram + which add up 76% of the total number of bacteria found during the fermentation process. These bacteria, in addition to competing with the yeast in consumption of sugars, produce toxins (organic acids and gums) that inhibit the yeast in the production of ethanol. In addition to the decrease in fermentation yield, this contamination also causes an increase in the consumption of products, such as biocides, antibiotics and antifoams. Currently, the products used in the decontamination of the fermentation process are chemical substances that acts as antimicrobials and biocides, but leave residues in the yeast, restricting its distribution as animal feed, in the form of dry yeast. In addition, it can also contaminate vinasse, which is released into the crop as fertiirrigation. As an alternative, the use of natural substances has been used as decontaminants in the ethanol production stages. However, the effectiveness of these substances is not satisfactory due to their prohibitive cost for large-scale use and their lack of effectiveness against a wide spectrum of contaminating bacteria in the industrial fermentation process. The minimum inhibitory concentration tests and the fermentation tests carried out on propyl gallate did not show proven results for its use as a decontaminant in the fermentation process. Ethyl gallate, on the other hand, showed good results in bench fermentations, but the high concentration it requires compared to commercial antimicrobials is still an impediment to its use on a large scale.

**Keywords:** alcoholic fermentation; natural antibiotics; ethanol; gallic acid

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Produção de etanol na região Centro-Sul nas últimas safras. ....   | 14 |
| Tabela 2- Dados e estimativa da produção de etanol hidratado e anidro. ....  | 14 |
| Tabela 3- Nomenclatura dos galatos.....  | 26 |
| Tabela 4- Resultados do teste CIM dos galatos fornecidos pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini. ....  | 33 |
| Tabela 5- Resultados do segundo teste CIM. ....  | 36 |
| Tabela 6- Resultado da contagem dos plaqueamentos após os ensaios fermentativos.....   | 37 |
| Tabela 7- Resultados do terceiro teste CIM .....   | 38 |
| Tabela 8- Média dos resultados para o primeiro ciclo fermentativo para açúcares e etanol em HPLC (8 horas).....  | 41 |
| Tabela 9- Média dos resultados para o segundo ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (8 horas). ....   | 41 |
| Tabela 10- Média dos resultados para o terceiro ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (8 horas). ....   | 42 |
| Tabela 11- Média dos resultados para o quarto ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (24 horas). ....  | 42 |
| Tabela 12- Avaliação da atividade da levedura (teor alcoólico) e as perdas de açúcares nos ciclos fermentativos. Resultados é a média de 3 repetições. Os ciclos fermentativos 1°, 2° e 3° foram de 8 h e o 4° ciclo foi de 24 h de fermentação..... | 43 |
| Tabela 13- Resultados da contagem dos plaqueamentos e viabilidade celular de leveduras com os produtos usados durante os 4 ciclos fermentativos.....   | 45 |
| Tabela 14- Média dos resultados dos plaqueamentos e viabilidade de leveduras com os produtos durante os 4 ciclos fermentativos. ....   | 46 |
| Tabela 15- Resultados de HPLC para ensaio fermentativo com melão e fermento de uma usina de outra região.....  | 48 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1-representação da contaminação no processo de produção do etanol .....  | 20 |
| Figura 2- Fórmula estrutural do ácido gálico e seus derivados .....   | 23 |
| Figura 3- Esquema da metodologia de análise da CIM para avaliar antimicrobianos<br>.....                                      | 28 |
| Figura 4- Diagrama dos ensaios fermentativos em erlenmeyer para avaliação dos<br>antimicrobianos .....                        | 29 |
| Figura 5- diluições seriadas utilizadas para plaqueamento spread plate. ....  | 30 |
| Figura 6- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de etila<br>sobre o “pool de bactérias” .....   | 34 |
| Figura 7- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de etila<br>sobre o “pool de leveduras” .....   | 35 |
| Figura 8- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de<br>propila sobre o “pool de bactérias” ..... | 35 |
| Figura 9- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de<br>propila sobre o “pool de leveduras” ..... | 36 |
| Figura 10- fotografia do terceiro teste CIM para ação contra bactérias.....   | 39 |
| Figura 11- fotografia do terceiro teste CIM para ação contra leveduras.....   | 39 |

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Equação 1- Contagem de colônias na placa.....                       | 30 |
| Equação 2- Cálculo da viabilidade celular, em percentagem.....      | 31 |
| Equação 3- Cálculo do ART ou ARRT em miligramas por litro .....     | 32 |
| Equação 4- Cálculo do ART ou ARRT em percentagem. ....              | 32 |
| Equação 5- Cálculo da atenuação antimicrobiana em percentagem ..... | 32 |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 14 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 17 |
| 2.1. Objetivos específicos.....  | 17 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA.....  | 18 |
| 3.1. Ácido gálico e seus derivados (galatos).....                        | 22 |
| 3.2. Residuais impeditivos na levedura seca.....                         | 23 |
| 4. MATERIAIS E METODOLOGIA.....  | 25 |
| 4.1. Preparo das soluções utilizadas.....                                | 25 |
| 4.1.1. Os galatos utilizados.....  | 25 |
| 4.2. Testes de concentração inibitória mínima (CIM).....                 | 26 |
| 4.3. Ensaio fermentativo.....  | 28 |
| 4.3.1. Inoculação dos ensaios fermentativos.....                         | 29 |
| 4.3.2. Ensaio com reciclo de fermento.....                               | 30 |
| 4.4. Viabilidade celular das leveduras.....                              | 30 |
| 4.4.1. Cálculo da viabilidade celular das leveduras.....                 | 31 |
| 4.5. Análises por HPLC.....  | 31 |
| 4.5.1. Cálculos de ART e ARRT em mg.L <sup>-1</sup> e em percentual..... | 31 |
| 4.5.2. Cálculo da eficiência antimicrobiana.....                         | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 33 |
| 5.1. Concentração inibitória mínima.....                                 | 33 |
| 5.2. Primeiro ensaio fermentativo.....                                   | 37 |
| 5.4. Ensaio fermentativo com reciclo da massa de leveduras.....          | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 5.4.1. Análises de açúcares residuais na fermentação e teor de etanol gerado.<br>..... | 40 |
| 5.4.2. Plaqueamento das amostras de vinho e viabilidade celular de leveduras.<br>..... | 45 |
| 5.5. Novo ensaio fermentativo com mosto e fermento de outra usina .....                | 47 |
| 6. CONCLUSÕES .....  | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 52 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus Celcius

°GL: teor de etanol volume/volume (Gay-Lussac)

≥: maior igual

µg. mL<sup>-1</sup>: micrograma por mililitro

ART: açucares redutores totais

ARRT: açucares redutores residuais totais

CBM: concentração bactericida mínima

CFM: concentração fungicida mínima

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

g: grama

h: hora

L: litro

mg.mL<sup>-1</sup>: miligramas por mililitro

mL: mililitro

mM: Milimolar (0,001 mol por litro)

m/v: massa- volume

n: número de amostras

n°: número

nm: nanômetros

PCA: plate count Aggar

PES: poliestersulfona

pH: potencial hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

t - tonelada

UFC.mL: unidade formadora de colônia por mililitro

## 1. INTRODUÇÃO.

O etanol no Brasil é produzido quase que exclusivamente por fermentação do caldo de cana. A levedura, em especial a *Saccharomyces cerevisiae*, é o microrganismo de fermentação mais comumente utilizado. Os microrganismos do ambiente, principalmente proveniente do solo, que aderem à cana-de-açúcar, constituem a carga microbiana contaminante do processo e podem atingir níveis os quais são prejudiciais à produção de álcool (ALCARDE, 2003).

O Brasil detém o maior complexo de usinas produtoras de etanol por fermentação de caldo de cana do mundo. O setor sucroalcooleiro movimenta muito a economia principalmente na região Centro-Sul do país, que é responsável pela maior parte da produção de etanol do país, com um volume de etanol produzido maior que 30 bilhões de litros em cada safra. Alguns dos impressionantes números do setor podem ser observados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Produção de etanol na região Centro-Sul nas últimas safras.

| Safra     | Etanol total (m <sup>2</sup> ) |
|-----------|--------------------------------|
| 2020/2021 | 27.795.900                     |
| 2021/2022 | 24.104.492                     |

Fonte: Observatório da cana

Tabela 2- Dados e estimativa da produção de etanol hidratado e anidro.

| REGIÃO/UF  | ETANOL ANIDRO (Em mil l) |               |            | ETANOL HIDRATADO (Em mil L) |               |            |
|------------|--------------------------|---------------|------------|-----------------------------|---------------|------------|
|            | Safra 2021/22            | Safra 2022/23 | Variação % | Safra 2021/22               | Safra 2022/23 | Variação % |
| SUDESTE    | 6.540.458,0              | 6.371.430,9   | 2,6        | 8.420.665,0                 | 7.501.344,4   | 10,9       |
| SP         | 5.347.976,0              | 5.096.249,4   | 4,7        | 6.596.730,0                 | 5.710.663,9   | 13,4       |
| CENTRO-SUL | 10.162.111,0             | 10.597.604,9  | 4,3        | 17.573.559,0                | 17.413.445,4  | 0,9        |
| BRASIL     | 11.188.711,0             | 11.700.917,6  | 4,6        | 18.686.985,0                | 18.651.787,6  | 0,2        |

Fonte: Conab

Nota: estimativa em Agosto/2022

Para obter um bom rendimento fermentativo, é condição vital fazer o controle e monitoramento da contaminação no processo. Nas usinas utilizam-se grandes quantidades de produtos químicos e antibióticos para o combate a esta contaminação. (CHERUBIN, 2003).

O controle da contaminação no processo de produção do etanol é realizado utilizando-se de vários recursos, como uso de ácido sulfúrico, controle da temperatura, e a utilização de antibióticos é um dos principais. Por outro lado, o controle analítico do processo é muito importante, pois fornece informações sobre o andamento do processo fermentativo além de permitir a dosagem adequada de produtos e fornecer dados para um planejamento efetivo da produção (ALCARDE, 2003).

Na fermentação alcoólica ocorre o maior percentual de perdas no processo de produção do etanol. Além das perdas devido à qualidade da matéria prima, tem a contaminação por bactérias, que produzem fermentações indesejáveis, resultando em produtos prejudiciais a fermentação (OLIVA-NETO, 2001). Esses contaminantes produzem ácidos orgânicos, gomas, entre outros que reduzem o rendimento fermentativo e modificam as características do vinho (líquido após a fermentação, contendo até 12% de etanol, segundo Gay-Lussac), diminuindo o teor alcoólico. Quanto maior a concentração dessas substâncias no vinho, mais rigorosa deverá ser a destilação. Considerando que o etanol deve atender especificações quanto aos teores máximos de componentes, estas operações de purificação do destilado sempre têm perdas que resultam em reduções das eficiências do processo (DELLA-BIANCA, 2012).

Para combater a contaminação do processo são utilizados antimicrobianos como; compostos quaternários (em especial o quaternário de amônio), dióxido de cloro, compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, cujo objetivo é inibir o crescimento ou promover a morte dos microrganismos contaminantes. Os antibióticos têm a vantagem de possuir seletividade de seus alvos, porém, tem a desvantagem do alto custo e a ocorrência da seleção de alguns microrganismos resistentes (EUGHI, 2007). Além disso, os principais antibióticos usados nas usinas, à base de monensina, deixam residuais e não podem ser usados quando a usina produz a levedura seca. Assim, cada vez mais as usinas estão buscando alternativas como antimicrobianos de origem natural ou sintética que tenham eficiência antimicrobiana, mas que não deixam resíduos na levedura seca, nem tampouco na vinhaça, lançada na lavoura como fertirrigação.

Considerando o caso de fermentações em batelada, que é o mais comumente empregado hoje nas usinas brasileiras, utiliza-se no controle da contaminação do processo fermentativo entre 3,8 a 8,0 mg de antibióticos para cada litro de etanol

produzido (KRONKA, 2021). Considerando ao menos 30 bilhões de litros que são produzidos por safra, de 114 a 240 toneladas de antibióticos são gastas por safra (e esse número pode aumentar para safras com mais de 30 bilhões de litros produzidos).

Para cada litro de etanol produzido são gerados, aproximadamente, 60g de levedura, sendo de 20 a 30g recuperados para secagem. Atualmente, são produzidos cerca de 60mil toneladas de levedura seca por safra e aproximadamente 90% dessa levedura seca é comercializada como ração animal. (ALCARDE, 2003). Atualmente apenas uma empresa multinacional (Alltech) produz ração animal utilizando levedura seca.

Diante deste contexto, a procura por compostos de origem natural que sejam capazes de controlar a contaminação bacteriana no processo fermentativo industrial sem que deixem subprodutos na levedura seca que impeçam sua comercialização vêm crescendo por parte das usinas. (PAULUS, 2013).

Para atender a essa crescente demanda, o estudo realizado neste trabalho foi avaliar o uso de derivados do ácido gálico (galatos) como antimicrobiano de origem natural para o controle da contaminação no processo de produção do etanol, sem deixar residuais na levedura seca que sejam impeditivos na sua comercialização como ração animal. (VIÉGAS, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência de produtos de origem natural derivados do ácido gálico para o controle da contaminação bacteriana existente no processo de fermentação alcoólica, a fim de oferecer uma alternativa aos produtos químicos já existentes no mercado, mas sem deixar residual na levedura seca.

### **2.1. Objetivos específicos**

Foram escolhidos ésteres derivados do ácido gálico (galatos), em especial o galato de etila e o galato de propila para avaliar seu desempenho como antimicrobianos naturais em fermentações para produção do etanol.

Os galatos foram submetidos a testes de concentração inibitória mínima contra bactérias e contra leveduras para garantir que estes não sejam prejudiciais ao fermento, mas sejam eficazes contra a contaminação bacteriana.

Também foram feitos em testes fermentativos, onde foi avaliado seu desempenho tanto na diminuição da carga bacteriana (plaqueamento) e o teor de etanol gerado na fermentação.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

O processo de produção do etanol começa no plantio, colheita e moagem da cana de açúcar, resultando em um caldo rico em açúcares que é processado para obtenção cristais de sacarose (açúcar comercial). Entretanto, esse processo não é capaz de cristalizar toda a sacarose nem os demais açúcares presentes no caldo (sendo a maior parte glicose e frutose), gerando um residual que ainda possui um teor de açúcar bastante considerável que é chamado de melaço (GHORBANI, 2011).

A partir da diluição do melaço, obtêm-se o mosto, com concentração entre 15 a 20% de açúcares redutores totais (ART), que vai para a dorna já contendo a levedura, onde acontece o processo fermentativo (VIÉGAS, 2011).

Após 8 h de fermentação obtêm-se o vinho que possui um residual pequeno de açúcares, um alto teor de etanol e a massa de leveduras. Todo este conteúdo é centrifugado e a massa de leveduras volta para cuba onde ela é tratada com ácido sulfúrico e antimicrobianos para ser novamente utilizada em outro ciclo fermentativo (SOUZA LIBERAL, 2005).

O vinho centrifugado é enviado para destilaria para obtenção de etanol, gerando como subproduto a vinhaça que é despejada na lavoura no processo de fertirrigação por conta de seu alto teor de água. Em geral, são produzidos 13L de vinhaça para cada litro de etanol. (VIÉGAS, 2011).

Ao longo dos ciclos fermentativos há um aumento na massa celular de leveduras devido à sua reprodução. Esse excedente é retirado do processo e vai para sua secagem e comercialização como ração animal em função do seu alto teor de proteínas, vitaminas e aminoácidos. (ARAUJO, 2006).

A contaminação na fermentação em níveis superiores à  $10^6$  células/mL provoca extensivos danos ao processo industrial como o consumo de açúcar pelos microrganismos contaminantes (inibição competitiva) e redução do rendimento fermentativo, conforme mostra a figura 1. A atuação bacteriana gera a formação de ácidos orgânicos, aumentando a acidez do meio prejudicando a levedura, e gomas refletindo um aumento da viscosidade do caldo e conseqüentemente ligado ao entupimento nas tubulações, danos aos equipamentos como centrifugas, peneiras e trocadores de calor elevando os custos de manutenção em longo prazo (CHIEPPE JUNIOR, 2012).

As principais bactérias contaminantes são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, representando cerca de 76% da contaminação do processo fermentativo. Essas bactérias são esporulantes, catalase negativa, fermentadoras de carboidratos, produtoras de ácidos, anaeróbicas, ácido tolerantes e são do grupo Gram +. São células que podem ser bastonetes e produzem o ácido láctico como principal produto final do seu metabolismo (KRONKA, 1999).

Além dos *Lactobacillus*, outros gêneros comumente encontrados entre as bactérias contaminantes do processo são *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; SERRA et al., 1979).

Olivia-Neto (1990) analisou as espécies predominantes de contaminação bacteriana em leite de levedura sem tratamento ácido e constatou a presença de *L. fermentum* (62 %), *L. murinus* (9 %), *L. vaccinostercus* (9 %), *L. plantarum* (2 %) e *Leuconostoc* sp (2 %).

Estudos realizados por Gallo (1990) em amostras provenientes de fermentação alcoólica identificaram que 98,5% da contaminação bacteriana se mostrou Gram-positiva, 85,3% em forma de bastonetes e 73,9% eram não esporulantes; sendo os gêneros mais encontrados *Lactobacillus* (59,7%) e *Bacillus* (26,6%). Entre as espécies destacadas se encontram *B. coagulans* (15,1 %), *L. fermentum* (15,0 %), *L. helveticus* (14,1 %), *B. stearothermophilus* (6,9 %), *L. plantarum* (5,7 %), *L. animalis* (4,5 %), *L. buchneri* (3,8 %).

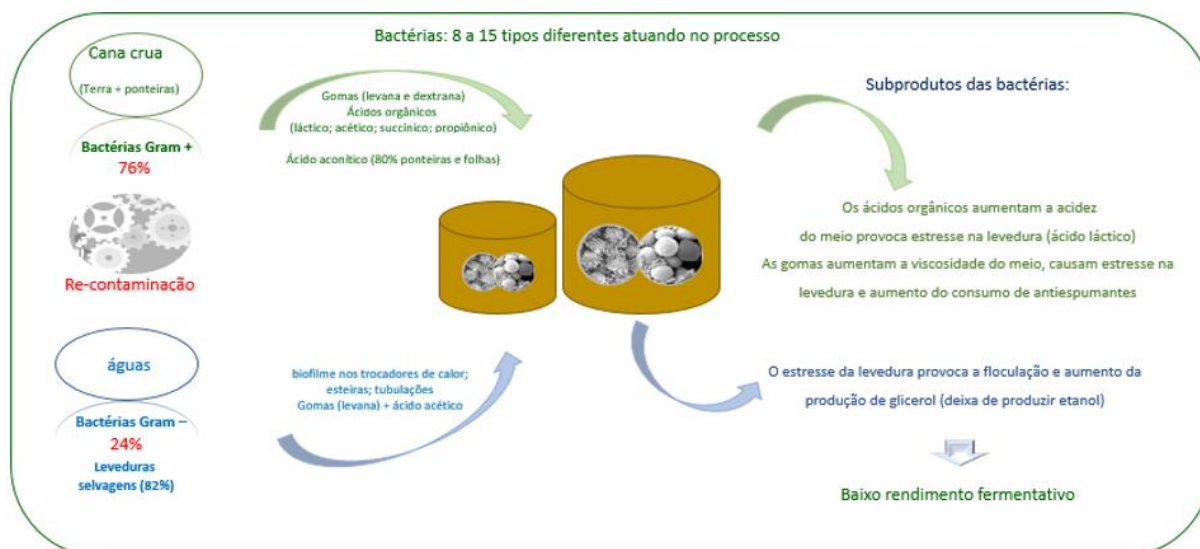
Vale destacar a presença de *Bacillus stearothermophilus* nos estudos citados pois, apesar de sua quantidade pouco expressiva, a sua resistência ao tratamento térmico é um empecilho para sua eliminação. (CHERUBIN, 2003).

Outro destaque vai para o gênero *Leuconostoc* que é o responsável pela conversão de sacarose em gomas (dextrana e levana) que, como mencionado anteriormente, provocam danos à aparelhagem usada no processo fermentativo (LEATHERS; BISCHOFF, 2011).

Algumas cepas de *Lactobacillus fermentum* são capazes de provocar a floculação de leveduras aderindo-se a elas, diminuindo assim a eficiência fermentativa dessas leveduras. (MAIA, 2019).

A figura 1 sumariza a contaminação do processo fermentativo industrial e traz também as principais consequências que essa contaminação promove.

Figura 1-representação da contaminação no processo de produção do etanol



Fonte: autoria própria

Pode-se observar pelos trabalhos citados e pelo acompanhamento das usinas no dia a dia que apesar de a contaminação bacteriana ser formada, em sua grande maioria, pelos mesmos gêneros e espécies, a influência dos antimicrobianos usados e as variações climáticas, de nutrientes do solo, entre outras intempéries, acarretam uma contínua variação nessa contaminação bacteriana, alterando as proporções dessa microbiota e introduzindo e retirando alguns casos de menor expressão.

O ácido láctico, subproduto dessas bactérias, causa um estresse na levedura provocando sua flocculação e também aumenta a acidez do meio que pode favorecer a seleção de leveduras selvagens (leveduras não selecionadas) (NOBRE, 2005). Vale destacar que essas contaminações por ácidos orgânicos podem provocar uma diminuição da viabilidade celular (morte das leveduras), o que causa uma diminuição do rendimento fermentativo.

As leveduras consideradas selvagens são aquelas que vêm como contaminantes no caldo de cana e em geral são não *Saccharomyces cerevisiae* (mas podem ser *Saccharomyces cerevisiae* selvagens). Estas são altamente competitivas no processo e podem dominar dentro da população de leveduras presentes no reator de fermentação (dorna) prejudicando o rendimento fermentativo, por não possuírem a mesma eficiência da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (ANTONINI, 2004).

Como mencionado anteriormente, a carga microbiana contaminante do processo fermentativo é proveniente do solo e entra no processo através do caldo

de cana. Isso ocorre devido à falta de esterilização do mosto e equipamentos que é impossibilitada devido ao alto volume processado nas usinas (na faixa dos milhões de toneladas). (KRONKA, 1999).

A maior consequência da contaminação no processo é a floculação da levedura que provocada por uma alteração na sua parede celular aliada a outros fatores como acidez (gerada pelo principalmente pelo ácido láctico), pH, teor de cálcio (proveniente da caleação do caldo). Essa floculação da levedura desfavorece a atuação dos antimicrobianos, fazendo com que a carga bacteriana contaminante do processo seja aumentada a cada reciclo do fermento (SATO, 2001). Além de diminuir a eficiência do processo, reduzindo a velocidade da fermentação, ocasionando aumento do fundo da dorna, entupimentos de tubulações e diminuindo a eficiência da centrífuga. Esse quadro de contaminação progressiva também acarreta um aumento no consumo de insumos do processo (antimicrobianos e antiespumantes) (CHERUBIM, 2003).

É fundamental para as usinas o combate a essa contaminação e para isso têm sido usados diferentes tipos de compostos químicos sintéticos, sendo o principal deles o ácido sulfúrico. Além dele, tem sido usados compostos de quaternário de amônia e cloro para desinfecção dos equipamentos e antibióticos na fermentação. Os principais usados são os produtos à base de penicilina, monensina e oxidantes (dióxido de cloro). (BREGAGNOLI, 2006).

O maior problema associado ao uso contínuo desses produtos é a resistência criada pelos microrganismos contra sua ação, bem como residuais deixados por eles na massa de leveduras e no meio ambiente. (MENEHIN, 2008). Residuais de antibióticos são impeditivos na comercialização da levedura seca. (PAULUS, 2013).

Atualmente o dióxido de cloro tem sido muito utilizado pelas usinas como um antimicrobiano devido as suas propriedades bactericidas e fungicidas, baixo custo e ainda não deixa resíduos impeditivos na levedura seca, porém sua concentração ideal para ter ação bactericida é a mesma concentração na qual também é prejudicial a levedura. Além disso, ocorre uma bioacumulação do residual de cloro ao longo do processo (como os trihalometanos, fenóis clorados e dioxinas, por exemplo). Esse aumento na concentração de cloro ao longo dos ciclos gera um efeito prejudicial ao metabolismo da levedura. (CAETANO, 2011).

Há uma procura cada vez maior por antimicrobianos naturais por não apresentarem resíduos na levedura seca que impeçam a sua comercialização.

(LIMAYEM, 2011). Existem diversos produtos sendo usados pelas usinas como antimicrobianos naturais, sendo a maioria deles derivados do lúpulo. No entanto, além do seu custo impeditivo, sua atividade bactericida não contempla todo o espectro da contaminação do processo fermentativo. (LEITE, 2013).

Em geral, os antibióticos naturais são constituídos por misturas complexas de compostos, sendo os principais deles o carvacrol e o timol, entre outros óleos essenciais. O que confere a esses produtos sua capacidade antimicrobiana é sua atividade antioxidante. (VIÉGAS, 2011).

Estudos sobre uso de antimicrobianos naturais no controle bacteriano no processo de fermentação alcoólica mostraram que o  $\beta$ -ácido (lúpulo) foi eficaz nesse controle na concentração de 10ppm (10 mg.L<sup>-1</sup>), ao passo que um óleo puro extraído de *Mentha piperita L.* e um derivado de extrato cítrico não se mostraram eficientes nas concentrações testadas (FREITAS; ROMANO, 2014).

Prado (2014) comparou o desempenho de antimicrobianos a base de lúpulo com outros antimicrobianos convencionais já consolidados no mercado, mostrando resultados onde o lúpulo os iguala ou supera, sendo eficaz em dosagens a partir de 5 a 10 ppm.

Leite (2011) estudou a aplicação de um antimicrobiano a base de lúpulo já presente no mercado e este se mostrou eficaz no controle bacteriano na fermentação alcoólica na concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup>.

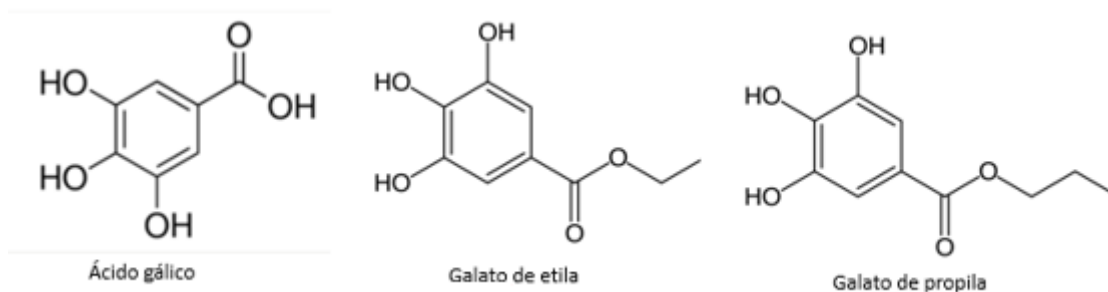
Kronka (2021) avaliou a aplicabilidade de Chalcona e derivações do ácido protocatecuico, concluindo que há possibilidade de aplicação desses mediante um estudo de caso.

### **3.1. Ácido gálico e seus derivados (galatos)**

O ácido gálico (figura 2), assim como outros fenóis, e seus derivados são conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e antimutagênicas, e já vêm sendo estudados e aplicados em setores como o farmacêutico, alimentício e cosmético (BARBOSA, 2010). Em específico, existem vários estudos sobre epigalocatequina galato como um antioxidante natural que também possui efeitos terapêuticos auxiliando no tratamento de doenças como

diabetes, doenças cardiovasculares e dislipidemias, além de fazer parte de tratamentos de obesidade (TIPOE, 2010).

Figura 2- Fórmula estrutural do ácido gálico e seus derivados



Fonte: autoria própria

Em relação à obtenção do ácido gálico, o mesmo pode ser encontrado em diversas plantas herbais (orégano, manjerona, sálvia), frutas cítricas, chás, vegetais (beringela, chicória) e, em maiores concentrações, em castanhas e cravo. Na natureza, ele é encontrado principalmente na forma de tanino, em específico os taninos hidrolisáveis, uma vez que estes são polímeros cuja unidade base é o ácido gálico.

As moléculas com atividade antimicrobiana escolhidas como alvo de estudo são os n-alkil-ésteres derivados do ácido gálico, denominados galatos. Elas são produzidas a partir de uma reação de esterificação do ácido gálico com álcoois que serão os provedores do grupo alquil para a formação do éster.

Visando atender a esta necessidade de controle dos contaminantes do processo fermentativo industrial, o presente trabalho se faz importante, pois busca alternativas para combater o amplo espectro de bactérias contaminantes no processo de produção de etanol, maximizando o rendimento, e com um custo competitivo no mercado.

### 3.2. Residuais impeditivos na levedura seca

Atualmente não existem portarias ou normativas nacionais que ditem quais residuais são impeditivos na comercialização da levedura seca para sua utilização como ração animal. Apenas uma empresa multinacional, a Alltech, utiliza de levedura seca para produção de ração animal, sendo ela mesma a responsável pelo

controle de quais produtos ou princípios ativos podem ou não estar presentes na massa de leveduras (seja o creme de leveduras fornecido pela usina ou a levedura já seca). Em pesquisas internas realizadas pela empresa Al Sukkar (de cunho confidencial para ser disponibilizadas na íntegra), foi possível observar que produtos a base de monensina, virginiamicina, penicilina, tetraciclina e sais quaternários de amônio tendem a ser barrados ao passo que extratos de lúpulo, extratos cítricos, carvacrol, timol e dióxido de cloro são geralmente permitidos.

## **4. MATERIAIS E METODOLOGIA**

Este experimento foi realizado no laboratório de análises da Al Sukkar Biotecnologia Agroindustrial localizado na cidade de Ribeirão Preto/ SP.

### **4.1. Preparo das soluções utilizadas**

As soluções de galatos foram preparadas diluindo a massa utilizada no preparo da solução em um volume de etanol equivalente à metade do tamanho do balão volumétrico utilizado e, após sua completa dissolução, o volume foi completado até o menisco com água ultrapurificada tipo 1. Como estas soluções foram preparadas múltiplas vezes, sua concentração será indicada em uma tabela em cada experimento.

A solução do antibiótico comercial Kamoran foi preparada pesando 0,01 g e diluída em 100 mL de água da qual 5 mL foi adicionado no erlenmeyer da fermentação, deixando-o na concentração final de 5 mg. L<sup>-1</sup>.

O mosto utilizado foi preparado a partir da diluição de uma amostra de melão fornecida por usinas parceiras. Assim, esse mosto não precisou ser contaminado artificialmente, uma vez que já possuía uma contaminação natural como ocorre na usina. No preparo do mosto, o melão foi diluído até a concentração de 20° Brix medida em um refratômetro manual.

#### **4.1.1. Os galatos utilizados**

A primeira batelada de galatos foi fornecida pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini do IBILCE da UNESP de São José do Rio Preto. Como o volume fornecido de cada galato era pequeno, eles foram suficientes para apenas um teste de concentração inibitória mínima. A tabela 3 mostra os galatos fornecidos, com a sua respectiva sigla que aparece na tabela 4 junto aos resultados do teste CIM.

Tabela 3- Nomenclatura dos galatos

| Sigla utilizada na tabela 4 | Nomenclatura do galato |
|-----------------------------|------------------------|
| G2                          | galato de etila        |
| G4                          | galato de butila       |
| G5                          | galato de pentila      |
| G6                          | galato de hexila       |
| G14                         | galato de tetradecila  |
| G15                         | galato de pentadecila  |
| G18                         | galato de octadecila   |
| G19                         | galato de nonadecila   |
| G20                         | galato de eicosila     |
| G23                         | galato de tricosila    |
| G25                         | galato de pentacosila  |

Fonte: autoria própria

Dado o resultado do teste CIM, foram selecionados o galato de etila (G2) e o galato de propila (G3) para prosseguir com os demais ensaios. Os critérios utilizados foram o desempenho neste teste CIM (tabela 4), disponibilidade dos fornecedores, tempo de entrega e o orçamento fornecido pela empresa Al Sukkar. O galato de etila foi adquirido da Sigma-Aldrich com pureza  $\geq 96,0\%$  (cas n° 831-61-8) (Lot # BCCB8351) e o galato de propila também da Sigma-Aldrich com pureza  $\geq 98,0\%$  (cas n° 121-79-9) (Lot # MKCF6005).

#### 4.2. Testes de concentração inibitória mínima (CIM).

##### a) Preparo do inóculo para o teste CIM:

Os ensaios de sensibilidade foram realizados de acordo com o LSI, Clinical and Laboratory Standards Institute com adaptações segundo Felmingham; Farrelle (2006). Foram preparadas suspensões de cultura de pool de bactérias de usinas de açúcar e álcool, e diluídas em solução salina 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>) para bactérias e  $2,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para levedura. A disposição dos controles de crescimento e controles negativos também foi idêntica. Para o controle da metodologia foram utilizados pool de bactérias de usinas e os antimicrobianos para controle da CIM conforme objetivo do estudo e descrito no Item 4.1. As placas foram incubadas a 37°C por um período total de 48h horas para as

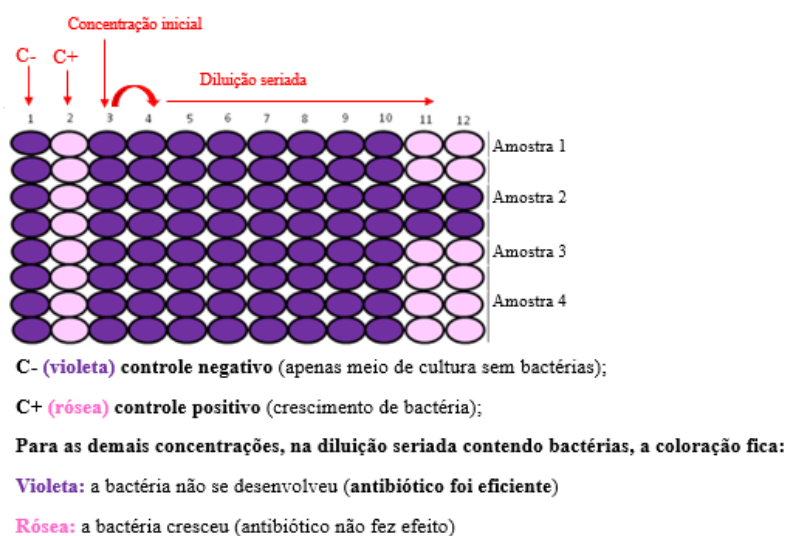
bactérias e 72h para as leveduras a 33°C. As leituras visuais foram realizadas utilizando o corante de viabilidade resazurina.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante azul dependente do pH que funciona como um indicador de oxirredução, onde ela pode ser reduzida a resorufina de coloração rosa (BUENO, et al, 2002). É a atividade dos microrganismos presentes que é responsável pela redução do pH do meio, promovendo a conversão da resazurina para resofurina, logo a coloração final do poço está associada à atividade microbiana ali presente, ou seja, quanto menos atividade microbiana, menos alteração de pH e menos a resazurina é reduzida, portanto a cor permanece azul, indicando que o antimicrobiano testado é eficiente contra aquela microbiota. De modo similar, se a coloração muda para rosa é um sinal de que a resazurina foi reduzida, sendo um indicativo que a microbiota presente se proliferou, diminuindo o pH do meio, logo o antimicrobiano testado não fez efeito.

b) Determinação da concentração inibitória mínima (CIM):

Utilizando as microplacas de 96 poços e fundo chato para determinação da CIM, para cada poço foi realizado um subcultivo transferindo-se com auxílio de uma pipeta cerca de 100µL de BHI caldo (para bactérias) e YEPD (Yeast Extract Peptona Dextrose) para leveduras e foram colocados em cada poço, exceto os poços da coluna número 3. Em seguida 200µL do produto na concentração desejada foi colocada na coluna 3, onde a partir dessa coluna 3, 100µL foram aspirados e passados para a coluna 4 e assim seriadamente até a coluna de número 12, em seguida, após o preparo do inóculo, 100µL foram adicionados a todos os poços, exceto o da coluna número 1 pois ele é o controle negativo de contaminação do meio utilizado. As placas foram incubadas a 37°C por 24h para bactérias e 48h para as leveduras. A concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram consideradas aquelas concentrações onde houve a inibição total do crescimento observado através de turvação. A CIM foi determinada pela concentração que antecede a inibição total ou parcial do crescimento dos microrganismos testados. O esquema da análise CIM está presente na figura 3.

Figura 3- Esquema da metodologia de análise da CIM para avaliar antimicrobianos



Fonte: autoria própria.

Conforme mencionado anteriormente, a mesma metodologia representada na figura 3 foi empregada substituindo o “pool de bactérias” (provenientes do melaço da usina) por um de leveduras do gênero *Saccharomyces*. Além disso, nos ensaios quando não houve crescimento dos microrganismos, a coloração foi azul no lugar da violeta presente no esquema.

### 4.3. Ensaios fermentativos

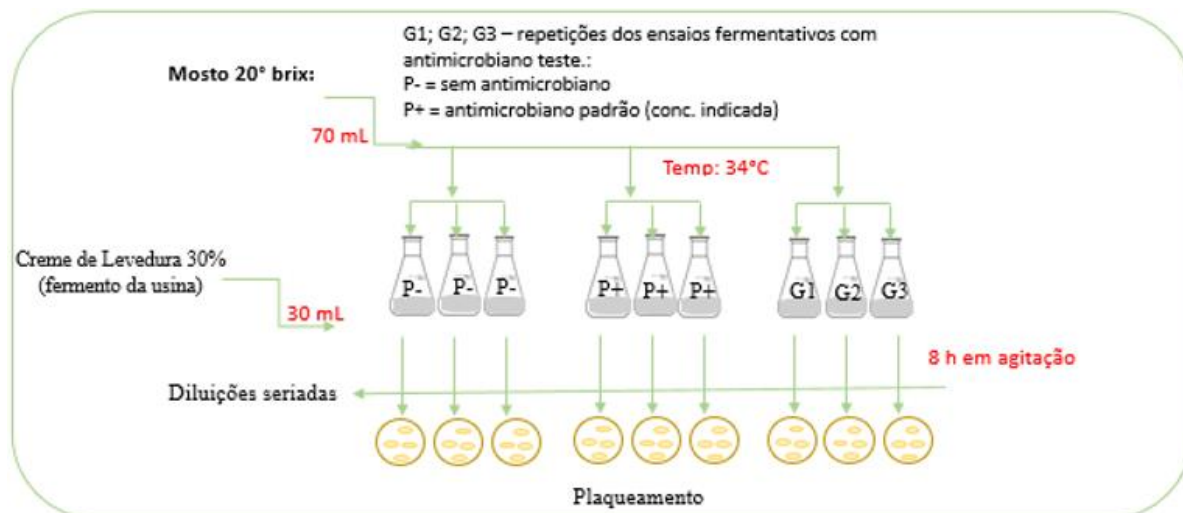
Os ensaios foram realizados em fermentações em erlenmeyers de 250 mL, conforme mostra a figura 4, com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana do produto sobre os contaminantes da fermentação alcoólica industrial na usina.

A levedura usada nos dois primeiros ensaios fermentativos foi retirada do fermento da usina da região de Pontal/SP. A levedura utilizada no terceiro ensaio fermentativo foi retirada do fermento de uma usina na região de Pitangueiras/SP.

Para fazer o creme de levedura 30%, foram pesadas 30 g deste fermento e diluídos em 100 mL de água. Este creme de levedura foi acertado o pH a 2,4 com ácido sulfúrico.

As bactérias utilizadas nos ensaios fermentativos, chamados de “pool de bactérias” eram provenientes da contaminação natural do melaço da mesma usina que proveu o fermento. A figura 4 mostra um diagrama de como foram realizados os ensaios fermentativos.

Figura 4- Diagrama dos ensaios fermentativos em erlenmeyer para avaliação dos antimicrobianos



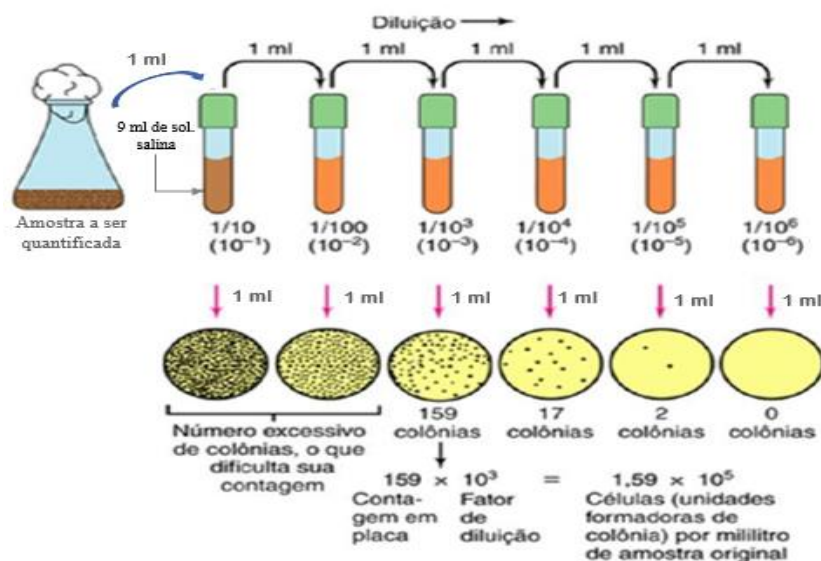
Fonte: autoria própria

#### 4.3.1. Inoculação dos ensaios fermentativos

Após 8 h de fermentação, foi retirado 1 mL de cada erlenmeyer e realizadas diluições seriadas com solução salina para fazer o plaqueamento conforme ilustra a figura 5, a fim de se avaliar a eficiência do produto nas concentrações testadas. A contagem das colônias foi realizada como mostra a equação 1.

A inoculação foi realizada pipetando 100  $\mu$ L na placa contendo meio BHI agar e espalhando com alça de drigalski descartáveis até a completa absorção do inóculo.

Figura 5- diluições seriadas utilizadas para plaqueamento spread plate.



Fonte: Al Sukkar.

$n^\circ$  colônias na placa . índice de diluição da amostra =  $n^\circ$  de bactérias/mL

Equação 1- Contagem de colônias na placa.

#### 4.3.2. Ensaios com reciclo de fermento

Nessa etapa, foram realizados 4 ciclos fermentativos (com cada amostra em triplicata) seguindo a mesma metodologia esquematizada na figura 4, sendo os 3 primeiros ciclos (1°, 2° e 3°) de 8 horas de fermentação e o último ciclo (4°) com 24 horas de duração. Ao fim de cada ciclo, o vinho era separado da massa de levedura que, por sua vez, ficavam no erlenmeyer onde novos 70mL de mosto eram adicionados para o ciclo seguinte, seguindo todos os parâmetros, conforme os ciclos fermentativos que ocorre na usina.

#### 4.4. Viabilidade celular das leveduras

A solução estoque do corante Cristal de Violeta foi preparada pela solubilização de uma massa do reagente em água deionizada, utilizando o agitador magnético para certificar que todo conteúdo fosse dissolvido, a fim de se obter uma concentração de 0,05% m/v (500 mg L<sup>-1</sup>). Essa solução foi então armazenada para

que a partir dela fossem feitas as diluições necessárias ao experimento, onde primeiramente é feita uma diluição contendo 1 mL da amostra com 19 mL de água destilada, e 1 mL dessa diluição é utilizada juntamente com 1 mL da solução de cristal de violeta, onde posteriormente, a amostra é inoculada em câmara de Neubauer.

#### **4.4.1. Cálculo da viabilidade celular das leveduras**

O cálculo da viabilidade celular de leveduras foi realizado conforme descreve a equação 2:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Total de Célula Vivas}}{(\text{Células vivas} + \text{Células Mortas})} * 100$$

Equação 2- Cálculo da viabilidade celular, em percentagem.

#### **4.5. Análises por HPLC.**

Foram realizadas análises de açúcares redutores totais (ART) do mosto, açúcares redutores residuais totais (ARRT) e teor de etanol dos vinhos geradas nos ensaios fermentativos. Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca PerkinElmer com detector de índice de refração (IR) e coluna aminex da marca Biorad. Utilizou-se uma fase móvel de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na concentração de 5mM, um fluxo de 0,6 mL/min, temperatura do forno e do detector de 40°C.

As amostras de mosto foram diluídas em um fator de 1:100 e as de vinho foram diluídas em um fator de 1:10. Ambas foram filtradas em filtros de seringa de PES (Polietersulfona) de 0,22 micrômetros antes de sua injeção no equipamento.

##### **4.5.1. Cálculos de ART e ARRT em mg.L<sup>-1</sup> e em percentual.**

Os cálculos de ART (para amostras de mosto) e de ARRT (para amostras de vinho) são realizados da seguinte forma.

$$\text{ART ou ARRT (mg. L}^{-}\text{)} = \text{Sacarose (mg. L}^{-}\text{)} + \text{Frutose (mg. L}^{-}\text{)} + \text{Glicose (mg. L}^{-}\text{)}$$

Equação 3- Cálculo do ART ou ARRT em miligramas por litro

$$\text{ART ou ARRT (\%)} = \frac{\text{Sacarose (mg. L}^{-}\text{)} + \text{Frutose (mg. L}^{-}\text{)} + \text{Glicose (mg. L}^{-}\text{)}}{10.000}$$

Equação 4- Cálculo do ART ou ARRT em percentagem.

#### 4.5.2. Cálculo da eficiência antimicrobiana

$$\text{atenuação antimicrobiana (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{CB testada } \left( \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) \cdot 100}{\text{CB controle negativo } \left( \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right)} \right)$$

Equação 5- Cálculo da atenuação antimicrobiana em percentagem

Onde CB é a contagem de colônias de bactérias no plaqueamento conforme figura 5.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Concentração inibitória mínima

Os resultados do teste CIM dos galatos enviados pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini são mostrados na tabela 4.

Tabela 4- Resultados do teste CIM dos galatos fornecidos pelo Prof. Dr. Luis Octávio Regasini.

|  | G2   | G4   | G5  | G6  | G14  | G15 | G18  | G19  | G20  | G23 | G25      |
|--|------|------|-----|-----|------|-----|------|------|------|-----|----------|
| Concentração inicial (mg.L <sup>-1</sup> ) | 1000 | 350  | 190 | 630 | 1000 | 540 | 440  | 1000 | 1410 | 100 | 1000     |
| CBM (mg.L <sup>-1</sup> )                  | 15,6 | 31,5 | 15  | 31  | 125  | 250 | 15,6 | 62   | 250  | 25  | 250      |
| CFM (mg.L <sup>-1</sup> )                  | 500  | 250  | 50  | 500 | 500  | 540 | 440  | 500  | 250  | 25  | não ação |

Fonte: autoria própria

Como o volume de amostra enviado pelo professor foi suficiente apenas para a realização do teste CIM, esse teste serviu de base para selecionar os galatos estudados mais profundamente neste trabalho. Conforme mencionado no item 4.1.1. os critérios utilizados foram o desempenho neste teste CIM (tabela 4), disponibilidade dos fornecedores, tempo de entrega e o orçamento fornecido pela empresa Al Sukkar.

Os galatos selecionados para estudo foram o galato de etila (G2) e o galato de propila (G3) e foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Apesar de não constar na tabela, o galato de propila foi escolhido devido ao mecanismo de ação dos galatos, uma vez que já é bem estabelecido na literatura que o tamanho da cadeia alquílica dessas moléculas está diretamente relacionado à atividade biológica delas (KRATZ, et al, 2007). Apesar dessa relação nem sempre ser linear, os galatos com baixa cadeia carbônica presentes na tabela (G2 à G6) apresentaram resultados bastante similares em termos de sua concentração bactericida mínima, portanto, juntando esse fato ao fator de disponibilidade dos produtos no momento de sua aquisição o galato de propila foi selecionado.

As figuras 6 e 7 mostram as placas de teste de concentração inibitória mínima feitas para testar a eficácia do galato de etila sobre bactérias e leveduras respectivamente.

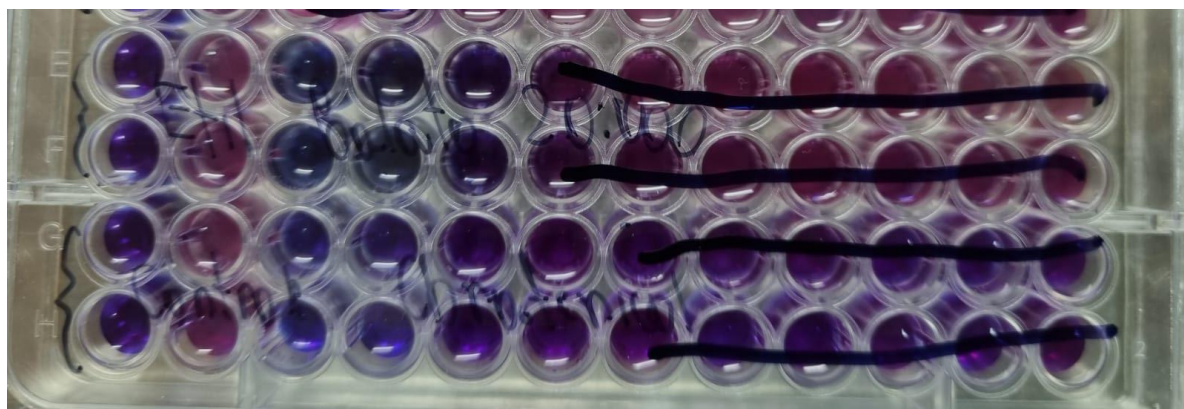
Na figura 6, as linhas “E” e “F” contem a solução de galato de etila e as linhas “G” e “H” contém uma solução de cloranfenicol usado como controle, para avaliar o efeito bactericida.

Na figura 7, as linhas “E” e “F” contem a solução de galato de propila e as linhas “G” e “H” contém uma solução de ciclohexamida usada como controle, para avaliar o efeito leveduricida.

Conforme se observa na figura 6, o galato de etila começou a apresentar uma coloração rosa a partir do sexto poço. Como a solução inicial possuía concentração de  $20.000 \text{ mg.L}^{-1}$  foi colocada no terceiro poço, pode-se afirmar que ele fez efeito até a concentração de  $5.000 \text{ mg.L}^{-1}$  considerando a diluição seriada. Ou seja, até a concentração de  $5.000 \text{ mg.L}^{-1}$  ele possui ação bactericida.

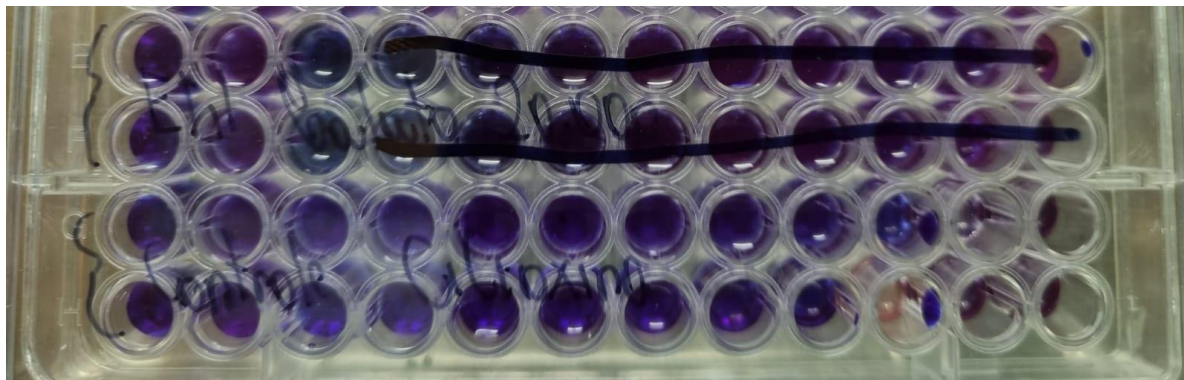
Já na figura 7 mostra que para concentrações acima de  $20.000 \text{ mg.L}^{-1}$  o galato de etila possui ação contra leveduras.

Figura 6- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de etila sobre o “pool de bactérias”.



Fonte: autoria própria.

Figura 7- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de etila sobre o “pool de leveduras”.

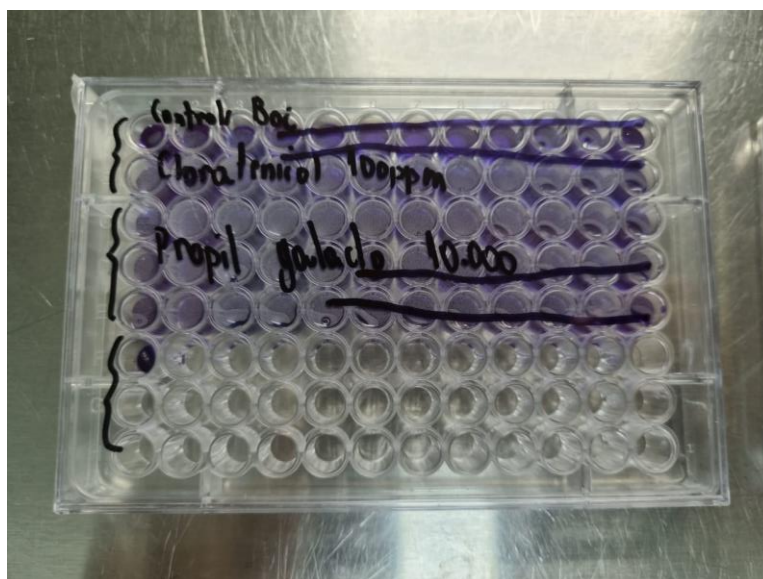


Fonte: autoria própria.

As figuras 8 e 9 mostram as placas de teste de concentração inibitória mínima (CIM) feitas para testar a eficácia do galato de propila sobre bactérias e leveduras respectivamente.

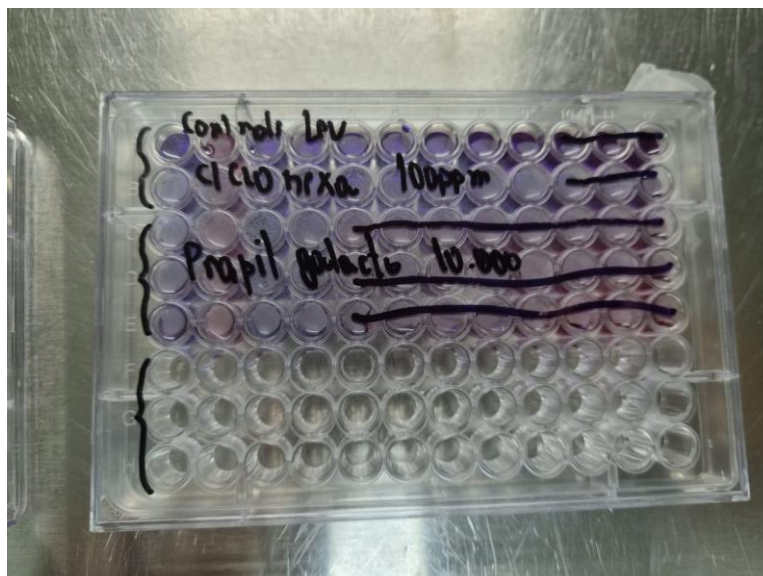
Empregando o mesmo raciocínio das figuras 6 e 7 para as figuras 8 e 9, nota-se que o galato de propila possui concentração inibitória mínima de 10.000 mg.L<sup>-1</sup> para sua ação bactericida, mas a partir dessa mesma concentração ele também passa a ter ação sobre as leveduras.

Figura 8- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de propila sobre o “pool de bactérias”.



Fonte: autoria própria

Figura 9- Fotografia da placa de teste CIM para avaliar a atividade do galato de propila sobre o “pool de leveduras”.



Fonte: autoria própria

A tabela 5 sintetiza os resultados obtidos pela análise crítica dos testes CIM realizados para o galato de etila e o galato de propila.

Tabela 5- Resultados do segundo teste CIM.

| Antimicrobiano         | Concentração mínima bactericida (mg.L <sup>-1</sup> ) | Ação sobre leveduras |
|------------------------|---|----------------------|
| Galato de etila        | 5.000   | Sem ação             |
| Galato de propila      | 10.000  | Com ação             |
| Cloranfenicol (padrão) | 200   | Sem ação             |

Fonte: autoria própria

Vale ressaltar que ambos galatos apresentaram uma concentração inibitória mínima muito maior do que a de um antimicrobiano químico (como a do cloranfenicol que foi utilizado como controle positivo) isso torna o seu custo impeditivo quando empregado em larga escala como é o caso de uma usina.

Como mencionado anteriormente, a quantidade de gêneros e espécies bacterianas no processo fermentativo industrial é consideravelmente grande e somado ao fato de que a proporção desses microrganismos contaminantes pode

mudar de acordo com condições climáticas, do solo, de acordo com a pressão seletiva que ocorre devido ao uso de antimicrobianos no processo, o antimicrobiano empregado deve se mostrar eficaz diante de um amplo espectro de bactérias.

Por isso, apenas o teste CIM não é suficiente para diagnosticar a eficiência de um antimicrobiano no processo, visto que, caso o antimicrobiano em questão não seja eficaz contra uma das bactérias presentes, seu resultado no teste CIM será insatisfatório.

Para contornar esse problema, foram também realizados ensaios fermentativos com os galatos, simulando a fermentação industrial, para avaliar a atividade destes produtos diante de uma fermentação utilizando-se mosto e fermento de uma usina e assim, verificar na prática o quanto eles foram capazes de reduzir a contaminação bacteriana.

## 5.2. Primeiro ensaio fermentativo.

Os ensaios foram conduzidos seguindo-se os parâmetros descritos na figura 4. Ao fim do processo fermentativo, para cada erlenmeyer onde foi realizada uma fermentação, foi realizada diluição seriada e posterior plaqueamento para contagem de colônias, a fim de se avaliar a eficiência dos antimicrobianos testados. Os resultados obtidos se encontram na tabela 6:

Tabela 6- Resultado da contagem dos plaqueamentos após os ensaios fermentativos.

| Antimicrobiano testado   | Concentração (mg.L <sup>-1</sup> ) | Média das contagens após 8h (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Desvio padrão da média das contagens |
|--------------------------|------------------------------------|---|--------------------------------------|
| C - (sem antimicrobiano) | 0                                  | 5,5x10 <sup>7</sup>                                 | 0,4x10 <sup>7</sup>                  |
| C + (cloranfenicol)      | 200                                | 2,3x10 <sup>5</sup>                                 | 0,2x10 <sup>5</sup>                  |
| Galato de etila          | 5000                               | 4,1x10 <sup>6</sup>                                 | 0,4x10 <sup>6</sup>                  |
| Galato de propila        | 10000                              | 1,9x10 <sup>6</sup>                                 | 0,7x10 <sup>6</sup>                  |

n=3

Fonte: autoria própria

Comparando a contagem bacteriana dos galatos com a contagem sem a presença de antimicrobiano, ambos foram capazes de diminuir a contaminação do

processo em uma ordem de grandeza, deixando a contaminação na ordem de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e, portanto, bem próxima ao ideal esperado por uma usina.

No entanto, apesar de o galato de propila ter apresentado uma redução ainda maior do que a do galato de etila, uma análise de viabilidade celular mostraria uma redução na massa de levedura (tabela 14), prejudicando o seguinte ciclo fermentativo, podendo eventualmente esgotar totalmente a massa de levedura após sucessivos ciclos. Isso além de sua concentração ter sido duas vezes maior, aumentando seu custo.

### 5.3. Repetição do teste CIM

Para poder avaliar melhor a influência e eficácia dos galatos testados sobre a variação periódica do “pool de bactérias”, foi feito um novo teste CIM utilizando uma nova amostra de melaço e uma nova amostra de fermento da mesma usina testada anteriormente, porém de uma data posterior.

A amostra de galato de etila se encontra nas posições marcadas com número 6 e o galato de propila nas posições marcadas com número 7 nas figuras 10 e 11. As posições marcadas na mesma figura com “cloran” possuem cloranfenicol como antimicrobiano padrão para comparação de resultados. Estes resultados são retratados na tabela 7 a seguir.

Tabela 7- Resultados do terceiro teste CIM

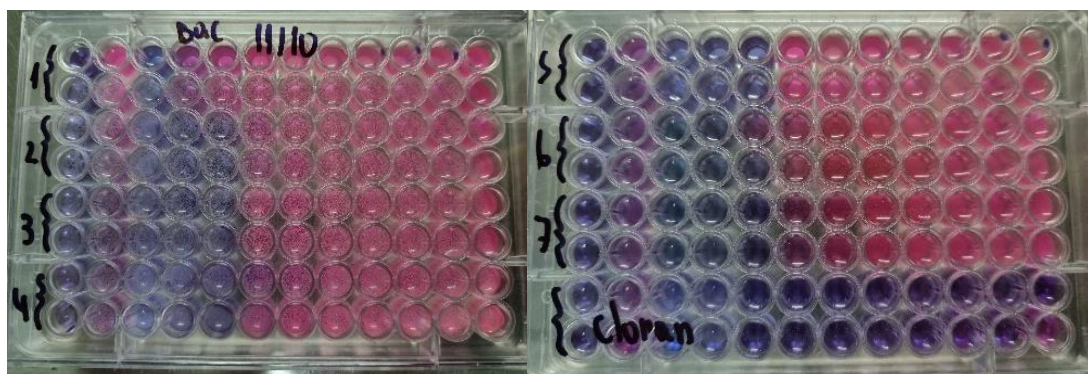
| Antimicrobiano    | Concentração inicial (mg. L <sup>-1</sup> ) | CBM (mg. L <sup>-1</sup> ) | CFM (mg. L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| Galato de etila   | 500   | 125                        | 250                        |
| Galato de propila | 500   | 125                        | 250                        |
| Cloranfenicol     | 100   | 3                          | 25                         |

Fonte: autoria própria

Nota-se que as concentrações onde os galatos foram bactericidas e fungicidas variaram drasticamente quando comparadas ao teste anterior (tabela 5). Tornando mais uma vez evidente a constante mudança no “pool de bactérias” e a importância de o antimicrobiano contemplar um amplo espectro de bactérias na sua ação.

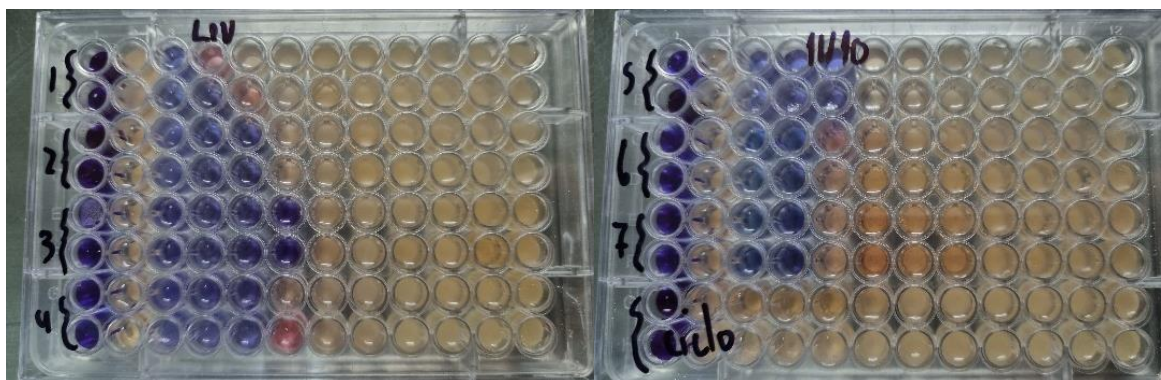
Outro ponto de destaque é a concentração na qual o galato de propila foi fungicida que, ao contrário do segundo teste anterior, foi maior que a concentração onde ele foi bactericida neste terceiro teste, favorecendo seu uso. Esse resultado implica em uma alteração nas cepas de leveduras presentes no fermento.

Figura 10- fotografia do terceiro teste CIM para ação contra bactérias



Fonte: autoria própria

Figura 11- fotografia do terceiro teste CIM para ação contra leveduras



Fonte: autoria própria

## **5.4. Ensaio fermentativos com reciclo da massa de leveduras.**

### **5.4.1. Análises de açúcares residuais na fermentação e teor de etanol gerado.**

Para esta parte do experimento foram realizados 4 ciclos de ensaios fermentativos conforme descrito no item 4.3.1. Os ciclos fermentativos de 8 horas tentam ao máximo replicar as condições normais de funcionamento das usinas, já o ciclo de 24 horas simula situações de chuva, onde os equipamentos e motores podem ser desligados e a fermentação permanece na dorna normalmente até o próximo dia quando são retomadas as bateladas de 8 horas.

O mosto que abasteceu as fermentações e as amostras de vinho geradas foram analisadas por HPLC conforme descrito no item 4.6. Os componentes analisados foram sacarose, frutose, glicose e teor de etanol. As amostras foram analisadas em triplicata e a médias dos resultados obtidos para cada ciclo com seus respectivos desvios padrão calculados se encontram nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

Foi calculado o ARRT (açúcares redutores residuais totais) de cada amostra de vinho somando o que foi encontrado de sacarose, frutose e glicose. Esse dado é bastante importante em usinas, pois se trata dos açúcares que não foram fermentados e, portanto, configuram perdas no teor de etanol total. Um dos indicadores de uma fermentação saudável é um teor de ARRT baixo (em torno de 0,05%).

Conforme mencionado anteriormente, a atividade biológica dos galatos está associada ao tamanho de sua cadeia alquílica e, por isso, nesses ensaios foi feita uma mistura dos galatos testados a fim de avaliar se os dois juntos possuem uma eficácia melhor em controlar a contaminação bacteriana do processo.

Tabela 8- Média dos resultados para o primeiro ciclo fermentativo para açúcares e etanol em HPLC (8 horas).

| Antimicrobiano    | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | Sacarose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Frutose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Glicose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | ARRT (mg.L <sup>-1</sup> ) | Teor de Etanol (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão |
|-------------------|--|--|---|---|----------------------------|--|
| Kamorán           | 5  | 283,92 ± 2,56                                  | 105,49 ± 0,42                                 | 91,52 ± 0,38                                  | 480,93                     | 3,36 ± 0,01  |
| G. Etila          | 1200                                       | 247,76 ± 1,24                                  | 86,52 ± 1,66                                  | 89,94 ± 0,62                                  | 424,22                     | 4,14 ± 0,01  |
| G. Etila          | 1500                                       | 394,72 ± 5,45                                  | 101,54 ± 1,57                                 | 88,95 ± 7,61                                  | 585,21                     | 4,75 ± 0,02  |
| G. Propila        | 1200                                       | 243,39 ± 34,43                                 | 82,53 ± 2,69                                  | 102,87 ± 4,62                                 | 428,78                     | 3,10 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1500                                       | 258,58 ± 6,25                                  | 79,16 ± 2,74                                  | 100,45 ± 6,63                                 | 438,19                     | 3,53 ± 0,01  |
| mistura galatos   | 600 cada um                                | 238,45 ± 14,89                                 | 133,50 ± 3,46                                 | 170,47 ± 1,17                                 | 542,42                     | 4,52 ± 0,02  |
| mistura galatos   | 750 cada um                                | 280,58 ± 24,61                                 | 105,16 ± 0,46                                 | 115,87 ± 3,72                                 | 501,6                      | 4,00 ± 0,01  |
| controle negativo | -  | 459,63 ± 6,22                                  | 128,79 ± 4,11                                 | 354,21 ± 2,90                                 | 942,63                     | 5,09 ± 0,01  |

Fonte: autoria própria

Tabela 9- Média dos resultados para o segundo ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (8 horas).

| Antimicrobiano    | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | Sacarose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Frutose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Glicose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | ARRT (mg.L <sup>-1</sup> ) | Teor de Etanol (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão |
|-------------------|--|--|---|---|----------------------------|--|
| Kamorán           | 5  | 666,32 ± 16,54                                 | 164,63 ± 0,13                                 | 98,44 ± 15,66                                 | 929,39                     | 6,44 ± 0,02  |
| G. Etila          | 1200                                       | 321,22 ± 3,92                                  | 142,97 ± 4,50                                 | 97,19 ± 1,06                                  | 561,38                     | 6,10 ± 0,02  |
| G. Etila          | 1500                                       | 310,63 ± 2,06                                  | 145,42 ± 2,16                                 | 138,45 ± 0,95                                 | 594,5                      | 3,71 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1200                                       | 309,71 ± 8,96                                  | 179,26 ± 2,98                                 | 109,60 ± 0,11                                 | 598,56                     | 4,44 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1500                                       | 384,45 ± 13,40                                 | 149,68 ± 2,15                                 | 245,45 ± 0,78                                 | 779,58                     | 2,08 ± 0,02  |
| mistura galatos   | 600 cada um                                | 1864,69 ± 46,85                                | 226,45 ± 4,26                                 | 140,84 ± 1,10                                 | 2233,14                    | 1,17 ± 0,01  |
| mistura galatos   | 750 cada um                                | 291,49 ± 2,58                                  | 100,44 ± 4,00                                 | 89,78 ± 0,06                                  | 481,70                     | 2,65 ± 0,01  |
| controle negativo | -  | 482,67 ± 20,54                                 | 176,58 ± 7,47                                 | 366,13 ± 7,09                                 | 1025,38                    | 1,84 ± 0,01  |

Fonte: autoria própria

Tabela 10- Média dos resultados para o terceiro ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (8 horas).

| Antimicrobiano    | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | Sacarose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Frutose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Glicose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | ARRT (mg.L <sup>-1</sup> ) | Teor de Etanol (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão |
|-------------------|--|--|---|---|----------------------------|--|
| Kamorán           | 5  | 290,48 ± 4,94                                  | 170,72 ± 2,29                                 | 184,84 ± 2,60                                 | 646,04                     | 7,17 ± 0,01  |
| G. Etila          | 1200                                       | 493,18 ± 1,83                                  | 147,67 ± 0,98                                 | 192,89 ± 1,65                                 | 833,74                     | 6,94 ± 0,01  |
| G. Etila          | 1500                                       | 446,32 ± 7,45                                  | 134,78 ± 4,22                                 | 232,78 ± 11,19                                | 813,88                     | 5,89 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1200                                       | 322,06 ± 1,32                                  | 142,85 ± 2,34                                 | 178,61 ± 0,16                                 | 643,52                     | 4,70 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1500                                       | 387,07 ± 0,32                                  | 166,93 ± 4,27                                 | 248,75 ± 6,05                                 | 802,74                     | 3,54 ± 0,01  |
| mistura galatos   | 600 cada um                                | 795,22 ± 14,85                                 | 284,61 ± 9,53                                 | 232,06 ± 1,59                                 | 1211,89                    | 4,95 ± 0,01  |
| mistura galatos   | 750 cada um                                | 292,02 ± 0,31                                  | 127,81 ± 6,01                                 | 241,60 ± 8,57                                 | 661,43                     | 2,71 ± 0,01  |
| controle negativo | -  | 569,94 ± 24,08                                 | 177,76 ± 1,33                                 | 333,51 ± 5,70                                 | 1081,21                    | 3,81 ± 0,01  |

Fonte: autoria própria

Tabela 11- Média dos resultados para o quarto ciclo fermentativo para açúcares e etanol feitos em HPLC (24 horas).

| Antimicrobiano    | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | Sacarose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Frutose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | Glicose (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão | ARRT (mg.L <sup>-1</sup> ) | Teor de Etanol (mg.L <sup>-1</sup> ) ± desvio padrão |
|-------------------|--|--|---|---|----------------------------|--|
| Kamorán           | 5  | 169,20 ± 4,46                                  | 158,66 ± 2,77                                 | 227,11 ± 9,74                                 | 554,96                     | 8,95 ± 0,01  |
| G. Etila          | 1200                                       | 223,92 ± 14,04                                 | 164,08 ± 7,81                                 | 195,67 ± 2,92                                 | 583,67                     | 8,64 ± 0,02  |
| G. Etila          | 1500                                       | 235,77 ± 8,90                                  | 55,13 ± 7,25                                  | 217,93 ± 11,58                                | 508,82                     | 8,00 ± 0,02  |
| G. Propila        | 1200                                       | 214,42 ± 4,63                                  | 146,42 ± 5,22                                 | 106,20 ± 2,04                                 | 367,03                     | 7,62 ± 0,01  |
| G. Propila        | 1500                                       | 172,33 ± 11,03                                 | 208,25 ± 0,61                                 | 120,54 ± 0,71                                 | 501,12                     | 6,75 ± 0,04  |
| mistura galatos   | 600 cada um                                | 97,74 ± 0,07                                   | 232,39 ± 1,09                                 | 443,53 ± 0,76                                 | 773,66                     | 6,24 ± 0,03  |
| mistura galatos   | 750 cada um                                | 146,21 ± 6,92                                  | 168,77 ± 1,32                                 | 170,73 ± 9,37                                 | 485,71                     | 7,29 ± 0,01  |
| controle negativo | -  | 358,85 ± 9,86                                  | 181,44 ± 17,80                                | 248,42 ± 11,44                                | 788,71                     | 7,53 ± 0,03  |

Fonte: autoria própria

Tabela 12- Avaliação da atividade da levedura (teor alcoólico) e as perdas de açúcares nos ciclos fermentativos. Resultados é a média de 3 repetições. Os ciclos fermentativos 1°, 2° e 3° foram de 8 h e o 4° ciclo foi de 24 h de fermentação.

|                       | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | 1º ciclo |               | 2º ciclo |               | 3º ciclo |               | 4º ciclo |               |
|-----------------------|--|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|
|                       |  | ARRT %   | teor etanol % | ARRT %   | teor etanol % | ARRT %   | teor etanol % | ARRT %   | teor etanol % |
| Kamorán               | 5  | 0,048    | 3,36          | 0,093    | 6,44          | 0,065    | 7,17          | 0,055    | 8,95          |
| G. Etila              | 1200                                       | 0,042    | 4,14          | 0,056    | 6,1           | 0,083    | 6,94          | 0,058    | 8,64          |
| G. Etila              | 1500                                       | 0,059    | 4,75          | 0,059    | 3,71          | 0,081    | 5,89          | 0,051    | 8,00          |
| G. Propila            | 1200                                       | 0,043    | 3,10          | 0,060    | 4,44          | 0,064    | 4,70          | 0,047    | 7,62          |
| G. Propila            | 1500                                       | 0,044    | 3,53          | 0,078    | 2,08          | 0,080    | 3,54          | 0,050    | 6,75          |
| G. Etila + G. Propila | 600 cada um                                | 0,054    | 4,50          | 0,223    | 1,17          | 0,121    | 4,95          | 0,077    | 6,24          |
| G. Etila + G. Propila | 750 cada um                                | 0,050    | 4,00          | 0,048    | 2,65          | 0,066    | 2,71          | 0,049    | 7,29          |
| Controle negativo     | -  | 0,094    | 5,09          | 0,103    | 1,84          | 0,108    | 3,81          | 0,079    | 7,53          |

Fonte: autoria própria

Para melhor comparação dos resultados, o ARRT (transformado em percentual por ser o modo mais usual de esse dado ser tratado nas usinas) e o teor de etanol de cada ciclo foram agrupados em uma única tabela, a tabela 12. O ART do mosto usado nos ensaios foi 12,43 %.

O teor de etanol indica a produtividade da levedura, ou seja, o rendimento fermentativo e em geral ele deve ser acima da metade do ART do mosto.

Outro ponto importante é que nos ensaios fermentativos, foi usado como antimicrobiano padrão, o kamoran, que é um produto à base de monensina, que é largamente usado nas usinas.

Por mais que o ARRT seja um parâmetro muito importante na avaliação de rendimento de um processo fermentativo, o principal fator ainda é o teor de etanol, visto que ele é o produto a ser vendido no final de todo o processo.

Comparando o teor de etanol das amostras na tabela 12, nota-se que o galato de etila forneceu resultados bastante promissores, principalmente na concentração de 1200 mg.L<sup>-1</sup>, onde seu teor de etanol alcançou valores comparáveis com os do Kamoran.

Apesar de sua concentração bastante elevada poder configurar um custo impeditivo, o galato de etila se mostrou bastante consistente ao longo dos ciclos fermentativos, sem apresentar nenhuma queda significativa no seu rendimento, o que implica que ele não está sendo prejudicial às leveduras.

O mesmo não pode ser dito para o galato de propila, que apresentou um rendimento bastante inferior ao longo dos ciclos e é importante destacar que até o terceiro ciclo onde o tempo de fermentação era o mesmo, ele foi diminuindo seu rendimento a cada ciclo. Isso implica que esse galato está sendo prejudicial às leveduras ao longo dos ciclos.

A mistura dos dois galatos também não apresentou um bom rendimento. Ao juntar esse fato com o rendimento dos dois galatos separadamente, é possível concluir que o galato de propila foi prejudicial ao desempenho do galato de etila.

Analisando separadamente o 4º ciclo fermentativo, que durou 24 horas, o galato de etila também performou acima dos demais, tendo um teor de etanol comparável com a do Kamoran.

#### 5.4.2. Plaqueamento das amostras de vinho e viabilidade celular de leveduras.

Foi realizado plaqueamento nas amostras de vinho após cada ciclo fermentativo e, a partir disso, foi possível comparar o resultado com o controle negativo que é referente a uma fermentação sem adição de antimicrobianos a fim de avaliar o desempenho dos galatos em reduzir a concentração bacteriana do processo. Os resultados são mostrados na tabela 13.

Tabela 13- Resultados da contagem dos plaqueamentos e viabilidade celular de leveduras com os produtos usados durante os 4 ciclos fermentativos.

| Identificação do produto     | Concentração testada (mg.L <sup>-1</sup> ) | Contaminação                     | Contaminação                     | Contaminação                     | Contaminação                     |
|------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                              |  | UFC.mL <sup>-1</sup><br>1º ciclo | UFC.mL <sup>-1</sup><br>2º ciclo | UFC.mL <sup>-1</sup><br>3º ciclo | UFC.mL <sup>-1</sup><br>4º ciclo |
| <b>Controle (-)</b>          | -  | 1,6x10 <sup>8</sup>              | 9,2x10 <sup>7</sup>              | 8,8x10 <sup>7</sup>              | 8,1x10 <sup>7</sup>              |
| <b>Kamorán</b>               | 5  | 2,7x10 <sup>6</sup>              | 3,5x10 <sup>6</sup>              | 8,2x10 <sup>6</sup>              | 3,7x10 <sup>6</sup>              |
| <b>G-etila</b>               | 1200                                       | 1,4x10 <sup>7</sup>              | 1,3x10 <sup>7</sup>              | 1,4x10 <sup>7</sup>              | 1,6x10 <sup>7</sup>              |
| <b>G-etila</b>               | 1500                                       | 1,8x10 <sup>7</sup>              | 1,2x10 <sup>7</sup>              | 1,5x10 <sup>7</sup>              | 1,7x10 <sup>7</sup>              |
| <b>G-propila</b>             | 1200                                       | 4,7x10 <sup>7</sup>              | 4,3x10 <sup>7</sup>              | 2,8x10 <sup>7</sup>              | 2,6x10 <sup>7</sup>              |
| <b>G-propila</b>             | 1500                                       | 4,1x10 <sup>7</sup>              | 4,0x10 <sup>7</sup>              | 2,4x10 <sup>7</sup>              | 2,2x10 <sup>7</sup>              |
| <b>G. Etila + G. Propila</b> | 600 cada um                                | 4,2x10 <sup>7</sup>              | 3,2x10 <sup>7</sup>              | 2,5x10 <sup>7</sup>              | 3,2x10 <sup>7</sup>              |
| <b>G. Etila + G. Propila</b> | 750 cada um                                | 3,8x10 <sup>7</sup>              | 4,1x10 <sup>7</sup>              | 2,7x10 <sup>7</sup>              | 3,4x10 <sup>7</sup>              |

Fonte: autoria própria

Tabela 14- Média dos resultados dos plaqueamentos e viabilidade de leveduras com os produtos durante os 4 ciclos fermentativos.

| <b>Identificação do produto</b> | <b>Concentração testada (mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Contaminação (UFC.mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Viabilidade Levedura (%)</b> | <b>Atenuação antimicrobiana (%)</b> |
|---------------------------------|---|---|---------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Controle -</b>               | -   | 9,3x10 <sup>7</sup>                       | 79,66                           | 0                                   |
| <b>Kamorán</b>                  | 5   | 4,5x10 <sup>6</sup>                       | 78,78                           | 95,16                               |
| <b>G-etila</b>                  | 1200  | 1,4x10 <sup>7</sup>                       | 76,19                           | 84,96                               |
| <b>G-etila</b>                  | 1500  | 1,5x10 <sup>7</sup>                       | 77,80                           | 83,87                               |
| <b>G-propila</b>                | 1200  | 3,6x10 <sup>7</sup>                       | 70,01                           | 61,29                               |
| <b>G-propila</b>                | 1500  | 3,2x10 <sup>7</sup>                       | 71,43                           | 65,59                               |
| <b>Mistura</b>                  | 600/600   | 3,3x10 <sup>7</sup>                       | 69,87                           | 64,52                               |
| <b>Mistura</b>                  | 750/750   | 3,5x10 <sup>7</sup>                       | 69,87                           | 62,37                               |

Fonte: autoria própria

Um dado importante retirado da tabela 14 é a viabilidade celular do controle negativo também não é de 100%, visto que a viabilidade celular diminui ao longo dos ciclos, pois existem outros fatores que ocorrem naturalmente ao longo da fermentação que reduzem a viabilidade celular das leveduras e, por isso, ela deve ser reposta após alguns ciclos.

Também é possível observar que tanto o galato de etila nas suas duas concentrações e o Kamoran apresentaram viabilidade celular de leveduras em níveis bastante próximos ao controle negativo, mostrando-se pouco agressivos às leveduras, no entanto o Kamoran apresentou um valor ainda mais próximo do controle negativo do que o galato de etila.

O galato de propila e a mistura dos dois galatos em suas duas concentrações já se mostraram mais prejudiciais à massa de leveduras, o que corrobora com os resultados discutidos da tabela 12. Além de prejudicar a massa de leveduras, o galato de propila e mistura apresentaram, em média, um nível de contaminação duas vezes mais alto em relação aos níveis de contaminação do galato de etila.

Esses dados apontam vários impeditivos na tentativa de utilização do galato de propila em larga escala para controle de um processo fermentativo industrial.

O galato de etila, apesar comparável ao Kamoran no teste de viabilidade celular e em teor de etanol produzido na fermentação onde eles foram utilizados, não foi capaz de reduzir a contaminação bacteriana a níveis comparáveis aos do Kamoran, ou mesmo atingir níveis de contaminação de ao menos  $10^6$  como já mencionado que são considerados ideais pelas usinas.

Comparando os resultados obtidos dos galatos que foram empregados em concentrações de 1200 mg.L<sup>-1</sup> e 1500 mg.L<sup>-1</sup> com os resultados de antimicrobianos a base de lúpulo testados por outros autores, considerando como uma média a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> na qual estes foram considerados viáveis para controle do processo fermentativo (presentes na seção 3 deste trabalho), é possível observar que os resultados dos galatos ainda estão muito elevados em relação a outros antimicrobianos naturais já estabelecidos no mercado.

### **5.5. Novo ensaio fermentativo com mosto e fermento de outra usina**

Foi realizado um novo ensaio fermentativo para avaliar a eficácia dos antimicrobianos mediante as condições fermentativas de uma usina na região de Guaíra/ SP.

A tabela 15 mostra a média da triplicata de análises com seu respectivo desvio padrão. Nela foi possível observar que nessa microbiota o Kamoran se mostrou bem mais eficaz que os galatos estudados. O mosto utilizado nesses ensaios possuía um ART de 13,24%.

Tabela 15- Resultados de HPLC para ensaio fermentativo com melão e fermento de uma usina de outra região.

| Antimicrobiano    | Concentração testada (mg.L-) | Sacarose (mg.L-) ± desvio padrão | Frutose (mg.L-) ± desvio padrão | Glicose (mg.L-) ± desvio padrão | ARRT (mg.L-) | Teor de Etanol (mg.L-) ± desvio padrão |
|-------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|--|
| Kamorán           | 5                            | 538,26 ± 2,27                    | 135,41 ± 0,08                   | 268,74 ± 6,06                   | 942,4        | 9,52 ± 0,03                            |
| G. Etila          | 1200                         | 447,88 ± 7,01                    | 123,24 ± 10,32                  | 347,13 ± 7,88                   | 918,25       | 7,43 ± 0,01                            |
| G. Etila          | 1500                         | 522,23 ± 2,06                    | 157,83 ± 4,88                   | 420,74 ± 6,41                   | 1100,79      | 6,10 ± 0,01                            |
| G. Propila        | 1200                         | 772,02 ± 3,17                    | 104,90 ± 9,04                   | 382,85 ± 15,93                  | 1359,76      | 5,85 ± 0,04                            |
| G. Propila        | 1500                         | 828,98 ± 12,79                   | 131,82 ± 3,67                   | 282,51 ± 3,09                   | 1243,3       | 6,89 ± 0,01                            |
| Controle negativo | -                            | 2864,18 ± 28,38                  | 131,19 ± 1,56                   | 43857,18 ± 64,37                | 46852,54     | 3,68 ± 0,01                            |

Fonte: autoria própria

No entanto, comparando os dados da tabela 15 com os da tabela 12, ainda é possível observar uma boa consistência no desempenho do galato de etila, que ainda apresentou um bom rendimento fermentativo com um teor de etanol bastante próximo do teor alcoólico teórico calculado (metade do ART do mosto).

O galato de propila, apesar de ter mostrado resultados melhores do que na fermentação da outra usina, continuou se mostrando menos eficaz que o galato de etila, mesmo com a variação no “pool de bactérias”. Além disso, seu rendimento mais baixo continua sendo evidência de que ele está tendo ação sobre as leveduras.

Neste ensaio não foi avaliado a mistura dos galatos que já havia se mostrado ineficaz em ensaios anteriores.

## 6. CONCLUSÕES

Ficou evidente pelos resultados dos ensaios a variação da microbiota da contaminação bacteriana tanto entre duas usinas diferentes quanto dentro de uma mesma usina considerando períodos diferentes. Esse cenário reforça a importância de que um antimicrobiano, para ser eficaz, seja capaz de atuar sobre um amplo espectro de bactérias presentes no processo de fermentação alcoólica industrial.

Outro fator importante observado é a importância do controle dessa contaminação bacteriana na fermentação, visto que os resultados observados nos controles negativos (sem presença de antimicrobianos) mostram uma contaminação bastante elevada e um teor de etanol gerado baixo.

O galato de propila não apresentou resultados favoráveis ao seu uso em larga escala como descontaminante do processo fermentativo, não promovendo uma redução da microbiota contaminante a níveis desejáveis, não promovendo uma boa eficiência fermentativa evidenciada por um teor de etanol elevado nos ensaios fermentativos e, também, reduzindo o rendimento do outro galato quando empregados em uma mistura.

O galato de etila apresentou alguns resultados promissores. Nos ensaios fermentativos nos quais ele foi empregado foi constatado um teor de etanol gerado dentro dos níveis esperados, sendo comparáveis em algumas fermentações aos do antimicrobiano comercial utilizado como comparativo (Kamoran). Outro fator bastante desejável foi a consistência apresentada por ele ao longo dos ensaios fermentativos, o que mostra que ele mantém seu desempenho mesmo com a variação da microbiota.

No entanto, os ensaios de plaqueamento mostraram que, apesar de o galato de etila ter reduzido a contaminação bacteriana a níveis de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, seu desempenho nesse quesito foi bastante inferior ao do Kamoran que deixou a contaminação em níveis de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Outro fator avaliado foi a concentração onde o galato de etila foi empregado para obtenção de seus resultados. Essa concentração elevada (1200 mg.L<sup>-1</sup> do galato de etila contra 5 mg.L<sup>-1</sup> do Kamoran) gera algumas dificuldades ao seu uso em escala industrial.

O primeiro fator impeditivo que essa alta concentração do galato de etila gera é o fator monetário, pois para chegar à concentração na qual ele foi eficaz se gasta

muito mais produto do que o Kamoran para chegar à concentração onde ele foi eficaz.

O segundo fator é o transporte. A escala na qual a fermentação ocorre em nível industrial muito grande, com dornas que podem ultrapassar 1 milhão de litros. Considerando esse cenário, quantidades bastante elevadas de matéria prima e insumos (entre eles os antimicrobianos) devem ser transportados dentro da usina. Quando a concentração de um insumo utilizado é alta, significa que maiores quantidades dele devem circular pela usina e isso pode prejudicar a logística dela.

Além do fator transporte interno, tanto o volume final da dorna quanto o do pé de cuba (onde são dosados os antimicrobianos) são fixos e concentrações muito elevadas podem não ser comportadas pelo tamanho deles.

Em resumo, o galato de propila não apresentou resultados favoráveis ao seu uso como descontaminante no processo fermentativo. Já o galato de etila apresentou bons resultados em fermentações em bancada, mas sua concentração elevada em comparação com antimicrobianos comerciais ainda é um fator impeditivo ao seu uso em larga escala.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugar cane must. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.677-681, Oct./Dec. 2003.

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

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de Análises e Monitoramento Microbiológico em Laboratório de Destilaria**. São Carlos: Depto. de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural - Centro de Ciências Agrárias. Araras, 2004.

ARAUJO, L.F.; JUNQUEIRA, O.M.; LOPES, E.L.; ARAUJO, C.S.S.; ORTOLAN, J.H.; LAURENTIZ, A.C. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1576-1581, 2006.

BARBOSA, Vanessa de Frias. **Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo**. 2010. 82 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2010.

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

BUENO, C.; VILLEGAS, M.L.; BERTOLOTTI, S.G.; PREVITALI, C.M.; NEUMANN, M.G.; ENCINAS, M.V. The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. *Photophysics and Photochemical Reaction*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 4, p. 385-390, 2002. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0760385TESIOR2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2).

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais, 2011. **Ciência & Tecnologia**, v.2, n.1, p.27-37, 2011.

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

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Rede e-Tec Brasil. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. [http://redeetec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo\\_prd\\_industr/tec\\_acucar\\_alcool/16\\_1012\\_tec\\_fabric\\_alc.pdf](http://redeetec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo_prd_industr/tec_acucar_alcool/16_1012_tec_fabric_alc.pdf).

CONAB. Boletim Cana-de-Açúcar - 2º levantamento – Safra 202/2023 – Agosto 2020. Disponível em. [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br). Acessado em 08 de Novembro, 2022, 12.37.

DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.O.; STAMBUCK, B.U. What do We Know About the Yeast Strains from the Brazilian Fuel Ethanol Industry? **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 97, p. 979-991, 2013.

EUGHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, São Paulo. v. 2, n. 22, p.35-39, 2007.

FELMINGHAM, D.; FARRELL, D.J. In vitro activity of telithromycin against Gram-negative bacterial pathogens. **J. Infect.**, v. 52, p. 178–180, 2006.

FREITAS, Marcela Domingues; ROMANO, Flávia Piacentini. Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com produtos naturais. **Bioenergia em Revista: Diálogos** v. 4, n. 2, p. 109-119, 2014. (ISSN: 2236-9171).

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Campinas, 1990. 388p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GHORBANI, F.; YOUNNESI, H.; ESMAEILI SARI, A.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in a immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renew Energy** 36:503-509, 2011.

KRATZ, Jadel Müller et al. **Estudo do mecanismo da ação anti-herpética do ácido gálico e do galato de pentila.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Farmácia, UFSC, 2007.

KRONKA, Andrei Mocheuti. **Estudo de antimicrobianos naturais sobre bactérias Gram+(lactobacillus) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica.** Dissertação (Mestrado), Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional) – FCFAR, UNESP, 2021.

KRONKA, E. A. M.; PAIM, A. P. S.; REIS, B. F.; COSTA LIMA, J. L.; LAPA, R. A. Determination of glucose in soft drink and sugar cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 364, p. 358-361, 1999.

LEATHERS, T.D.; BISCHOFF, K.M. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. **Biotechnol Lett**, v. 33, 517–523, 2011.

LEITE, Inácio Ramos et al. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista.** Dissertação (Mestrado)

Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

LEITE, J.R.; FARIA, J.R.; MARQUEZ, L.D.S.; REIS, M.H.M.; RESENDE, M.M.; RIBEIRO, E.J.; CARDOSO, V.L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentation. **Fuel Process Technol**, v. 106, p. 611-618, 2013.

LIMAYEM, A.; HANNING, I.B.; MUTHAIYAN, A.; ILLEGHEMS, K; KIM, J-L; CRANDALL, P.G.; O'BRYAN, C.; RICKE, S.C. Alternative antimicrobial compounds to control potential Lactobacillus contamination in ioethanol fermentations. **J Environ Sci Health B** v. 46, p. 709-714, 2011.

LOURENCETTI, N.M.S. **Investigação de XenomiRS e RNAs de Candida Tropicalis: Alvos inovadores para descontaminação na produção de Bioetanol**. Araraquara, 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2018.

MAIA, N.J.L.; CORRÊA, J.A.F.; RIGOTTI, R.T. et al. Combination of natural antimicrobials for contamination control in ethanol production. **World J Microbiol Biotechnol** v. 35, 158, 2019.

MENEGHIN, P.S.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; ANTONINI, S.R.C. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation, **Brazilian journal microbiology**, v. 39, n. 2, p. 337-343, 2008.

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de Saccharomyces cerevisiae em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado em Ciência em Tecnologia em Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. Campinas, 1990. 207p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

PAULUS COMPART, D.M.; CARLSON, A.M.; CRAWFORD, G.I.; FINK, R.C; DIEZ-GONZALES, F.; DICOSTANZO, A.; SHURSON, GC. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product. **J Anim Sci** v. 91, p. 2395-2404, 2013.

PRADO, Josimara Lacerda. **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em**

**fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) Agronomia (Energia na Agricultura), FCA, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Unesp, 2014.

SATO, M.; WATARI, J.; SHINOTSUKA, K. Genetic instability in flocculation of bottom fermenting yeast, **Journal of the Society of brewing chemists**, v. 59, n. 3, p. 130-134, 2001.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica “floculação do fermento”. **Brasil Açucareiro**, v. 93, p.26-31, 1979.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; PINTO, S.Z.; MENEGUIM, M.A.; MARINO, E.A.; FERREIRA, L.J.; BERTHIOL, A.E. Controle microbiológico da fermentação alcoólica em condições industriais. In: **simpósio de tecnologia do açúcar e do álcool**, 3., Águas de São Pedro, 1980. Anais. Águas de São Pedro: STAB, 1980. p.387-295.

SHOWING ALL FOODS IN WHICH THE POLYPHENOL GALLIC ACID IS FOUND - Phenol-Explorer. Database on polyphenol content in foods. Disponível em: <<http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/413>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; DA SILVA FILHO, E.A.; DE MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; DE MORAIS Jr., M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Lett Appl Microbiol** v. 40, p. 19–23, 2005.

TIPOE, G. L. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver injury in mice. **Toxicology**, v. 273, n. 1–3, p. 45-52, June 2010.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado em Ciência em Tecnologia em Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.