

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 ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE BACTÉRIAS GRAM +
(*LACTOBACILLUS*) USADOS PARA CONTROLE E DESCONTAMINAÇÃO DA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

ANDREI MOCHEUTI KRONKA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

ARARAQUARA - SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

ESTUDO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS SOBRE BACTÉRIAS GRAM +
(*LACTOBACILLUS*) USADOS PARA CONTROLE E DESCONTAMINAÇÃO DA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

ANDREI MOCHEUTI KRONKA

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.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

ARARAQUARA - SP

2021

-
- K93e** Kronka, Andrei Mocheuti.
Estudo de antimicrobianos naturais sobre Bactérias Gram + (*Lactobacillus*) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica / Andrei Mocheuti Kronka. – Araraquara: [S.n.], 2021.
53 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, Bioprocessos, Bioprodutos.
- Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Álvaro Baptista Neto.
1. Antimicrobianos naturais. 2. Fermentação Alcoólica. 3. Bactérias Gram +. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Baptista Neto, Álvaro, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ESTUDO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS E SEUS ALVOS SOBRE BACTÉRIAS GRAM + (LACTOBACILLUS) USADOS PARA CONTROLE E DESCONTAMINAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

AUTOR: ANDREI MOCHEUTI KRONKA

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORIENTADOR: ALVARO DE BAPTISTA NETO

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

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

Araraquara, 22 de fevereiro de 2021

"A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Devemos ter perseverança e, acima de tudo, confiança em nós mesmos. Devemos acreditar que somos dotados para algo e que isso deve ser conquistado."

Marie Curie.

Dedico a Isabelle Bianchi Kronka, que, apesar de estar em minha vida por um curto espaço de tempo, conseguiu o feito de quebrar minha até então inabalável racionalidade e provou que é possível enganar até mesmo Chronos sem sofrer consequências.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha esposa Yanca Gabrielli Bianchi Kronka, que não apenas me apoiou, mas foi além e aprendeu junto comigo para poder me levar para frente.

Agradeço a Al Sukkar e sua equipe, em especial ao Dr. Diego Araujo Frazílio pelo auxílio nos ensaios e análise crítica.

À minha família, em especial minha mãe Dra. Eloisa Mocheuti Kronka e meu primo Lucas Ferreira Mocheuti, por suas contribuições científicas ao trabalho e pela amizade.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ana Marisa Almeida Fusco, pela parceria, amizade, conhecimento e contribuição para tornar possível a concepção do trabalho.

Aos professores do Mestrado Profissional em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, em especial o coordenador Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, por tornar possível o sonho de unir a expertise da Unesp com a prática das empresas de inovação.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto, pelas horas e conhecimento disponibilizado quando eu precisei.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Maria Rosa Bressan Carnier, pois antes de desempenhar à nível superior é preciso saber o básico, antes de ser um homem profissional é preciso ser um menino amadurecendo, e ela estava lá para garantir que eu me tornasse quem sou.

RESUMO

As usinas de açúcar e álcool brasileiras representam o maior complexo de fermentação de caldo de cana de açúcar do mundo, produzindo aproximadamente mais de 34 bilhões de litros de etanol por ano. A produção de etanol tem muitas perdas, principalmente devido à contaminação por bactérias, que são provenientes do solo e entram no processo juntamente com a cana. As bactérias contaminantes mais frequentes pertencem ao grupo das Gram positivas. Estas bactérias produzem substâncias indesejadas, como ácidos orgânicos, podem causar a floculação do fermento, e ainda podem favorecer o meio para a ocorrência de leveduras selvagens floculantes. Atualmente, alguns produtos utilizados para controle da contaminação bacteriana deixam resíduos na levedura seca, impedindo sua venda para ração animal. Para contornar estes problemas, são utilizados produtos naturais, porém, estes possuem efetividade restrita e apresentam um custo/benefício ruim. O presente projeto teve como objetivo avaliar o uso de diferentes produtos de fontes naturais com histórico de atividade antimicrobiana para o controle da fermentação alcoólica que não deixam resíduos em levedura seca. Os produtos antimicrobianos selecionados foram moléculas sintetizadas análogas de chalconas e ácidos protocatecuicos vegetais. Para analisar a eficácia destes produtos, foram isoladas e selecionadas cepas de leveduras fermentadoras e bactérias contaminantes Gram positivas de cinco usinas de diferentes regiões do interior de São Paulo e sul de Minas Gerais. Também foram analisados a eficácia contra leveduras selvagens de coleções. Foi analisada a viabilidade celular, consumo de açúcares e produtividade de etanol das leveduras em relação à contaminação bacteriana utilizando técnicas de contagem celular, viabilidade celular e análises de °GL, açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores residuais totais (ARRT) por HPLC. Posteriormente foi analisado a eficácia dos produtos antimicrobianos através de análise de concentração inibitória mínima (CIM) em pH 2,2 e pH 6,5. Os resultados mostraram que há uma queda considerável na produtividade de etanol e um aumento de ARRT com aumento da contaminação bacteriana. Houve uma variação considerável nos resultados comparando diferentes cepas de leveduras e bactérias, sugerindo que há diferenças morfológicas entre bactérias de diferentes regiões. Os produtos apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram positiva, agindo de forma mais efetiva em pH ácido (2,2). Os produtos protocatecuato propila e heptila apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações similares tanto para bactérias quanto para leveduras, o que os inviabiliza para utilização em dorna ou cuba. Os produtos chalcona e protocatecuato de hexila também apresentaram atividade antimicrobiana na levedura fermentadora, mas, ainda assim, em pH ácido há uma faixa viável onde há a possibilidade de se utilizar os mesmos para o controle de contaminação na fermentação. O produto protocatecuato de etila não apresentou inibição da levedura fermentadora, o que dá uma boa margem de segurança para seu uso como antimicrobiano. Todos os produtos apresentaram atividade inibidora em pelo menos uma cepa de levedura selvagem. Para análise de residual na levedura seca é necessário enviar para análise produto já registrado para empresa competente que o avalia e, considerando o histórico de aprovações, produtos a base de extrato de plantas são normalmente aprovados para uso em fermentação alcoólica sem contaminar a levedura para venda posterior como levedura seca.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais. Fermentação Alcoólica. Bactérias Gram +. *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The Brazilian plants that produce sugar and alcohol represents the biggest complex of sugar cane fermentation in the world, producing approximately 34 billion liters of ethanol every year. There are many losses during the production of ethanol, mainly due to bacterial contamination. The most frequent bacteria contaminating the process are Gram + (*Lactobacillus* and *Bacillus*), with over 86% occurrence, especially in the south east region. These bacteria produce unwanted substances, such as organic acids, causing yeast to flocculate, and can even favor the medium for the occurrence of wild flocculant yeasts. Currently, the products used to control bacterial contamination leave residues in the dry yeast, preventing its sale for animal food. To overcome these problems, natural products are being used, however, they have restricted antimicrobial activity and have a poor cost / benefit ratio. This research project aims to evaluate the use of different types of natural products such as antimicrobials to control alcoholic fermentation that do not leave residues in dry yeast. The products chosen were the extracts of the chalcone plant and derivatives from protocatechuic acid P. etila, P. propila, P. hex and P. hep, which were investigated and evaluated as potential antimicrobials by Unesp Araraquara. To analyze the effectiveness of these products, strains of fermenting yeasts and gram + contaminating bacteria were selected and isolated from five plants in different regions of the interior of São Paulo and southern Minas Gerais. Cell viability, sugar consumption and yeast ethanol productivity in relation to bacterial contamination were analyzed using cell counting techniques, cell viability and HPLC analysis. Subsequently, the effectiveness of antimicrobial products was analyzed through analysis of minimum inhibitory concentration (MIC) at pH 2.2 and pH 6.5. The results showed that there is a considerable drop in ethanol productivity and an increase in total residual reducing sugars (ARRT) with an increase in bacterial contamination. There was considerable variation in the results comparing different strains of yeast and bacteria, suggesting that there are morphological differences between bacteria from different regions. The products showed antimicrobial activity for gram + bacteria, acting more effectively at acidic pH (2.2). The product P. propila and P. hep presented antimicrobial activity in similar concentration to both bacteria and yeast, making them unreliable to use in the fermentation and yeast treatment. The products chalcone and P. hex also showed antimicrobial activity in the fermenting yeast, but even so, in acidic pH, there is a viable range where there is the possibility of using them to control contamination in the fermentation. The product P. etila did not present inhibition of the fermenting yeast, which gives a good safety margin for its use as an antimicrobial. All products showed inhibitory activity in at least one strain of wild yeast. To analyze residual in dry yeast, its necessary to have a registered product, and send it to a competent company. Considering the historic of approval, plant base extract products are usually approved by the company for use in fermentations without leaving residues in the yeast for future sell as dry yeast.

Keywords: Natural antimicrobials. Alcoholic fermentation. Gram + bacteria. wild yeasts.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Dados e expectativas da produção de etanol no Brasil	17
Tabela 2 - Usinas e microrganismos selecionados para os ensaios.	30
Tabela 3 - Resultados obtidos nas fermentações realizadas em erlenmeyers, nas condições definidas na Figura 6.	37
Tabela 4 - Fermentações realizadas com diferentes concentrações de contaminação com pool de bactérias.....	39
Tabela 5 - Ensaios realizados com os antimicrobianos frente as bactérias gram + e a levedura Gold isoladas da usina 1. A concentração inicial dos antimicrobianos foi de 1000 mg/L.	41
Tabela 6 - Ensaios realizados com os antimicrobianos frente as bactérias Gram + e as respectivas leveduras isoladas das usinas 2, 3, 4 e 5.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - As perdas de açúcares no processo de produção do etanol	19
Figura 2 - Via de obtenção do etanol e origem da contaminação bacteriana.....	22
Figura 3 - Estrutura química base da Chalcona.....	26
Figura 4 - ácido 3,4-di-hidroxibenzóico ou ácido protocatecuico.....	27
Figura 5- Processo de isolamento da levedura da amostra de fermento proveniente das usinas e crescimento das mesmas no laboratório	29
Figura 6 - Condições do ensaio fermentativo: mosto suplementado ART 16,34%; concentração fermento 3%; temperatura da fermentação 34° C; pH do fermento 2,5 e tempo de fermentação de 8 h em agitação, deixando até 24 h sem agitação.	35
Figura 7 - Foto ilustrativa das placas de CIM para os ensaios a pH 6,5 e 2,2.	36

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da viabilidade celular, em percentagem.	34
Equação 2 - Cálculo para contagem de células de leveduras.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ART: açúcares redutores totais

ARRT: açúcares redutores residuais totais

bac/mL: bactérias por mililitro

Bim1: levedura fermentadora

Bim3: levedura fermentadora

Bim4: levedura fermentadora

CAT: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

Cer01: levedura fermentadora

CIM: concentração inibitória mínima

ferm: fermentação

FT 858: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*

Gold: levedura fermentadora

HPLC: cromatografia líquida de alta precisão

Lev. 2001: levedura selvagem

Lev. 22019: levedura selvagem

Lev. 90020: levedura selvagem

P. etila: protocatecuato etila

P. hep: protocatecuato heptila

P. hex: protocatecuato hexila

P. propila: protocatecuato propila

pH: potencial hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

t - tonelada

ton/safra: toneladas por safra

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO	20
2.1 Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 Chalconas.....	26
3.2 Ácido protocatecuico.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Isolamento de microrganismos	29
4.2 Microrganismos utilizados e manutenção	29
4.3 Produtos de origem natural utilizados	30
4.4 Descontaminação do mosto	32
4.5 Reagentes e soluções para fazer a contagem de células no microscópio	32
4.6 Método para contagem de bactérias e viabilidade celular	33
4.6.1 Contagem da contaminação	33
4.6.2 Cálculos	33
4.7 As análises por HPLC.....	34
4.8 Fermentação alcoólica	34
4.9 Análise de concentração inibitória mínima (CIM).....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol no Brasil é direcionada principalmente para combustível para automóveis, o que só é possível hoje em dia, devido aos fortes esforços científicos e tecnológicos, na manipulação genética de diferentes cultivos de cana (*Saccharum spp.*), nas técnicas de melhoramento agrônomo e nos estudos sobre o processo fermentativo industrial, que contribuem para se obter uma maior eficiência na produção das destilarias e melhor produtividade (BASSO, 2008). O caldo de cana e/ou melaço são as principais matérias-primas utilizadas na produção de etanol nas usinas sucroalcooleiras do Brasil.

Resumidamente, o processo de produção de etanol pode ser descrito de acordo com as seguintes etapas:

- Moagem de cana: A cana de açúcar cortada passa por um processador (moenda), de onde se é obtido o caldo de cana.

- Obtenção do mel: Após a etapa de obtenção do açúcar cristalizado a partir do caldo de cana, o subproduto é denominado mel ou melado, um xarope com alta concentração de ART (açúcares redutores totais).

- Produção de mosto: O mel ou melado é diluído em água, resultando em um produto denominado mosto, com uma concentração entre 15 a 20% de ART.

- Fermentação alcoólica: Na dorna de fermentação é adicionado o fermento tratado proveniente da cuba, além do mosto. O processo fermentativo tem um ciclo aproximado de 8h, produzindo um vinho levedurado com aproximadamente 8 a 12 °GL (teor de etanol volume/volume, de acordo com Gay-Lussac).

- Separação e destilação: O vinho levedurado passa por uma centrífuga para separar a levedura, que volta para a cuba para recuperação e tratamento. O vinho já sem levedura passa pelo processo de destilação, de onde se obtém o etanol hidratado, com aproximadamente 96 °GL (DELLA-BIANCA, 2012).

O setor sucroalcooleiro, em 2019, foi responsável por gerar aproximadamente 800 mil empregos diretos. Se considerar os empregos indiretos, esse número beira a um milhão de empregos. Somente na região centro-sul, os empregos gerados pelo setor são responsáveis por 8% de todos os empregos formais gerados no agronegócio

brasileiro. Outro fato importante é que os empregos com carteira de trabalho assinada respondem por 95% do total de empregos neste setor (CEISE, 2021).

As usinas sucroenergéticas brasileiras representam o maior complexo de fermentação de caldo de cana de açúcar do mundo, produzindo aproximadamente mais de 34 bilhões de litros de etanol por ano (ALCARDE, 2003).

Os impressionantes números do setor sucroalcooleiro (safra 2018/2019 e estimativas para safra 2019/2020), conforme Tabela 1, demonstram o mercado em expansão, devido à grande procura de grupos estrangeiros para a aquisição de usinas sucroalcooleiras no Brasil. Este fato, nos impulsiona a pesquisar novas tecnologias em produtos de origem biotecnológica a serem usados para melhorar a eficiência do processo de produção. As usinas produtoras de açúcar e álcool vêm procurando se modernizar cada vez mais, pois com o aumento da demanda e espaços restritos de cultivo da cana, as usinas têm que aumentar sua viabilidade produtiva para acompanhar a demanda (CONAB, 2019).

Tabela 1 - Dados e expectativas da produção de etanol no Brasil

REGIÃO/UF	CANA-DE-AÇÚCAR DESTINADA AO ETANOL TOTAL (Em mil t)			ETANOL TOTAL (Em mil l)			
	Safr 2018/19	Safr 2019/20	VAR. %	Safr 2018/19	Safr 2019/20	Variação	
						Absoluta	%
NORTE/NORDESTE	27.489,8	30.232,7	10,0	2.150.176,0	2.263.469,1	113.293,1	5,3
CENTRO-SUL	372.733,9	384.928,2	3,3	30.201.467,0	31.574.291,5	1.372.824,5	4,5
BRASIL	400.223,7	415.160,8	3,7	32.351.643,0	33.837.760,6	1.486.117,6	4,6

Fonte: CONAB,
2019.

Nota: Estimativa
em
dezembro/2019

De acordo com o Observatório da Cana, durante a safra de 2019/2020, foi exportado um volume total de etanol de, aproximadamente, 1,9 bilhões de litros, o que significou um valor total aproximado de 980 milhões de dólares. Já na safra

2020/2021, entre abril e dezembro de 2020 já foi exportado um volume total de etanol de, aproximadamente, 2,4 bilhões de litros, o que significou um valor total aproximado de 1,02 bilhões de dólares, sendo este valor maior do que o da safra 2019/2020, mesmo desconsiderando 3 meses (ainda não foram divulgados os valores dos últimos 3 meses da safra 2020/2021). Os dados apresentados mostram que, o mercado de etanol combustível está se expandindo, mesmo considerando a crise financeira mundial gerada em 2020 (OBSERVATORIO DA CANA, 2021).

A contaminação devido a ação de bactérias, se constitui a principal componente das perdas de açúcares em todas as etapas do processo de produção do etanol. Estas podem ser chamadas de perdas indeterminadas e determinadas, ambas decorrentes do processo de fabricação do açúcar e do etanol (GHORBANI, 2011). As perdas indeterminadas são aquelas que não são rotineiras e não é possível mensurar onde elas ocorrem (por exemplo, as perdas por contaminação) e as determinadas podem ser mensuradas, identificadas e pré-definidas, tais como no bagaço, torta de filtro e destilação. No processo de produção industrial, são consideradas de 5 a 8% de perdas indeterminadas (GHORBANI, 2011).

Na fermentação alcoólica é onde ocorre o maior percentual de perdas de açúcares do processo de produção do etanol, conforme mostra a Figura 1. Além das perdas devido à qualidade da matéria prima, ocorre a presença de bactérias contaminantes, que produzem fermentações indesejáveis, resultando em produtos prejudiciais a fermentação normal. Essas bactérias contaminantes, também fermentam os açúcares e produzem ácidos orgânicos (lático, acético entre outros), que reduzem o rendimento fermentativo da levedura e modificam, tanto a morfologia das leveduras, quanto 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 (separação do etanol do vinho). 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 (CHERUBIN, 2003).

Figura 1 - As perdas de açúcares no processo de produção do etanol



A produção de etanol tem muitas perdas, principalmente devido à contaminação por bactérias, que são provenientes do solo e entram no processo junto com a cana. As perdas de açúcar no processo de produção são um dos fatores que interferem diretamente na produtividade, contribuindo assim para que a empresa não cumpra suas metas (produção, rendimento e custo). Estas perdas influenciam diretamente no faturamento da empresa e, portanto, é importante saber quais são as perdas que interferem no processo produtivo e quanto este influencia no rendimento industrial (ÚNICA, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar soluções para estas perdas. Em específico, buscar produtos com propriedades antimicrobianas para reduzir a contaminação por bactérias, na fermentação alcoólica.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de diferentes tipos de produtos de origem natural como antimicrobianos para o controle da fermentação alcoólica.

2.1 Objetivos específicos

Portanto, foram utilizados produtos diferentes de origem natural, além de seis tipos de leveduras diferentes, sendo cinco isoladas de usinas de açúcar e álcool de diferentes regiões do interior de São Paulo e sul de Minas Gerais. Também foram utilizadas cepas de bactérias Gram + provenientes do processo fermentativo alcoólico dessas cinco usinas.

Assim, foram realizados ensaios para avaliar a eficácia desses produtos selecionados frente às leveduras e bactérias Gram +, a fim de selecionar os melhores candidatos para futuros testes em escala piloto e industrial.

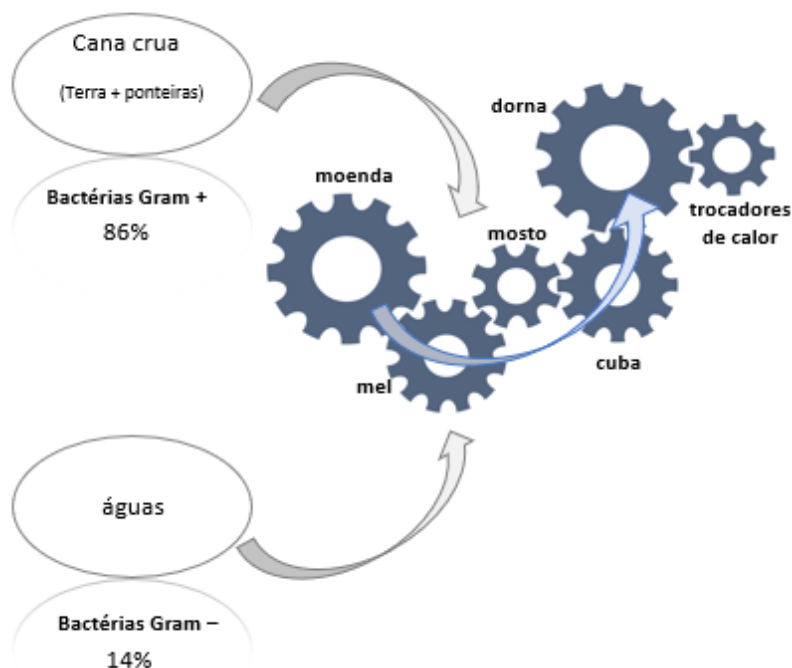
3. REVISÃO DA LITERATURA

O caldo de cana constitui um excelente meio de crescimento não apenas para as leveduras, mas também para bactérias contaminantes do processo, pelo seu teor de nutrientes, alta atividade de água e pH favorável, além da falta de assepsia dos equipamentos, que intensifica ainda mais a contaminação bacteriana na fermentação alcoólica (VIÉGAS, 2011).

O processo de contaminação na fermentação alcoólica em níveis superiores à 10^6 células/mL, pode ocasionar inúmeros danos ao processo industrial tais como: consumo de açúcar e redução do rendimento fermentativo, formação de gomas refletindo no aumento da viscosidade do caldo e consequentemente ligado ao entupimento nas tubulações, danos aos equipamentos como centrifugas, peneiras e trocadores de calor elevando os custos em manutenção (CHIEPPE JUNIOR, 2012).

As bactérias contaminantes mais frequentes (*Lactobacillus* e *Bacillus*), com mais de 86% de ocorrência principalmente nas usinas da região sudeste, pertencem ao grupo das Gram +, não esporulantes, catalase negativa, fermentadoras de carboidratos, produtoras de ácidos, anaeróbicas, ácido tolerantes, são células que podem ser bastonetes e tem exigências nutricionais complexas e produzem o ácido láctico como maior produto final do metabolismo de carboidrato (KRONKA, 1999). Além disso, estas bactérias podem causar a floculação do fermento, e ainda podem favorecer o meio para a ocorrência de leveduras selvagens floculantes. Outro ponto de destaque para as contaminações devido a estas bactérias, é a presença de toxinas e ácidos orgânicos que ocasionam a inibição e a queda da viabilidade celular. Estes compostos excretados no meio pelos contaminantes, juntamente com todo o processo ocorrido leva a redução no rendimento da fermentação e interfere na eficiência da fermentação industrial (NOBRE, 2005). A Figura 2 mostra, de forma esquemática e resumida, o processo de obtenção do álcool hidratado e a origem das contaminações bacterianas no processo fermentativo.

Figura 2 - Via de obtenção do etanol e origem da contaminação bacteriana.



A contaminação bacteriana predominante e identificada nas amostragens em processos industriais de fermentação alcoólica normalmente são formadas por microrganismos: Gram-positiva, em forma de bastonetes e não esporulantes. Os gêneros mais freqüentes nas amostragens foram *Lactobacillus* (59,7%) e *Bacillus* (26,6%) (GALLO, 1990). Em relação às espécies predominantes destacaram-se *Bacillus coagulans* (15,1%), *Lactobacillus fermentum* (15,0%), *Lactobacillus helveticus* (14,1%), *Bacillus stearothermophilus* (6,9%), *Lactobacillus plantarum* (5,7%), *Lactobacillus animalis* (4,5%) e *Lactobacillus bucheri* (3,8%) (CHERUBIN, 2003; ALCARDE, 2003). Um dos contaminantes de relevância, principalmente na produção de açúcar, é o *Bacillus stearothermophilus*, pois, a sua resistência ao tratamento térmico dificulta a eliminação durante o processamento (CHERUBIN, 2003).

Dentre as bactérias Gram +, tem o gênero *Leuconostoc* (cocos), um produtor de gomas, que interferem no processo, convertendo sacarose em polímeros de dextrana e levana, o que pode levar ao entupimento de filtros e tubos (LEATHERS; BISCHOFF, 2011). Ademais, algumas cepas de *Lactobacillus fermentum* podem aderir às células de levedura, causando a floculação e, assim, podem reduzir a taxa de conversão de açúcares em etanol (MAIA, 2019).

As análises das bactérias contaminantes no meio fermentativo, com sua atividade, produtoras dos ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico), tal como o glicerol e o ácido succínico (produzidos pelas leveduras quando estressadas), que juntos com os teores de aldeído acético, dextrana e levana, aliados ao controle das variáveis independentes do processo (pH, temperatura, ART etc), dão importantes informações dos contaminantes do processo, gerando dados que indicam a eficiência da fermentação (LOURENCETTI, 2018).

O glicerol é um subproduto das leveduras quando estas estão estressadas por alta concentração de bactérias no meio fermentativo. Forma-se durante a fermentação alcoólica, essencialmente na fase inicial (LUCENA, 2010). A quantidade formada depende do teor de açúcares do mosto, da natureza das leveduras presentes no meio e das condições em que se realiza a fermentação. Também, tem sido verificado um aumento da concentração de glicerol com a presença de dióxido de enxofre no mosto, aumento esse tanto maior quanto mais alta a acidez do meio (LOURENCETTI, 2018).

A maioria das usinas também tem problemas de contaminação do processo de produção por leveduras contaminantes (*não Saccharomyces cerevisiae*), que são altamente competitivas dentro das condições da fermentação, e podem dominar dentro da população de leveduras presentes no reator de fermentação (dorna). Estas leveduras podem vir do solo cultivado com cana de açúcar, melaço, caldo e água (ANTONINI, 2004). São chamadas de “selvagens” ou “nativas” e quando predominam no processo fermentativo, prejudicam o rendimento fermentativo, pois não possuem eficiência fermentativa tal qual a *Saccharomices cerevisiae*, aumentam o tempo de fermentação, causando prejuízo econômico, pois competem com o açúcar utilizado na produção do etanol. Além disso, produzem substâncias que são tóxicas a levedura do inóculo inicial, elevam consideravelmente o consumo de insumos e comprometem o desempenho operacional (SOUZA LIBERAL, 2005).

O processo de produção de etanol no Brasil, difere dos outros processos industriais de duas maneiras: primeiro o mosto de alimentação não é submetido a um tratamento para retirar os microrganismos contaminantes que vem com a cana de açúcar e segundo, são o número de ciclos fermentativos, onde a linhagem de levedura selecionada no início da safra, é propagada, reciclada e reutilizada durante toda a safra. A reutilização é feita através da centrifugação do vinho fermentado, onde as

células são separadas e enviadas para um reator (cuba) para tratamento ácido, retornando para a dorna de fermentação (LOURENCETTI, 2018).

A característica fenotípica (morfologia) das leveduras, influenciam no processo de produção do etanol, pois podem prejudicar o desempenho industrial. Conforme já mencionado, o maior problema encontrado nas usinas é a floculação, causada pelo estresse das leveduras, que afeta a composição e morfologia da parede celular. Alguns fatores de estresse das leveduras e promotores da floculação, são a alta concentração de bactérias contaminantes e seus subprodutos (ácidos orgânicos e gomas) no meio fermentativo, temperatura, pH e quantidade de nutrientes (CUNHA, 2006). Um dos principais promotores da floculação é o cálcio, usado no tratamento do caldo, que participa de interações entre as proteínas da parede celular e os resíduos de açúcar, principalmente na cadeia de manose (SATO, 2001).

Por outro lado, há o excedente de levedura gerada na produção de etanol. Atualmente, o mesmo passa por um processo de secagem e tem sido comercializada como ração animal, se tornando um sub produto da fermentação de alto valor agregado, devido ao seu alto teor de proteínas, aminoácidos e vitaminas (ARAUJO, 2006). Porém, residuais químicos de antibióticos, usados no combate a contaminação no processo de produção, são restritos à levedura seca (PAULUS, 2013).

As usinas tem usado diferentes tipos de compostos químicos para conter a proliferação bacteriana e aumentar o rendimento fermentativo. Além do tratamento do fermento com ácido sulfúrico, tem sido utilizado em larga escala, os antibióticos, porém o uso contínuo traz limitações como, por exemplo, a indução da resistência bacteriana a ação do antibiótico, além do custo elevado que este tratamento apresenta, uma vez que, seu uso deve ser contínuo na indústria (BREGAGNOLI, 2006).

Para fermentações em batelada, que é o mais comum nas usinas de açúcar e álcool, o consumo de antibióticos para descontaminação da fermentação alcoólica é de 3,8 a 8,0 mg/L de etanol produzido (LOPES, 2016). Para fins de comparação, se for levado em consideração uma média de 5,0 mg/L de etanol produzido por usina e que a produção de etanol anual é de 34 bilhões de litros, temos então, um consumo anual de antibióticos aproximado de 170 mil quilogramas, considerando apenas o produto concentrado, sem diluições.

As usinas estão optando pelo uso de biocidas químicos, em especial o quaternário de amônia, usado principalmente na desinfecção da moenda, e o dióxido de cloro, usado na descontaminação do mosto e também, em concentrações adequadas (que não prejudicam a levedura), na dorna de fermentação (MENEZHIN, 2008).

O dióxido de cloro é um oxidante forte e tem propriedades bactericidas e fungicidas, sendo usado como um agente antibacteriano nas usinas, no combate as bactérias e leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial, por sua eficiente atuação antimicrobiana, não deixam resíduo na levedura seca e principalmente, seu baixo custo, em relação aos antibióticos sintéticos e naturais CAETANO, 2011). A utilização do dióxido de cloro em substituição aos antibióticos, apesar de evitar a seleção de microrganismos resistentes, deve ser usado com cuidado, pois pode afetar a levedura. É aconselhável usar dosagens de dióxido de cloro abaixo de 50 ppm, a fim de evitar os efeitos nocivos sobre a levedura. Porém, nesta concentração ele tem pouca atividade antimicrobiana frente a maioria das bactérias Gram + (MENEZHIN, 2008).

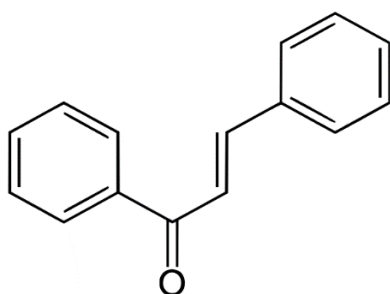
Antimicrobianos de origem natural, tem substituído os antibióticos químicos em algumas usinas, para evitar resíduo na levedura seca (LIMAYEM, 2011). Vários produtos tem sido adotados, porém, a maioria deles são a base do lúpulo, possuem atividade antimicrobiana restrita a algumas espécies de bactérias e são caros (LEITE, 2013). Assim, tem sido grande a busca por novos compostos naturais bactericidas, que sejam mais eficientes que os atuais a um custo menor e que possam substituir antibióticos sintéticos, reduzindo então a resistência microbiana aos antibióticos empregados atualmente (VIÉGAS, 2011).

Os antibióticos naturais são constituídos por óleos essenciais que apresentam atividade antioxidante e são considerados como agentes antimicrobianos. Constituem misturas complexas de compostos. Carvacrol e timol são os principais ativos das plantas. Também, tem os antimicrobianos a base de lúpulo, usados há séculos em bebidas fermentadas, principalmente na fabricação da cerveja.

3.1 Chalconas

As chalconas pertencem à família dos flavonóides e são precursores dos flavonóides de cadeia aberta e isoflavonas, que são abundantes em plantas comestíveis. Sua composição química básica é formada por uma cetona aromática, que pode ser o centro de ligações orgânicas para formar diversos compostos biológicos, conforme mostrado na Figura 3. Também é possível obtê-las de forma sintética (TEIXEIRA, 2019). As chalconas e seus derivados têm atraído cada vez mais a atenção devido a inúmeras aplicações farmacológicas. Propriedades anticancerígenas foram observadas em estudos como os de Echeverria e colaboradores (2009) com chalconas sintéticas. Um estudo executado por Lunardi e colaboradores (2003) relatou a atividade antiprotozoária *in vitro* contra o crescimento de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Yadav (2011) sintetizou uma série de derivados de chalconas com as quais observaram atividades anti-inflamatórias usando camundongos com um modelo de edema. Outros estudos demonstram propriedades antioxidantes, antimicrobiana e atividade larvicida contra mosquito (NURETTIN, 2006; HAMDİ, 2010; BEGUM, 2011). Por último, as chalconas apresentam atividades antifúngicas contra espécies de *Candida tropicalis*, *C. gattii* e *Paracoccidoides brasiliensis* (DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011). Também foi descrita atividade contra *C. neoformans* e *Mycobacterium tuberculosis* (ALWAN *et al.*, 2015). Outros estudos, conduzidos por Ferraz e colaboradores (2020), realizaram análise de concentração inibitória mínima da chalcona em espécies de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, obtendo resultados promissores, principalmente para a bactéria *E. coli*.

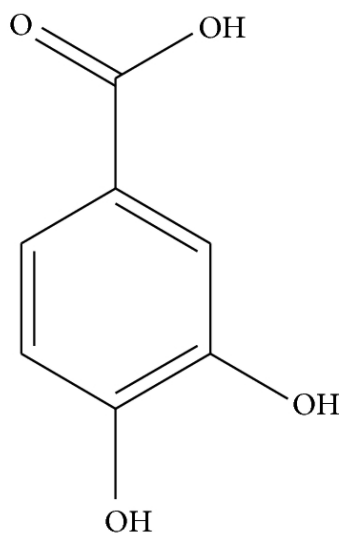
Figura 3 - Estrutura química base da Chalcona



3.2 Ácido protocatecuico

O ácido protocatecuico ou alquil protocatecurado (ou ácido 3,4-dihidroxibenzóico) é um derivado do ácido benzóico, conforme mostrado na Figura 4, encontrado em frutas, nozes e vegetais (por exemplo, azeitonas, arroz, chá, vinho branco e medicamentos à base de plantas) (SOARES *et al.*, 2014). A presença de compostos fenólicos tem sido amplamente estudada devido às suas atividades farmacológicas e também para inibir a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Estudos com animais demonstraram que o ácido protocatecuico é um anticarcinogênico eficaz com propriedades antioxidantes e protege contra o estresse oxidativo, exerce efeitos preventivos em doenças cardiovasculares associadas aos radicais livres.

Figura 4 - ácido 3,4-di-hidroxibenzóico ou ácido protocatecuico



Compostos derivados do ácido protocatecuico vêm sendo testados pelo grupo do laboratório de proteômica da Faculdade de Farmácia da Unesp, campus de Araraquara, obtendo excelentes resultados contra *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *Candida* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*. Sua presença foi relatada em diversas espécies de vegetais: nas flores de *Hibiscus sabdariffa* (LIN *et al.*, 2007); no óleo de girassol (HRÁDKOVÁ *et al.*, 2013); no óleo de açaí (*Euterpe oleracea*) (PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008); no alho (LIU; HSU;

YIN, 2008); em plantas da família Lamiaceae (orégano, erva-cidreira) (KWON; VATTEM; SHETTY, 2006), *Eucommia ulmoides* (LIN *et al.*, 2012).

Estudos conduzidos por Mikłasińska e colaboradores pesquisaram o efeito da molécula ácido protocatecuico etil ester, um derivado do ácido protocatecuico, em cepas de bactéria *Staphylococcus aureus*, obtendo resultados promissores na análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM), com concentrações variando entre 64 e 1024 µg/mL. Claramente, pode-se observar a necessidade de novas moléculas antimicrobianas e produtos naturais de grande importância no desenvolvimento de antimicrobianos não residuais na natureza.

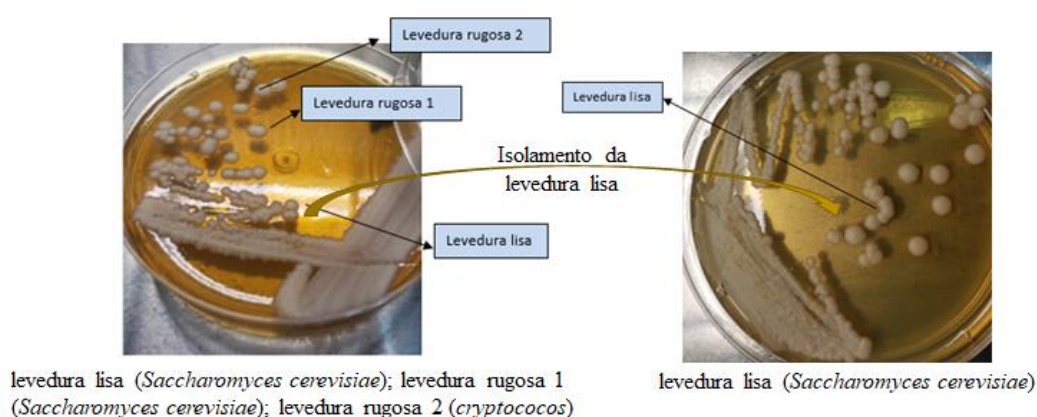
Diante deste potencial do setor sucroalcooleiro no desenvolvimento de novos produtos, que não gerem residual em seus subprodutos, a serem usados nas etapas de produção industrial, o objetivo deste trabalho é o estudo de potenciais antimicrobianos, a partir de extratos de plantas, que tenham alta eficiência antibacteriana e que possam fazer o controle e descontaminação da fermentação alcoólica industrial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de microrganismos

A Figura 5 mostra de forma esquemática a obtenção dos microrganismos, em específico levedura fermentadora produtoras de etanol.

Figura 5- Processo de isolamento da levedura da amostra de fermento proveniente das usinas e crescimento das mesmas no laboratório



4.2 Microrganismos utilizados e manutenção

Os microrganismos utilizados foram:

- uma mistura de duas linhagens leveduriformes selecionadas: *S.cerevisiae* CAT e FT 858, usadas como cepas padrão.
- Uma mistura de bactérias Gram + isoladas durante a safra/2019, do processo fermentativo industrial, denominadas de “pool de bactérias” das respectivas usinas de acordo com a Tabela 2.
- 05 cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo industrial, de 05 usinas de diferentes regiões do estado de São Paulo, definidas pela Tabela 2.

Tabela 2 - Usinas e microrganismos selecionados para os ensaios.

Denominação da levedura <i>S.cerevisiae</i>		Localização
Usina 1	Gold	Região de Pontal - SP
Usina 2	Bim1	Região de Ribeirão Preto - SP
Usina 3	Bim3	Região de Rio Preto - SP
Usina 4	Bim4	Região de Penápolis - SP
Usina 5	Cer01	Região de Frutal - MG

- Foi usada como levedura padrão, uma mistura de leveduras selecionadas, a CAT e a FT 858, que são comumente compradas pelas usinas para o início da safra.

- Foram utilizadas cepas de leveduras “selvagens” isoladas pelo laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP: Lev. 11103, Lev. 2001 e Lev. 90020.

As leveduras isoladas de amostras de fermento, proveniente das usinas em estudo, durante toda a safra de 2019, foram congeladas e armazenadas a -8° C.

Para os ensaios foram descongeladas em tubos de microcentrifuga com cultivos em meio líquido YEPD (extrato de levedura 1%, peptona a 2% e sacarose 2% mais 30% de glicerol. Foram realizados repiques em placas de Petri com meio YEPD sólido (extrato de levedura, peptona A, sacarose 2% e ágar bacteriológico) e mantidos em temperatura de 34° C.

As bactérias isoladas do processo fermentativo industrial foram armazenadas em meio BHI líquido com glicerol e congeladas a -8°C. Para os ensaios, estas cepas foram descongeladas e reativadas em meio BHI líquido.

As leveduras padrão foram hidratadas em meio YEPD, para uso nos ensaios.

4.3 Produtos de origem natural utilizados

Foi usada como solução padrão de antimicrobiano, uma solução de dióxido de cloro, que é um biocida mais comumente usados nas usinas por não deixar residual na levedura seca, além da tetraciclina que é um antibiótico químico usado como padrão.

No caso a tetraciclina foi selecionada por se tratar de um antibiótico químico com atividade bactericida comprovada para controle positivo do método de concentração inibitória mínima.

Uma concentração em torno de 40 mg/L de mosto, que é a concentração que as usinas usam no processo fermentativo industrial.

Os produtos antimicrobianos selecionados foram moléculas sintetizadas análogas de ácidos protocatecuicos e chalconas. Todas estas moléculas foram sintetizadas no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE, Unesp São José do Rio Preto sob a coordenação do Prof. Dr. Luis Octávio Regasini e foram cedidos gentilmente por meio de colaboração para o Laboratório de Micologia e Núcleo de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para a execução deste trabalho.

Os derivados do ácido protocatecuico, ou seja, 3,4-diacetoxibenzoico e quatorze alquil protocatecuatos sintéticos (3,4-diidroxibenzoatos) são compostos sintéticos de ácido protocatecuico análogos aos oriundos de fontes vegetais foram preparados conforme descrito por de Faria *et al.* (2012), com pequenas modificações.

Resumidamente, uma solução de 3 mL de N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1 mmol) em dioxano foi adicionada a uma solução resfriada (5 ° C) de 0,2 mmol de ácido protocatecuico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 20 mmol de álcoois alquílicos em 6 mL de dioxano. A solução foi agitada durante 48 h e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi particionado 3 vezes com EtOAc e filtrado.

O filtrado foi lavado sucessivamente com uma solução aquosa saturada de ácido cítrico (3 vezes) e NaHCO₃ aquoso saturado (3 vezes), seco sobre MgSO₄ anidro e evaporado sob pressão reduzida. Os produtos brutos foram purificados em uma coluna de gel de sílica (0,06-0,20 mm, ACROS Organics, EUA) e eluídos isocraticamente com CHCl₃ / MeOH (98: 2) para produzir ésteres 2-15. Suas estruturas foram então estabelecidas por análise espectral de RMN de ¹H e ¹³C.

Portanto, obteve-se derivações do ácido protocatecuico. O P. etila, uma derivação do ácido protocatecuico com substituinte etila em um dos radicais, o P. hex, derivação do ácido protocatecuico com substituinte hexila, o P. propila, derivação do

ácido protocatecuico com substituinte propila, além do P. hep, derivação do ácido protocatecuico com substituinte heptila.

Quanto às Chalconas, estas são flavonoides de cadeia aberta, e podem ser sintetizadas por várias metodologias, principalmente pela condensação de Claisen-Schmidt, sendo o caso deste trabalho. A preparação do bloco de construção (E) - calcônica foi realizada pela reação aldólica de Claisen-Schmidt, sob catálise básica ou ácida, gerando chalconas mono-hidroxiladas (MEDINA-ALARCON, 2020; SANTOS, 2019).

4.4 Descontaminação do mosto

O mosto, uma mistura de melaço (residual da fabricação do açúcar) e água, foi adicionado os nutrientes para suplementar e esterilizado em autoclave por 15 min a 1 atm de pressão e 120°C. Os nutrientes são:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,01%
- KH_2SO_4 0,01%
- MgSO_4 0,006%

4.5 Reagentes e soluções para fazer a contagem de células no microscópio

Solução de azul de metileno 0,1%: Pesar exatamente 0,1g de azul de metileno e dissolver em destilada. Transferir para balão volumétrico de 100mL e completar o volume com água destilada

Solução de eritrosina (trabalho): Adicionar em um tubo de ensaio, 0,1 mL da solução estoque de eritrosina e 5 mL de tampão fosfato.

Solução tampão fosfato: misturar 250 mL de solução A com 250 mL da solução B. Autoclavar a mistura, colocar em frasco plástico e conservar em refrigeração (Validade por 8 meses).

Solução A: em um Becker, pesar 17,90 g de Na_2HPO_4 (fosfato ácido de sódio) e dissolver em 250 mL de água destilada.

Solução B: pesar 6,89 g de NaH_2PO_4 (difosfato ácido de sódio) e dissolver em 250 mL de água destilada.

4.6 Método para contagem de bactérias e viabilidade celular

Este método é utilizado para qualquer amostra, como mosto, vinho, creme de leveduras turbinado e tratado, água, etc., modificando-se apenas as diluições, que irão variar de acordo com o material analisado e o respectivo índice de contaminação.

Em todas as amostras adicionar papaína para melhor visualização no microscópio.

1ª diluição: em um tubo de ensaio adicionar 1 mL da amostra + 19mL de água destilada (Diluição - 1:19) → Diluição 20 x

2ª diluição: em outro tubo de ensaio, pipetar 1 mL da 1ª diluição + 1mL do corante eritrosina. (Diluição - 1:1) → Diluição 2 x

4.6.1 Contagem da contaminação

Em uma lâmina lisa (22 x 22 mm) adicionar 0,003 mL da amostra + corante e fazer a contagem em 50 campos. (Para amostra da dorna).

Para amostra de caldo de cana e mosto, contar 70 campos.

Diluição amostra/corante: (1:1).

4.6.2 Cálculos

Os cálculos para a contagem de bastonetes e leveduras, bem como para o percentual de viabilidade celular, estão descritos nas equações 1 e 2.

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

Equação 1 - Cálculo da viabilidade celular, em percentagem.

$$\text{Leveduras por mL} = \frac{\text{Total de células viáveis} * 400}{\text{Total de retículos Contados}} * \text{diluição} * 10000$$

Equação 2 - Cálculo para contagem de células de leveduras.

4.7 As análises por HPLC

As análises do filtrado, foram feitas em um cromatógrafo líquido de alta resolução, Perkin Elmer, com detector de índice de refração e coluna aminex (Biorad). A fase móvel é H₂SO₄ 5 mM a um fluxo de 0,5 mL/min.

4.8 Fermentação alcoólica

Os ensaios fermentativos foram feitos em triplicatas e simulando as condições da fermentação alcoólica industrial, a temperatura constante, conforme é detalhado na Figura 6.

Após o período fermentativo, o cultivo foi filtrado a vácuo e a biomassa pesada e feita uma análise microscópica para avaliar a viabilidade celular e avaliação da contaminação (contagem de bactérias), em seguida, retorna para fazer nova fermentação com reciclo do fermento.

No cultivo filtrado foram realizadas as análises do teor alcoólico, acidez, residual de açúcares (ARRT) e teor de ácidos orgânicos por cromatografia líquida (HPLC).

No mosto foi feita uma análise do teor de ART (açúcares residuais totais) por HPLC.

O 1º ensaio foi realizado com 3 concentrações de bactérias gram +, sendo:

1ª ferm: baixa contaminação; adicionados uma concentração de 10⁶ bac/mL;

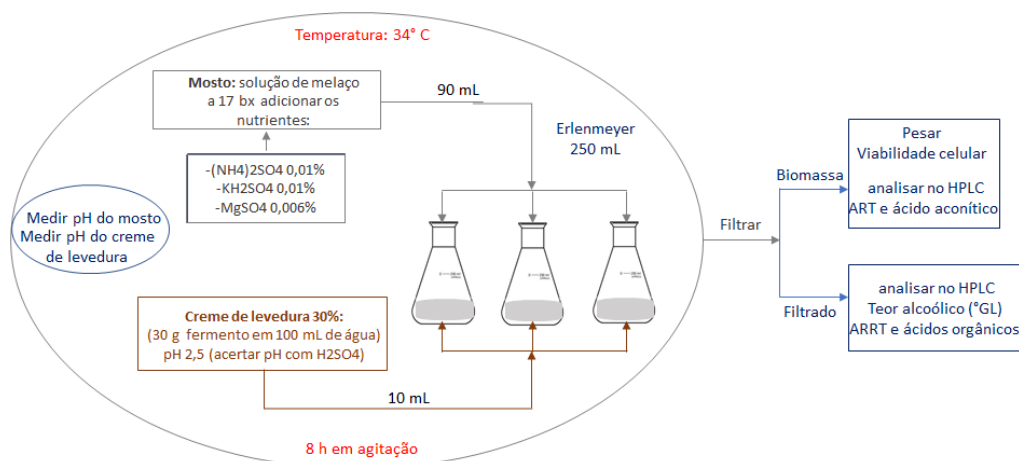
2ª ferm: média contaminação; adicionados uma concentração de 10⁷ bac/mL;

3ª ferm: alta contaminação; adicionados uma concentração de 10^8 bac/mL;

Em seguida, o 2º ensaio foi realizado adicionando-se os antimicrobianos nas 1ª ferm; 2ª ferm; 3ª ferm. O antimicrobiano usado como padrão, foi o dióxido de cloro, que é um dos compostos químicos mais usados como antimicrobiano nas usinas, por não apresentar residuais na levedura seca.

O ARRT (açúcares redutores residuais totais) do cultivo filtrado foi analisado após 24 h de fermentação.

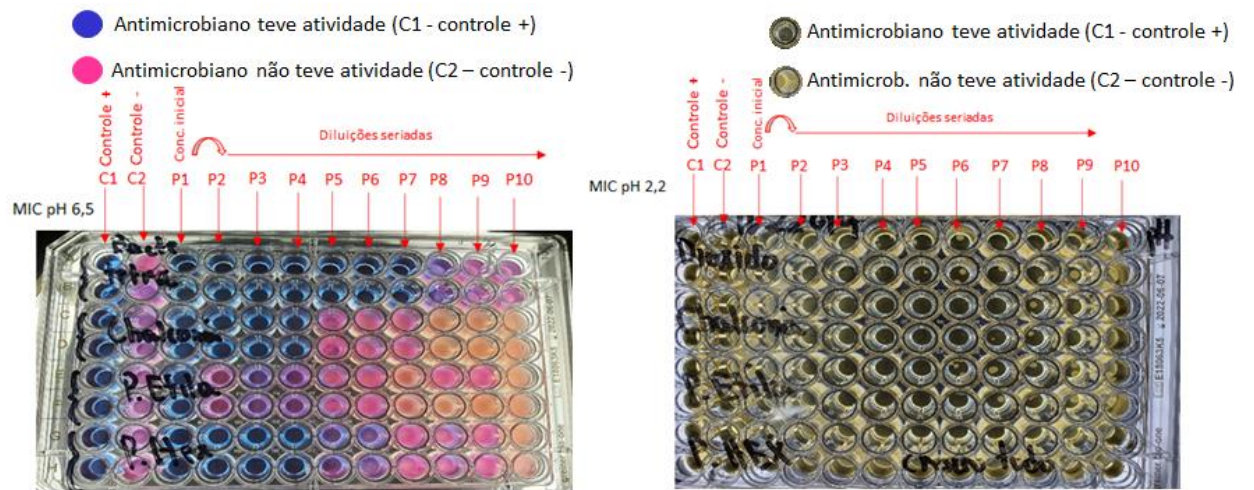
Figura 6 - Condições do ensaio fermentativo: mosto suplementado ART 16,34%; concentração fermento 3%; temperatura da fermentação 34° C; pH do fermento 2,5 e tempo de fermentação de 8 h em agitação, deixando até 24 h sem agitação.



4.9 Análise de concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas usados no combate a contaminação na fermentação alcoólica foram realizados através da análise da concentração inibitória mínima (CIM) em pH 6,5 e em pH 2,2 que é o pH comumente usados na cuba de tratamento do fermento, para os ciclos na fermentação, conforme mostra a Figura 7. Os antimicrobianos foram testados frente ao “pool de bactérias” e das leveduras isoladas do processo fermentativo industrial das usinas em estudo.

Figura 7 - Foto ilustrativa das placas de CIM para os ensaios a pH 6,5 e 2,2.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas usinas o rendimento fermentativo das leveduras, medido pelo teor alcoólico (°GL) é o principal indicador de performance da produção de etanol. Este valor em geral, é aproximadamente metade do valor medido do ART do mosto. Já a medida do ARRT é um dos principais indicadores responsáveis por apontar as perdas do rendimento fermentativo. A Tabela 3, mostra a avaliação do rendimento fermentativo das cepas selecionados para os ensaios.

Tabela 3 - Resultados obtidos nas fermentações realizadas em erlenmeyers, nas condições definidas na Figura 6.

Cepas	Viabilidade 1h (%)	Viabilidade 8h (%)	Brotamento 1h (%)	Brotamento 8h (%)	ART (%)	°GL	ARRT (%)
1 (gold)	95	86	23	21	16,34	9,30	0,22
2 (bim1)	90	78	26	18	16,34	8,06	0,39
3 (bim3)	95	77	21	21	16,34	7,78	0,53
4 (bim4)	91	72	28	18	16,34	7,52	0,52
5 (cer01)	95	86	23	18	16,34	8,93	0,20
Controle (CAT + FT858)	96	76	28	21	16,34	8,56	0,33

Os resultados da Tabela 3 indicam uma relação inversamente proporcional entre o ° GL e o ARRT, o que sugere que a não produção de etanol resulta, além de outras coisas, na permanência de açúcares fermentescíveis após o processo de fermentação (ARRT). Já os dados de viabilidade celular e de brotamento mostram que, apesar de existir certas proporções entres estes dados e o °GL, não há como afirmar que existe uma relação direta entre eles, sugerindo a necessidade de uma análise mais profunda com outros dados para se obter uma conclusão viável sobre a eficácia fermentativa de uma levedura no processo fermentativo alcoólico.

Foram realizados os ensaios para avaliar a influência da contaminação no rendimento fermentativo, mostrado na Tabela 4. Foram realizadas 3 fermentações com a cepas selecionadas das 5 usinas, sendo a fermentação 1, com uma contaminação de 10^6 bac/mL, considerada nas usinas como baixa contaminação. A

fermentação 2, com 10^7 bac/mL, tida pelas usinas como uma média contaminação e a fermentação 3, com 10^8 bac/mL, considerada uma alta contaminação e muito prejudicial ao rendimento fermentativo, com influência na viabilidade celular e no brotamento, como também, com muitas perdas de açúcar residual (ARRT) (NOBRE, 2005).

Tabela 4 - Fermentações realizadas com diferentes concentrações de contaminação com pool de bactérias

Baixa concentração de bactérias – $1,2 \times 10^6$ bac/ml							
Cepas	Viabilidade 1h (%)	Viabilidade 8h (%)	Brotamento 1h (%)	Brotamento 8h (%)	ART (%)	°GL	ARRT (%)
1 (<i>gold</i>)	92	87	27	20	16,34	8,90	0,24
2 (<i>bim1</i>)	90	82	23	17	16,34	8,12	0,41
3 (<i>bim3</i>)	92	80	28	24	16,34	7,70	0,52
4 (<i>bim4</i>)	90	78	24	14	16,34	7,60	0,54
5 (<i>cer01</i>)	86	76	21	14	16,34	8,72	0,25
Controle	95	79	28	21	16,34	8,50	0,36
Média concentração de bactérias – $4,3 \times 10^7$ bac/ml							
Cepas	Viabilidade 1h (%)	Viabilidade 8h (%)	Brotamento 1h (%)	Brotamento 8h (%)	ART (%)	°GL	ARRT (%)
1 (<i>gold</i>)	85	70	20	18	16,34	8,63	0,38
2 (<i>bim1</i>)	80	70	24	19	16,34	7,21	0,54
3 (<i>bim3</i>)	76	74	30	22	16,34	7,00	0,71
4 (<i>bim4</i>)	78	72	34	26	16,34	7,34	0,74
5 (<i>cer01</i>)	85	70	20	18	16,34	8,63	0,38
Controle	90	77	23	20	16,34	8,23	0,42
Alta concentração de bactérias – $8,4 \times 10^8$ bac/ml							
Cepas	Viabilidade 1h (%)	Viabilidade 8h (%)	Brotamento 1h (%)	Brotamento 8h (%)	ART (%)	°GL	ARRT (%)
1 (<i>gold</i>)	80	76	28	22	16,34	8,05	0,48
2 (<i>bim1</i>)	70	68	33	31	16,34	7,93	0,64
3 (<i>bim3</i>)	75	74	36	32	16,34	7,46	0,73
4 (<i>bim4</i>)	72	*	*	*	16,34	7,13	0,86
5 (<i>cer01</i>)	80	76	28	22	16,34	8,02	0,53
Controle	82	70	24	18	16,34	8,14	0,49

*muito floculada (não deu para fazer contagem)

Conforme ilustrado na Tabela 4, há um declínio considerável no °GL quando comparamos as cepas com baixa concentração de contaminação e alta concentração, de forma geral. Como forma de comparação, se for considerada a média de perda em 0,5%, aproximadamente, utilizando os dados do CONAB para a expectativa de produção de etanol em 2019/2020, tem-se uma perda aproximada de 170 milhões de litros de etanol no Brasil. Tal perda considera somente o aumento da concentração de bactérias (alta contaminação) durante a fermentação alcoólica. Outro ponto é a comparação entre °GL e o ARRT, que, de forma geral, são inversamente proporcionais em relação ao aumento da concentração de bactérias, ou seja, enquanto um diminui, o outro aumenta. Vale ressaltar que, quanto maior o ARRT, maior será a perda de açúcares na produção.

Tais resultados estão de acordo com a literatura levantada, cujos estudos apontam uma redução de até 30% na viabilidade da levedura fermentadora, valores similares encontrados na tabela, como exemplo a cepa de levedura bim1 (redução de 22,5% aproximadamente de viabilidade após 1h entre concentração baixa e alta) e a cepa de levedura bim 4 (redução de 20,0% aproximadamente de viabilidade após 1h entre concentração baixa e alta). (MAIA, 2019; NOBRE, 2005).

A Tabela 5 mostra qual a concentração inibitória mínima do crescimento do respectivo microrganismo. Quando não há uma ação inibitória no microrganismo, foi adicionado um traço. Conforme pode se observar, o pH ácido usado na usina, favorece a atividade dos antimicrobianos frente ao “pool de bactérias”.

Tabela 5 - Ensaios realizados com os antimicrobianos frente as bactérias gram + e a levedura Gold isoladas da usina 1. A concentração inicial dos antimicrobianos foi de 1000 mg/L.

Atividade antimicrobiana a pH 6,5						
Atividade (mg/L)	Bactérias Gram +	<i>S.cerevisiae</i> Gold	Lev. 11103	Lev. 2001	Lev. 22019	Lev. 90020
Chalcona	125	125	62,5	-	62,5	-
P. etila	1000	-	-	250	31	-
P. hex	125	250	125	-	-	-
P. propila	250	250	-	-	-	-
P. hep	31	15	-	-	-	-
Dióxido de cloro	250	250	-	1,95	-	-
Tetraciclina	15,6	-	-	-	-	-

Atividade antimicrobiana a pH 2,2						
Atividade (mg/L)	Bactérias Gram +	<i>S.cerevisiae</i> Gold	Lev. 11103	Lev. 2001	Lev. 22019	Lev. 90020
Chalcona	62,5	125	62,5	-	62,5	-
P. etila	31,2	-	-	250	31	-
P. hex	125	125	125	15,6	-	-
P. propila	125	125	-	-	-	-
P. hep	15	7,5	-	-	-	-
Dióxido de cloro	31,2	250	-	1,95	-	-
Tetraciclina	3,90	-	-	-	-	-

A observação mais contundente que se pode obter a partir da leitura da Tabela 5 é de que, de forma geral, as concentrações inibitórias diminuem em pH 2,2, em comparação à atividade dos mesmos produtos em pH 6,5. Tal resultado sugere que, além da atuação dos potenciais antimicrobianos, há também, a atuação da própria acidez do meio, em pH 2,2. Portanto, é necessário avaliar a seletividade dos antimicrobianos tanto em pH 2,2, praticado em cuba de tratamento, quanto em pH 6,5, pois em pH 2,2 pode haver interferência da própria acidez do meio, o que ocasiona uma perda significativa de precisão e confiabilidade ao realizar uma inferência estatística baseado somente em análise no pH 2,2.

Os produtos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana em pH 6,5 foi a chalcona, e o P.hex, porém, para o caso da chalcona, houve atividade para bactérias gram + e levedura *S. cerevisiae* em concentrações similares, ou seja, não há uma concentração segura onde este produto pode ser utilizado diretamente na dorna de fermentação sem afetar também a levedura, na produção de etanol. Os produtos P propila e P hep apresentaram atividades antimicrobianas tanto em bactérias, quanto na levedura *S. cerevisiae*, sendo que o P hep apresentou concentração menor, inclusive, para a levedura, o que inviabiliza ambos os produtos para uso como antimicrobiano para a descontaminação da fermentação alcoólica. Já o produto P. etila apresentou uma inibição a uma concentração relativamente alta, o que pode inviabilizar seu uso em Dorna de fermentação.

Quando se observam os resultados para o pH 2,2, há algumas mudanças no comportamento do produto chalcona em relação aos resultados com pH 6,5. Pode-se observar uma diferença na concentração inibitória mínima para bactérias Gram + e *S. cerevisiae* o que pode tornar viável seu uso na cuba de tratamento do fermento, além de exigir uma concentração menor para ter atividade inibitória, em comparação ao ensaio com pH 6,5.

Outra observação a ser feita é em relação ao produto P. etila que, além de não apresentar atividade inibitória para *S. cerevisiae*, acarretou uma queda significativa da concentração inibitória em pH 2,2, ao ser comparado com o mesmo em pH 6,5. Tais resultados para o produto P. Etila mostram que há uma possibilidade de utilizá-lo como um potencial antimicrobiano para a fermentação alcoólica. Devido ao fato de não possuir atividade contra *S. cerevisiae*, há uma boa margem de segurança para uso em escala industrial, tendo em vista que, devido ao grande volume utilizado de produto, podem haver problemas de medição ou mesmo de mistura, podendo aumentar a concentração do produto. Além disso, também pode-se observar que, tanto para pH 6,5 quanto para pH 2,2, o produto possui atividade antimicrobiana para cepas de leveduras selvagens, em especial para a Lev. 22019, que possui inibição em concentração similar para bactérias Gram +, em pH 2,2.

Os resultados para o produto P. etila estão próximos aos resultados obtidos pelo estudo conduzido por Mikłasińska e colaboradores (2015) em relação a diferentes cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*, que é uma bactéria Gram +. O estudo

obteve resultados de concentração inibitória mínima entre 64 e 1024 mg/L, e os resultados da Tabela 5 mostram resultados entre 31,2 e 1000 mg/L.

A tetraciclina e o dióxido de cloro foram utilizados como padrões de comparação.

Conforme esperado, a tetraciclina não apresentou atividade em leveduras, sendo seletiva a bactérias, a uma concentração relativamente baixa. O dióxido de cloro apresenta melhor atividade em pH 2,2, além de ter uma margem de concentração para uso sem afetar a *S. cerevisiae*, fato que não ocorre em pH 6,5.

A Tabela 6 mostra os resultados para a concentração inibitória mínima dos produtos em relação as leveduras e os “pool de bactérias” Gram + isoladas das 5 usinas de diferentes regiões do interior de São Paulo e sul de Minas Gerais. No caso, como os produtos P propila e P hep não apresentaram resultados satisfatórios para o pool de bactérias e a levedura comercial *S. cerevisiae*, os testes de CIM não foram realizados nestes produtos, pois não houve a necessidade de estudos mais apurados.

Tabela 6 - Ensaios realizados com os antimicrobianos frente as bactérias Gram + e as respectivas leveduras isoladas das usinas 2, 3, 4 e 5.

Atividade antimicrobiana a pH 6,5								
Atividade (mg/L)	Bactérias Gram + Usina 2	Levedura Bim 1 Usina 2	Bactérias Gram + Usina 3	Levedura Bim 3 Usina 3	Bactérias Gram + Usina 4	Levedura Bim 4 Usina 4	Bactérias Gram + Usina 5	Levedura Cer 01 Usina 5
Chalcona	250	500	500	-	500	-	125	125
P. etila	1000	-	1000	-	1000	-	1000	-
P. hex	250	250	500	-	250	-	125	125
Dióxido de cloro	125	250	250	-	125	-	125	250
Tetraciclina	7,5	-	15,6	-	7,5	-	15,6	-

Atividade antimicrobiana a pH 2,2								
Atividade (mg/L)	Bactérias Gram + Usina 2	Levedura Bim 1 Usina 2	Bactérias Gram + Usina 3	Levedura Bim 3 Usina 3	Bactérias Gram + Usina 4	Levedura Bim 4 Usina 4	Bactérias Gram + Usina 5	Levedura Cer 01 Usina 5
Chalcona	125	125	250	-	250	-	62,5	125
P. etila	31,2	-	31,2	-	62,5	-	31,2	-
P. hex	62,5	250	15,6	-	31,2	-	125	125
Dióxido de cloro	125	250	125	-	125	-	62,5	125
Tetraciclina	3,90	-	7,5	-	7,5	-	3,90	-

Os resultados da Tabela 6 demonstram, de forma geral, que há diferenças nas atividades dos produtos em relação a leveduras e bactérias de diferentes usinas, sugerindo morfologias distintas entre leveduras e bactérias nas diferentes regiões. As leveduras das usinas 3 e 4 apresentaram uma resistência adequada à atuação antimicrobiana de todos os produtos testados, já as leveduras das usinas 2 e 5 se mostraram mais susceptíveis aos produtos Chalcona, P hex e dióxido de cloro. Portanto, confirmou-se a necessidade de avaliação dos produtos em cada usina que possivelmente serão utilizados. Outra conclusão que se pode obter a partir dos dados apresentados é de que há uma importância em seleção de leveduras fermentadoras para as usinas, não somente pela sua produção de etanol, mas também sua resistência a produtos utilizados para a descontaminação da fermentação alcoólica.

Os produtos chalcona e P.hex apresentam resultados que variam de usina para usina, tanto em pH 6,5, quanto em pH 2,2. Enquanto nas usinas 2 e 5 há atividade inibitória tanto para bactérias Gram +, quanto para *S. cerevisiae*, nas usinas 3 e 4 só há atividade inibitória para esses produtos em bactérias Gram +. No caso do produto P. hex, há uma diferença significativa de concentração inibitória para bactérias Gram + e levedura na usina 2, em pH 2,2. Tais resultados sugerem que há a possibilidade de uso desses produtos como antimicrobianos na fermentação alcoólica, mediante a um estudo de caso prévio, ou seja, realizar análise para avaliar qual “pool de bactérias” está contaminando o processo, para garantir que o produto terá atividade somente sobre bactérias, não afetando a *S. cerevisiae*.

O produto P. Etila apresentou resultados similares para todas as Usinas, o que sugere que sua seletividade quanto a bactérias Gram + perdura mesmo com mudanças morfológicas nas mesmas. Também pode-se concluir que o produto não afeta a levedura *S. cerevisiae*, mesmo havendo mudanças morfológicas nelas.

De acordo com os estudos de Carvalho Tavares e colaboradores (2011), foi reportada uma atividade de chalconas em *Candida tropicalis* e *Cryptococcus gatii* a uma concentração inibitória mínima de 500 mg/L. No caso dos resultados das tabelas 5 e 6, houveram atividades em algumas leveduras fermentadoras (bim 1 e Gold), variando de 125 a 500 mg/L e outras leveduras se mostraram resistentes a atividade da chalcona (bim 3 e bim 4).

Ferraz e colaboradores (2020) estudaram a atividade da chalcona para concentração inibitória mínima em relação a bactéria *E. coli*, uma bactéria Gram -, chegando a um resultado de 256 mg/L. Os resultados mostrados nas tabelas 5 e 6 mostram que a atividade para bactérias Gram + são similares, variando de 125 a 500 mg/L, para pH 6,5.

No caso do dióxido de cloro, apesar de ser um biocida, ele é utilizado em usinas em dosagens adequadas, não prejudiciais a *S. cerevisiae*, como antibacteriano por não deixar resíduos na levedura seca, de acordo com Meneghin (2008). Ainda de acordo com Meneghin (2008), o dióxido de cloro possui concentração inibitória mínima para bactérias Gram + entre 10 e 125 mg/L, enquanto que para concentração inibitória mínima para leveduras, com 50 mg/L já há uma diminuição na viabilidade celular e, à 100 mg/L, já existe ação inibitória. Os resultados mostram concentrações inibitória similares, em especial no pH 2,2, porém em algumas leveduras, como as das Usinas 3 e 4, houve uma resistência frente ao dióxido de cloro.

Portanto, sugere-se que o dióxido de cloro possui atividade inibitória em concentrações similares tanto para bactérias, quanto para algumas leveduras, podendo levar a perdas de produtividade de etanol a médio e longo prazo para essas leveduras, enquanto para outras leveduras há a possibilidade de utilização do produto, sendo necessária uma análise de caso para poder ter uma avaliação melhor.

6 CONCLUSÃO

As análises da concentração bacteriana durante a fermentação alcoólica mostram que as altas perdas devido ao aumento da concentração da mesma, demonstram que há um grande potencial para se pesquisar novos produtos antimicrobianos para o controle de fermentação alcoólica.

Os resultados para a atividade antimicrobiana de diferentes produtos naturais mostraram que há a possibilidade de uso dos mesmos para o controle fermentativo industrial.

Para os produtos chalcona e P. hex, conclui-se que há a possibilidade de uso destes quando feito um estudo de caso para avaliar sua aplicabilidade, pois há casos onde tais produtos agem sobre a levedura do meio em concentração similar à atuação sobre as bactérias Gram +.

O produto P. etila pode ser utilizado sem a necessidade de avaliação de aplicabilidade, em particular para uso na cuba de preparo do fermento, onde o pH ácido auxilia o seu uso em concentrações mais baixas. Pois o volume de produto utilizado em usina, por se tratar de escala industrial, é relativamente alto, o que pode prejudicar o volume total da cuba ou dorna, além de tornar mais desafiador a logística de transporte e dosagem. Portanto, produtos com atuação a baixas concentrações, necessitam de volumes menores dosados na cuba ou dorna de fermentação.

Ao analisar de forma mais minuciosa a atuação de produtos antimicrobianos frente a diferentes leveduras de fermentação e pool de bactérias Gram + de diversas regiões do interior de São Paulo e sul de Minas Gerais, conclui-se que há diferenças morfológicas, tanto nas bactérias quanto nas leveduras fermentadoras, que influenciam na forma como os produtos atuam. Em específico, houveram leveduras fermentadoras de diferentes usinas que se mostraram susceptíveis a ação dos produtos chalcona e P. hex, e também houveram leveduras onde esses produtos não obtiveram atuação. O que se pode concluir que, além da seleção apropriada de produtos para a descontaminação bacteriana, é necessário selecionar leveduras fermentadoras capazes de resistir a atuação destes produtos, além de terem uma boa eficiência fermentativa.

Por fim, como sugestão para prosseguimento dos estudos já realizados, será necessário a avaliação dos produtos mais promissores em escala piloto, com condições mais similares às aquelas praticadas em usinas de açúcar e álcool, afim de avaliar o sinergismo do produto no meio fermentativo alcoólico.

Em caso de uma avaliação positiva em escala piloto, serão necessários testes em escala industrial, para, por fim, registrar o possível produto.

Uma vez aprovado em testes em escala industrial, ainda seria necessária uma análise mercadológica do custo/benefício do produto, tendo em vista seu apelo por ser um produto verde, que não causa danos ao ambiente, aumentando seu valor agregado.

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.

ALWAN, W.S.; KARPOORMATH, R.; PALKAR, M.B.; PATEL, H.M.; RANE, R.A.; SHAIKH, M.S.; KAJEE, A.; MLISANA, K.P. Novelimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 514-25, May 2015. ISSN 1768-3254.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de Análises e Monitoramento Microbiológico em Laboratório de Destilaria**. Araras: UFSCAR, Universidade de São Carlos, 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 leites na fase inicial. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1576-1581, 2006.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M. L. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BEGUM, N.A.; ROY, N; LASKAR, R.A.; ROY, K. Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure-activity relationship analysis. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 184-191, 2011.

BONATELLI, M.L.; IENCZAK, J.L.; LABATE, C. A. Sugarcane must fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: impact of sterilized and non-sterilized sugarcane must. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 1177–1187, 2019.

BORIA, I.; BOATTI, L.; PESOLE, G.; MIGNONE, F.; NGS-Trex. Next Generation Sequencing transcriptome Profile Explorer, **BMC Bioinformatics**, v.14, p.1-8, 2013.

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 “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

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.

CEISE Br. Disponível em: <<http://www.ceisebr.com/conteudo/o-setor-sucroenergetico-se-mantem-como-um-grande-empregador-e-gerador-de-renda.html>>. Acesso em: 23 fev. 2021.

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**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. (Rede e-Tec Brasil).

CONAB. Levantamento da Safra 2019/20. **Acompanhamento da Safra Brasileira de grãos**, v. 7, n. 4, p. 1-25, Janeiro 2020. Disponível em. <https://www.conab.gov.br>. Acessado em: 10 de Janeiro, 2020.

COSTA, M.C.; LEITÃO, A.L.; ENGUITA, F.J. Biogenesis and Mechanism of Action of Small Non-Coding RNAs: Insights from the Point of View of Structural Biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 10268–10295, 2012.

CUNHA, A.F.; MASSWA, F.K.; GOMES, L.H.; REIS, S.F.; PEREIRA, A.G. Control by sugar *saccharomyces cerevisiae* flocculation for industrial ethanol production, **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 280-287, 2006.

DE CARVALHO TAVARES, L.; JOHANN, S.; ALVES, T.M.A.; GUERRA, J.C.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CISALPINO, P.S.; BORTOLUZZI, A.J.; CARAMORI, G.F.; PICCOLI, R.M.; BRAIBANTE, H.T.; PIZZOLATTI, M.G. Quinoliny and quinoliny N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4448-4456, 2011.

DELLA-BIANCA, B.E.; BASSO, T.O.; STAMBUCK, B.U. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBANEZ, J.F.; TAUDA, O.; ESCOBAR, C.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 221–231, 2009.

FABRIS, L.; CALIN, G.A. Circulating free xeno-microRNAs – The new kids on the block. **Molecular Oncology**, v. 10. p. 503-08, 2016.

FARIA C. M.; NAZARÉ A. C.; PETRÔNIO M. S.; PARACATU, L. C.; ZERAIK, M L; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; DA FONSECA, L. M.; XIMENES V. F.; “Protocatechuic acid alkyl esters: hydrophobicity as a determinant factor for inhibition of NADPH oxidase,” **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 4885–4893, 2012.

FERRAZ, C.A.N. Potentiation of antibiotic activity by chalcone (E)-1-(4'-aminophenyl)-3-(furan-2-yl)-prop-2-en-1-one against gram-positive and gram-negative MDR strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, 104453, p. 1-5, 2020.

FINGUERUT J.; LUCREDI H.A.; LEIMER K.H. E ROSELL C.E.V. Controle microscópico do processo de fermentação alcoólica. **Boletim técnico Copersucar**, n. 34, p. 22-26, 1986.

GHORBANI F.; YOUNNESI H.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for contínuos etanol production in na immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renew Energy** 36, p.503-509, 2011.

HAMDI, N.; FISCHMEISTER, C. A rapid access to new coumarinyl chalcone and substituted chromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones and their antibacterial and DPPH radical scavenging activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 4, p. 522–530, 2011.

HRÁDKOVÁ, I.; MERKL, R.; SMIDRKAL, J.S.; KYSELKA, J.; FILIP, V. Antioxidant effect of mono- and dihydroxyphenols in sunflower oil with different levels of naturally present tocopherols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, p. 747–755, 2013.

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 Journal Analytical Chemistry**, v. 364, p. 358-361, 1999.

KWON, Y.I.; VATTEM, D.A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 107-118, 2006.

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

LEITE, 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 fermentations. **Fuel Processing Technology**, 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 bioethanol fermentations. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 46, n. 8, p. 709–714, 2011.

LIN, T.L.; LIN, H.H.; CHEN, C.C.; LIN, M.C.; CHOU, M.C.; WANG, C.; J. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. **Nutrition Research**, v. 27, n. 3, p. 140–145, 2007.

LIU, W.; HSU, C.; YIN, M. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of diallyl sulphides and protocatechuic acid. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 1, p. 53–57, 2008.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, A.R.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.C.; BERNARDINO, C.D.; NETO, H.B.A.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

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).

LUCENA, B.T.; DOS SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.L.; DE MORAIS, M. Diversity of

lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, v. 10, Article number: 298, 2010.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORRE, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution containing chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1449–1451, 2003.

MAIA, N.J.L.; CORRÊA, J.A.F.; RIGOTTI, R.T.; JUNIOR, A.A.S.; LUCIANO, F.B. Combination of natural antimicrobials for contamination control in ethanol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, Article number: 158, 2019.

MEDINA-ALARCÓN, K.P.L.; SINGULANI, J.; DUTRA, L.A.S.; PITANGUI, N.; PEREIRA-DA-SILVA, M.A.; DOS SANTOS, M.B.; AYUSSO, G.M.; REGASINI, L.O.; SOARES, C.P.; CHORILLI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal activity of 2'-hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Future Microbiology**, v. 15, p.21-33, 2020.

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 of microbiology**, v. 39, n. 2, p. 337-343, 2008.

MIKLASIŃSKA, M.; KĘPA, M.; WOJTYCZKA, R.; IDZIK, D.; ZDEBIK, A.; ORLEWSKA, K.; WASIK, T.J. Antibacterial Activity of Protocatechuic Acid Ethyl Ester on *Staphylococcus aureus* Clinical Strains Alone and in Combination with Antistaphylococcal Drugs. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13536–13549, 2015.

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.

OBSERVATÓRIO DA CANA - DETALHAMENTO DAS EXPORTAÇÕES DE ETANOL PELO BRASIL. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=74>>. Acesso em: 23 fev. 2021.

PACHECO-PALENCIA, L.A.; TALCOTT, S.T.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Absorption and Biological Activity of Phytochemical-Rich Extracts from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Pulp and Oil in Vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3593-3600, 2008.

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

SANTOS, M.B. **Híbridos chalcona-inibidores de histona desacetilase como agentes antiproliferativos: síntese e avaliação em células de mama e em histona desacetilases**. São José do Rio Preto, 2019. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp).

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.

SOARES, L.A.; GULLO, F.P.; SARDI, J.C.O.; PITANGUI, N.S.; COSTA-ORLANDI, C.B.; SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, F.; REGASINI, L.O.; PETRONIO, M.S.; SOUZA, P.F.; SILVA, D.H.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Anti-Trichophyton Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, Article ID 957860, 2014.

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

TEIXEIRA, A.M.R.; SANTOS, H.S.; BANDEIRA, P.N.; JULIÃO, M.S.S., FREIRE, P.T.C.; LIMA, V.N.; CRUZ, B.G.; DA SILVA, P.T.; COUTINHO, H.D.M.; SENA, D.M. Structural, spectroscopic and microbiological characterization of the chalcone 2E-1-(2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxyphenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en-1-one derived from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1179, p. 739-748, 2019.

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.

WILUSZ, J.E. Long noncoding RNAs. Re-writing dogmas of RNA processing and stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1859, p. 128-38, 2016.

WITWER, K.W.; HIRSCHI, K.D. Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates. Concepts in search of corroboration. **Bioessays**, v. 36, p. 394-06, 2014.

YADAV, H. L.; GUPTA, P.; PAWAR, R.S.; SINGOUR, P.K.; PATIL, U.K.. Synthesis and biological evaluation of anti-inflammatory activity of 1,3 diphenyl propenone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 4, p. 461–465, 2011.