

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO VEGETAL DE *Byrsonima intermedia* COMO
ALTERNATIVA NA INIBIÇÃO MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL POR VIA FERMENTATIVA**

ARLINDO JOSÉ LIMA DE CARVALHO

ORIENTADO POR: Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan

COORIENTADORA: Profa. Dra. Mariana Carina Frigeri Salaro

ARARAQUARA - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO VEGETAL DE *Byrsonima intermedia* COMO ALTERNATIVA NA INIBIÇÃO MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL POR VIA FERMENTATIVA

ARLINDO JOSÉ LIMA DE CARVALHO

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.

ORIENTADO POR: Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan

COORIENTADORA: Profa. Dra. Mariana Carina Frigeri Salaro

ARARAQUARA - SP

2020

C331a Carvalho, Arlindo José Lima de.
Avaliação do potencial do extrato vegetal de *Byrsonima intermedia* como alternativa na inibição microbiana durante o processo de produção de etanol por via fermentativa / Arlindo José Lima de Carvalho. – Araraquara: [S.n.], 2020.
85 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.

Orientador: Danilo Luiz Flumignan.
Coorientadora: Mariana Carina Frigeri Salaro.

1. Extrato vegetal. 2. Antimicrobiana. 3. Contaminantes. 4. Fermentação. I. Flumignan, Danilo Luiz, orient. II. Salaro, Mariana Carina Frigeri, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO VEGETAL DA *Byrsonima intermédia* COMO ALTERNATIVA NA INIBIÇÃO MICROBIANA DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL POR VIA FERMENTATIVA

AUTOR: ARLINDO JOSÉ LIMA DE CARVALHO

ORIENTADOR: DANILO LUIZ FLUMIGNAN

COORIENTADORA: MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN

Departamento das Áreas de Base Comum / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - IFMT Câmpus Cuiabá

Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 31 de agosto de 2020

Dedicatória

A todos meus familiares e amigos que sempre estiveram
ao meu lado, me incentivando e entendendo a razão da
minha ausência em momentos de reuniões e
confraternizações.

A Gisele, minha amiga e grande incentivadora, nessa
jornada a caminho do conhecimento contínuo.

E a todos, que estão vencendo as dificuldades
enfrentadas nesse momento de pandemia, mas que de
alguma forma, não mediram esforços para contribuírem
com essa minha conquista.

Agradecimentos

Ao meu Orientador Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan,
pela oportunidade.

A minha Coorientadora Profa. Dra. Mariana Carina
Frigeri Salaro, pela colaboração e paciência.

Aos professores, Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri e
Profa. Silmara Cristina Lazarini Frajácomo, pela imensa
contribuição e atenção.

A todos os docentes e funcionários da FCFar/UNESP,
em especial ao Departamento de Bioprocessos e
Biotecnologia, que sempre foram muito prestativos e
me ajudaram a vencer as barreiras encontradas pelo
caminho.

Sumário

1	Introdução	17
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
2.2.1	Obtenção dos extratos aquosos e hidroalcoólicos do vegetal;	21
2.2.2	Avaliação da solubilidade em água dos extratos obtidos;	21
2.2.3	Obtenção e manutenção de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e contaminantes de três usinas parceiras;	21
2.2.4	Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos vegetais <i>in vitro</i> pelo método hole plate;	21
2.2.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI);	21
2.2.6	Estudo do controle de microrganismos com o extrato vegetal, verificando os produtos obtidos, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), do vinho resultante da fermentação.	21
3	Revisão da literatura	22
3.1	Produtividade e perspectiva do setor sucroenergético	22
3.2	Processo fermentativo	31
3.3	Parâmetros tecnológicos do processo fermentativo	33
3.4	Controle microbiológico durante a produção de etanol	35
3.5	Controle microbiológico natural	38
3.6	<i>Byrsonima intermedia</i>	40
4	Material e métodos	44
4.1	Local de realização dos experimentos	44
4.2	Amostras vegetais	44
4.3	Preparo dos extratos vegetais	45
4.4	Determinação da solubilidade em água dos extratos	46
4.5	Microrganismos padrões	47
4.6	Obtenção das leveduras e dos contaminantes microbianos do processo fermentativo	47
4.7	Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos vegetais <i>in vitro</i>	48
4.8	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	50

4.9	Estudo do controle de microrganismos, verificando os produtos obtidos da fermentação	52
5	Resultados e discussão	58
5.1	Obtenção e avaliação da solubilidade dos extratos vegetais	58
5.2	Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos vegetais <i>in vitro</i>	59
5.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	62
5.4	Estudo do controle de microrganismos, verificando os produtos obtidos da fermentação	65
6	Conclusão.....	72
7	Referências.....	73

RESUMO

Durante o processo de fermentação industrial tradicional, ocorre a produção de bioetanol pela levedura a partir de um mosto açucarado, onde vários tipos de contaminações podem ocorrer prejudicando a obtenção do produto, dentre essas, a contaminação microbiana. O controle microbiológico do processo requer um tratamento diferencial, onde é necessário controlar os contaminantes, sem, no entanto, afetar a ação das leveduras selecionadas. Atualmente, estão sendo estudadas formas naturais de controle que atendem aos requisitos de produção sem afetar adversamente o meio ambiente ou impedir o comércio subsequente dos subprodutos gerados. Diante desta realidade o presente trabalho procurou uma alternativa que contribuísse para o controle da contaminação no processo fermentativo, utilizando extratos aquoso e hidroalcoólico do vegetal *Byrsonima intermedia*, uma planta típica do cerrado brasileiro. Inicialmente, foi determinada a atividade antibacteriana in vitro e a concentração mínima inibitória (CIM), onde ambos extratos mostraram ser efetivos em baixas dosagens para amostras bacterianas isoladas de processos fermentativos diferentes, apresentando halos que variaram de 9,26 mm a 15,70 mm e a CIM entre 2,5 mg.mL⁻¹ a 0,156 mg.mL⁻¹. Os ensaios diretamente no processo fermentativo foram realizados utilizando apenas com o extrato aquoso, o qual apresentou resultados de eficiência fermentativa (65,02%) enquanto o produto comercial atualmente empregado (62,43%), esse ganho de 2,59% gera, para cada 100 milhões de litros de etanol produzido, um adicional de 2,59 milhões de litros de etanol e uma margem bruta adicional de R\$4,7 milhões, podendo ser uma alternativa para o controle microbiano em processos fermentativos para a produção de bioetanol por possuir qualidades desejáveis como viabilidade econômica e facilidade de solubilização.

Palavras-chave: Extrato vegetal. Antimicrobiana. Contaminantes. Fermentação.

ABSTRACT

During the traditional industrial fermentation process, yeast bioethanol is produced from a little sugar, where various types of contamination can impair the use of the product, such as microbial contamination. The microbiological control of the process requires a differential treatment, where it is necessary to control the contaminants, without, however, applying an action of the selected changes. Currently, natural forms of control that meet production requirements are being studied without adversely affecting the environment or preventing subsequent trade in the generated by-products. Faced with this reality or present work, you are looking for an alternative that contributes to the control of contamination in the fermentation process, using aqueous and hydroalcoholic extracts from the vegetable *Byrsonima Intermedia*, a typical plant from the Brazilian cerrado. Initially, an antibacterial activity was provided in vitro and the minimum inhibitory concentration (MIC), where the two affected extracts will be effective in low doses for the bacterial processes of different fermentation processes, represented halos that ranged from 9.26 mm to 15.70 mm and MIC between 2.5 mg.mL⁻¹ to 0.156 mg.mL⁻¹. The tests directly in the fermentation process were carried out using only the aqueous extract, which showed results of fermentative efficiency (65.02%), while the commercial product currently employed (62.43%), this gain of 2.59% generates , for every 100 million liters of ethanol produced, an additional 2.59 million liters of ethanol and an additional gross margin of R \$ 4.7 million, which may be an alternative for microbial control in fermentation processes for the production of bioethanol for having desirable qualities such as economic viability and ease of solubilization.

Keywords: Vegetable extract. Antimicrobial. Contaminants. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mix de Produção de Açúcar e Etanol – Safra 2008/09 até 2018/19.....	26
Figura 2. Evolução mensal da produção anual brasileira de bioetanol.....	27
Figura 3. Processo bioquímico de fermentação etanólica.....	32
Figura 4. Esquema da produção brasileira de bioetanol.....	34
Figura 5. Biomas no Estado de São Paulo.....	41
Figura 6. <i>Byrsonima intermedia</i>	42
Figura 7. Obtenção dos extratos vegetais hidroalcoólico e aquoso.....	45
Figura 8. Fluxograma da obtenção dos microrganismos.....	48
Figura 9. Etapas realizadas na avaliação pelo método Hole plate.....	49
Figura 10. Fluxograma da avaliação do potencial antimicrobiano in vitro.....	49
Figura 11. Esquema do procedimento realizado na avaliação da CIM.....	51
Figura 12. Fluxograma do processo fermentativo realizado.....	54
Figura 13. Cromatograma obtido para a amostra C do tratamento 4.....	56
Figura 14. Fluxograma do preparo das amostras e análise no HPLC.....	57
Figura 15. Não observação de halo para levedura em extrato aquoso.....	60
Figura 16. Avaliação da CIM para o extrato hidroalcólico de <i>Byrsonima intermedia</i>	62
Figura 17. Avaliação da CIM para o extrato aquoso de <i>Byrsonima intermedia</i>	63
Figura 18. Cálculo do rendimento teórico (Y_t) a partir da reação de Gay-Lussac.....	68
Figura 19. Eficiência fermentativa (%) e o ganho em pontos percentuais.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de bioetanol, consumo e preços médios dos antibióticos durante a safra de 2019/20 de três usinas produtoras do Estado de São Paulo.....	18
Tabela 2. Etanol – Indicador mensal etanol hidratado combustível CEPEA/ESALQ – São Paulo.....	19
Tabela 3. Produção anual mundial de bioetanol combustível (Mil.m ³)	24
Tabela 4. Moagem de Cana-de-Açúcar no Brasil nas Últimas Cinco Safras.....	28
Tabela 5. Produção de biotanol no Brasil por safra.....	28
Tabela 6. Perspectiva de oferta interna de Energia – Brasil e Mundial no ano de 2025.....	30
Tabela 7. Substituição de M _{TEP} por Derivados da Cana.....	30
Tabela 8. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no mundo.....	37
Tabela 9. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no Brasil.....	37
Tabela 10. Quantidades de amostra e de solventes utilizados para avaliação da solubilidade.....	46
Tabela 11. Termos descritivos para expressar a solubilidade.....	46
Tabela 12. Tempo de eluição das substâncias de interesse por HPLC.....	57
Tabela 13. Solubilidade de extratos vegetais em termos descritivos.....	58
Tabela 14. Medida dos halos de inibição obtida para os microrganismos padrão....	60
Tabela 15. Medida dos halos de Inibição para microrganismos isolados do processo de fermentação.....	61
Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima dos extratos.....	63
Tabela 17. Resultado das análises por cromatografia líquida (HPLC).....	65
Tabela 18. Açúcares fermentescíveis totais e consumo para conversão em produtos da fermentação.....	66
Tabela 19. Açúcar total consumido e Etanol produzido.....	66

Tabela 20. Análise estatística das variáveis da Tabela 19.....	66
Tabela 21. Produção de etanol – g.100g ⁻¹ de açúcar total	67
Tabela 22. Eficiência fermentativa.....	68
Tabela 23. Produção de ácido succínico na fermentação.....	70
Tabela 24. Produção de ácido succínico na fermentação – g.100g ⁻¹ de açúcar total.....	70
Tabela 25. Produção de glicerol na fermentação.....	70
Tabela 26. Produção de glicerol na fermentação – g.100g ⁻¹ de açúcar total.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Collection Culture

ATP: Adenosina Trifosfato

BHI: Brain Heart Infusion

Bi US\$: Bilhões de dólares

BIOTA: Programa da FAPESP de Pesquisas em Caracterização, Conservação, Restauração e Uso Sustentável da Biodiversidade

Brix: Índice refratométrico utilizado para indicar a quantidade de compostos solúveis

CBIO: Crédito de Descarbonização

CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical Lab Standards Institute

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CV: Coeficiente de variação

DDD: Dose Diária Definida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPE: Empresa de Pesquisa Energética

et al.: e outros

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FATEC: Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo

g: Grama

G_{TEP}: Bilhões de toneladas de petróleo equivalente

h: Horas

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HUEC: Herbário UEC da Unicamp

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFSP: Instituto Federal de São Paulo

IQ: Instituto de Química

L: Litro

LCFS: Low Carbon Fuel Standart

m³: Metros cúbicos

mg: miligramas

Mix: Mistura

mL: Mililitros

mm: milímetros

MMA: Ministério do Meio Ambiente

M_{TEP}: Milhões de toneladas de petróleo equivalente

N: normal

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

ns: Não significativo

°C: Graus Celsius

OD: Densidade ótica

OMS: Organização Mundial de Saúde

p: Peso

PDAs: antimicrobianos de origem vegetal

pH: Potencial Hidrogeniônico

R\$: Reais

RED: Diretiva da União Européia

RenovaBio: Política Nacional de Biocombustíveis, instituída pela Lei nº 13.576/2017

RFA: Renewable Fuels Association

RFS: Renewable Fuel Standard

Sp.: espécie

UFC: Unidades formadoras de colônia

UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNICA: União da Indústria de Cana-de-açúcar

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

US\$: Dólares

WHO: World Health Organization

Y_P : Rendimento prático

YPD: Yeast Peptone Dextrose

Y_t : Rendimento teórico

μL :

Microlitros

1 Introdução

O processo fermentativo é a principal via de obtenção do etanol através da oxidação dos monômeros de açúcar pelas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (NIELSEN *et al.*, 2013; AZHAR *et al.*, 2017). Para que este processo se realize é preparado o mosto, o qual pode ser procedente do caldo de cana e/ou melaço gerando um ambiente com teor de açúcar e pH ajustados para favorecer o processo fermentativo e inibir o processo respiratório nas leveduras (DELLA-BIANCA *et al.*, 2013). Porém, essas mesmas condições também facilitam o desenvolvimento de uma série de microrganismos contaminantes como bactérias e leveduras selvagens (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011), os quais são facilmente assimilados durante todo o processo, desde a colheita, armazenamento e processamento da matéria-prima (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), até pela água de diluição do mosto e pelos equipamentos e tubulações do próprio processo (OLIVEIRA *et al.*, 2013; BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A presença de microrganismos contaminantes resulta em queda no rendimento fermentativo e o controle torna-se de fundamental importância para o setor produtivo (NAVES *et al.*, 2010). O controle bacteriano no processo é feito pela adição de ácido sulfúrico, porém para altos níveis de contaminação é realizada a utilização de antibióticos (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), no entanto esse uso inviabiliza o comércio posterior da levedura seca para alimentação animal e outros fins, por deixarem resíduos nas células (FREITAS; ROMANO, 2013).

Além disso, o gasto com antibióticos torna-se um dos grandes desafios do processo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017) e a busca por formas alternativas de controle

passa a despertar muito interesse (CAETANO; MADALENO, 2011; MADALENO *et al.*, 2016; RICH *et al.*, 2018).

Os produtos naturais derivados de vegetais possuem grande potencial ao desenvolvimento de produtos de interesse por serem, atualmente, a principal fonte de novas moléculas químicas bioativas (ANAND, *et al.*, 2020).

Na pesquisa econômica realizada no mês de setembro de 2020 com três usinas produtoras de bioetanol, uma da região nordeste (Usina 1) e outras duas da região noroeste (Usina 2 e Usina 3) do Estado de São Paulo, foi possível verificar a produção de bioetanol, consumo e preços médios dos antibióticos utilizados, Tabela 1, durante a safra, encerrada, de 2019/20.

Tabela 1. Produção de bioetanol, consumo e preços médios dos antibióticos durante a safra de 2019/20 de três usinas produtoras do Estado de São Paulo.

Usina	Bioetanol produzido (m ³)	Consumo de antibióticos (kg)	Preço médio (R\$/kg)
Usina 1	108.580	76	370,15
Usina 2	208.834	790	351,79
Usina 3	86.725	160	330,42
Total/Média	404.139	1.026	349,82

Fonte: Dados da pesquisa.

Os preços médios mensais do etanol hidratado combustível, posto usina (sem frete, sem ICMS e PIS/Cofins zerados), durante o ano safra 2019/20, com início em 01/04/2019 e término em 31/03/2020, Tabela 2, apurados pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, (CEPEA), que possibilita calcular o preço médio, com comercialização linear mês a mês, no valor de 1,8305 reais por litro.

Tabela 2. Etanol – Indicador mensal etanol hidratado combustível CEPEA/ESALQ – São Paulo

Data	Preço à vista (R\$/litro)
04/2019	1,8148
05/2019	1,6449
06/2019	1,6177
07/2019	1,6736
08/2019	1,7291
09/2019	1,7146
10/2019	1,803
11/2019	1,9089
12/2019	1,9985
01/2020	2,0677
02/2020	2,1182
03/2020	1,8751
Preço médio	1,8305

Fonte: CPEA/ESALQ – São Paulo. Tabela adaptada.

Análise de viabilidade econômica da substituição de antibióticos comerciais pelo extrato vegetal, foi possível utilizando os resultados do presente trabalho. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida com o extrato aquoso da *Byrsonima intermedia*, foi de 1,25 mg.mL⁻¹, Tabela 16, enquanto que o produto comercial Kamoran® é utilizado na dosagem de 6 ppm, então a relação de quantidade de produtos para o tratamento de 1 milhão de m³ de vinho fermentado é de 6 kg para o Kamoran® e 1.250 kg para o extrato vegetal, na Tabela 1, o consumo de antibióticos para a produção de 404.139 m³ de etanol foi de 1.026 kg, fazendo o cálculo, chega-se em um consumo de 253,87 kg de antibióticos comerciais para o tratamento do vinho necessário para a produção de 100.000 m³ de etanol, essa quantidade de antibiótico comercial equivale a 52.882 kg de extrato vegetal aquoso de *Byrsonima intermedia*, pois a quantidade necessária de extrato vegetal para o tratamento do fermento é de 208,3 vezes a do antibiótico comercial, ou seja 1.250 kg do extrato

equivale a 6 kg antibiótico comercial, com os dados da Tabela 1, foi possível verificar que a cada m³ de etanol produzido é gasto R\$0,89 com o uso de antibióticos comerciais.

O preço médio dos antibióticos obtidos na pesquisa, Tabela 1, foi de 349,82 R\$/kg, calculando o valor para 6 kg, obtém-se 2.098,92 reais e dessa forma é possível calcular o valor por quilo do extrato vegetal dividindo 2.098,92 reais por 1.250 kg que resulta em 1,68 R\$/kg, portanto esse é o valor do preço por quilo do extrato vegetal posto na usina, preço de equilíbrio.

O extrato vegetal da *Byrsonimia intermedia*, obteve uma eficiência fermentativa de 65,02% enquanto que para produto comercial foi de 62,43%, Figura 19, esse ganho de 2,59%, diferença entre as duas eficiências fermentativas, obtido pelo extrato vegetal, aplicando esse percentual em um volume de 100 milhões de litros de etanol produzido, teremos um ganho de produção, volume adicionado, de 2,59 milhões de litros, isso, utilizando a mesma capacidade de processamento e com o mesmo volume de mosto utilizado para a fermentação. O preço médio do litro do etanol hidratado combustível, recebido pelas usinas na safra de 2019/20, foi de 1,8305 reais por litro, Tabela 2, fazendo o cálculo do volume adicionado de 2,59 milhões de litros ao preço de 1,8305 R\$/L chegaremos a margem bruta, sem desconto de frete, armazenagem e impostos, de R\$ 4.740.995 por safra com o mesmo volume de vinho utilizados para a produção de 100 milhões de litros de etanol

Diante desta realidade o presente trabalho procurou uma alternativa que contribuísse para o controle da contaminação no processo fermentativo, utilizando extratos do vegetal *Byrsonimia intermedia*, planta de origem do cerrado brasileiro.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi a avaliação do potencial do extrato vegetal da *Byrsonima intermedia*, planta do cerrado, como alternativa na inibição microbiana durante o processo de produção de etanol por via fermentativa.

2.2 Objetivos Específicos

O controle de microrganismos contaminantes foi ensaiado pelo emprego de extratos vegetais de *Byrsonima intermedia*, objetivando-se a realização das seguintes etapas:

- 2.2.1 Obtenção dos extratos aquosos e hidroalcoólicos do vegetal;
- 2.2.2 Avaliação da solubilidade em água dos extratos obtidos;
- 2.2.3 Obtenção e manutenção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e contaminantes de três usinas parceiras;
- 2.2.4 Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos vegetais *in vitro* pelo método hole plate;
- 2.2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI);
- 2.2.6 Estudo do controle de microrganismos com o extrato vegetal, verificando os produtos obtidos, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), do vinho resultante da fermentação.

3 Revisão da literatura

3.1 Produtividade e perspectiva do setor sucroenergético

No mundo moderno a necessidade do deslocamento da produção e das pessoas faz com que os combustíveis sejam intensamente utilizados, porém o uso de combustíveis fósseis tem sido questionado devido à sua finitude e efeitos adversos causados ao ambiente, como aumento dos gases de efeito estufa gerando aquecimento global, mudanças climáticas com possíveis alterações do nível do mar, da biodiversidade, aumento da poluição urbana entre outros (ZABED *et al.*, 2017). Neste sentido, há uma crescente demanda pelo uso de combustíveis alternativos que proporcionem segurança energética e ambiental, impulsionando os estudos recentes devido a serem oriundos de fontes renováveis ou até mesmo de resíduos gerados pela ação humana, degradação natural de frutas e outros vegetais ou da produção industrial (BHATIA; JOHRI; AHMAD, 2012; SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, no Brasil 45% da energia e 18% dos combustíveis provêm de fontes renováveis, enquanto que, no restante do mundo 86% da energia é obtida de fontes não renováveis (ANP, 2020a).

Dentre as alternativas energéticas para a diminuição da dependência de combustíveis fósseis surge o bioetanol, o qual pode ser obtido a partir de diversas fontes que contenham quantidade apreciável de carboidratos (ZABED *et al.*, 2017). O Brasil foi pioneiro nesta aplicação (ANP, 2020a), porém devido à facilidade de obtenção e ao baixo custo de produção, a utilização dessa alternativa energética

tem aumentado em nível global (RFA, 2020), tanto para uso direto como combustível ou adicionado à gasolina (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

O bioetanol produzido no Brasil, destina-se principalmente ao mercado interno e à exportação para os países da União Europeia, Estados Unidos e China (VIDAL, 2019). Atualmente a obtenção deste biocombustível é realizada através de fontes primárias contendo açúcares simples (biomassa açucarada) e amido (biomassa amilácea), gerando o bioetanol referido como de primeira geração e também de fontes de biomassa lignocelulósica e algas, gerando, o bioetanol referido como de segunda e terceira geração (ZABED *et al.*, 2017).

Na Tabela 3 é possível verificar a produção mundial de bioetanol combustível (RFA, 2020). O Estados Unidos é o maior produtor mundial de bioetanol, responsável por 54% do total produzido, sendo que sua maior produção é de bioetanol de primeira geração através do uso do milho (biomassa amilácea) como matéria prima. O Brasil é o segundo maior produtor em nível mundial, responsável por 30% do total, sendo que a maior produção nacional também é de bioetanol de primeira geração, porém utilizando fontes açucaradas como o caldo de cana ou o melaço (resíduo da produção de açúcar) para obtenção do mosto, onde os açúcares fermentescíveis que serão convertidos em bioetanol, estão prontamente disponíveis para o processo fermentativo (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Tabela 3. Produção anual mundial de bioetanol combustível (Mil.m³)

País	2015	2016	2017	2018	2019	% da produção mundial
Estados Unidos	56.051	58.345	60.324	60.911	59.719	54%
Brasil	27.255	25.589	25.287	30.321	32.441	30%
União Européia	5.250	5.213	5.300	5.413	5.451	5%
China	3.078	3.199	3.255	3.975	3.407	3%
Canadá	1.650	1.650	1.779	1.817	1.893	2%
Índia	738	1.041	795	1.514	2.006	2%
Tailândia	1.264	1.219	1.401	1.476	1.590	1%
Argentina	799	999	1.098	1.098	1.098	1%
Outros países	1.480	1.855	1.567	2.078	2.271	2%
Total	97.565	99.110	100.806	108.603	109.875	

Fonte: RFA, (2020). Tabela adaptada.

A utilização da cana de açúcar para obtenção da matéria prima a ser fermentada é atrativa, uma vez que proporcionam um alto rendimento de açúcar e durante a sua utilização industrial acaba gerando outros subprodutos de interesse para a manutenção da própria produção industrial ou mesmo para transações comerciais, como no caso da palha e do bagaço, os quais podem ser utilizados na caldeira para gerar a energia que manterá o processo industrial ativo ou poderá ser utilizado como uma fonte de biomassa para obtenção de etanol de segunda geração; a vinhaça, a qual pode ser utilizada para fertirrigação e para a obtenção de biogás; a torta de filtro que pode ser utilizada na adubação agrícola. A cadeia produtiva de etanol a partir da cana de açúcar gera como perspectiva a

transformação das unidades industriais em biofábricas, com a produção integrada de vários produtos de interesse comercial.

Neste cenário mundial também aparece a mandioca e batata doce (biomassa amiláceas) como potenciais matérias primas para produção de bioetanol, as quais não necessitam de grande fertilidade do solo para o seu cultivo e o uso da biomassa lignocelulósica resultante de culturas energéticas, plantas aquáticas, materiais florestais, resíduos agrícolas, urbanos e industriais entre outros, os quais são abundante em todo o mundo e permitem, na grande maioria, a obtenção de etanol sem a necessidade da utilização novas de áreas de plantio e sem interferir na produção de alimentos e forragens (ZABED *et al.*, 2017). O potencial do uso do sorgo sacaríneo como fonte de biomassa açucarada também tem sido avaliado (MASSON, *et al.*, 2015)

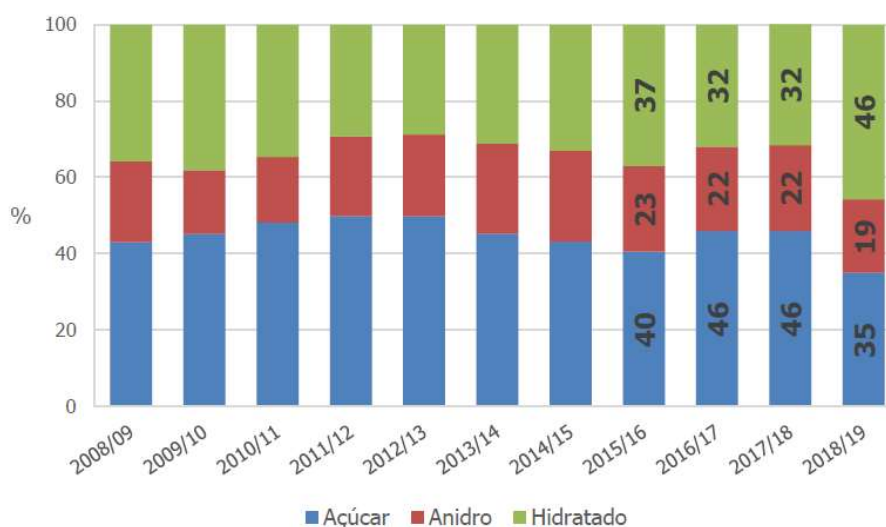
O uso do bioetanol é um dos mais promissores devido a introdução de motorização híbrida no mercado, onde o motor a combustão usa a tecnologia flex fuel, que utilizam mistura de 0% a 100% de etanol e gasolina (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A demanda por esse biocombustível atualmente também é impulsionada pelo desenvolvimento de políticas governamentais em diversos países visando o estímulo da produção e utilização de fontes renováveis de energia (VIDAL, 2019). A União Europeia através da diretiva 2009/28/CE, a qual trata da promoção da utilização de energia de fontes renováveis conhecida como RED I, estabeleceu metas para a produção e utilização de energias renováveis em 2020, posteriormente com a Diretiva (UE) 2018/2001 (RED II), foi estabelecida a meta de, pelo menos, 32 % de energia renovável no consumo final bruto de energia até 2030 (EUROPEIA, 2019). Nos Estados Unidos, segundo a Low Carbon Fuel Standart (LCFS) a meta é de

reduzir as emissões dos gases de efeito estufa em 20% até 2030 e segundo Renewable Fuel Standard (RFS) a perspectiva seria a produção de um volume de 36 bilhões de galões (cerca de 136 bilhões de litros) de combustíveis renováveis em 2022 (ROITMAN, 2019).

No Brasil, no final do ano de 2017 foi criada, através da Lei 13.576, a Política Nacional de Biocombustíveis, conhecida como RenovaBio, a qual visa, entre outros objetivos, estimular a redução das emissões de gases de efeito estufa através do incremento no uso de biocombustíveis na matriz energética nacional (BRASIL, 2017).

A produção de etanol variava mais em função dos preços do açúcar no mercado externo do que em relação a produção de cana-de-açúcar, pois o setor possuía uma flexibilidade para a produção de açúcar ou etanol, que pode variar de 50% para qualquer um dos produtos ou até para 65% de produção de etanol e 35% de açúcar conforme ilustra o gráfico da Figura 1.

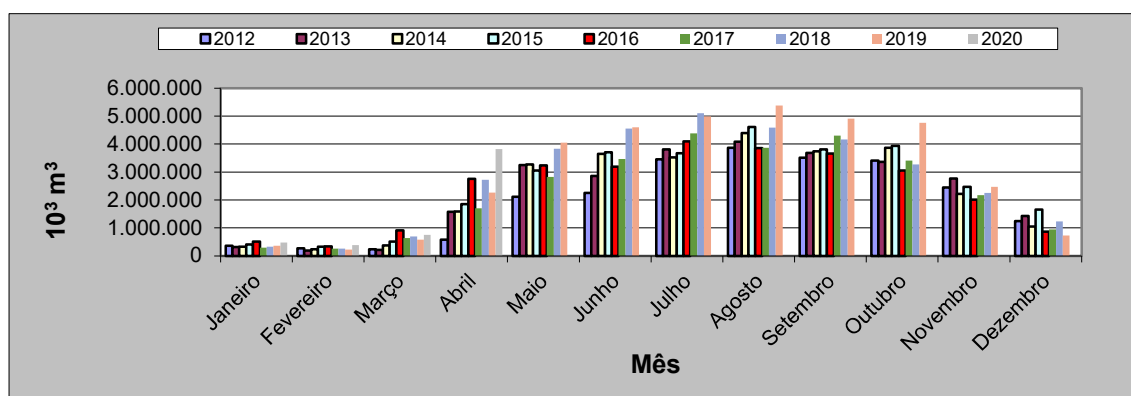


Fonte: EPE, 2019.

Figura 1. Mix de produção de açúcar e etanol – Safra 2008/09 até 2018/19

A adoção desta política visa o desenvolvimento de mecanismos que garantam a previsibilidade na produção necessária para atrair investimentos, de forma a conectar sustentabilidade ambiental, social e econômica. Através desta Lei foram estabelecidas metas a serem alcançadas até 2030 e também a criação do CBIO (Crédito de Descarbonização), os quais são títulos financeiros que deverão ser adquiridos pelos distribuidores de combustíveis para compensar suas emissões e cumprir as metas de descarbonização estipuladas anualmente. Investidores também podem adquiri-los e a expectativa é que se torne uma commodity mundial (GRASSI; PEREIRA, 2019). Assim, esse programa visa retomar os incentivos para o aumento da produtividade nacional, uma vez que propõe uma certa segurança econômica para os produtores.

Na Figura 2 é possível acompanhar a evolução mensal da produção nacional anual de bioetanol e observar que há um incremento na produção brasileira nos meses de abril à novembro, correspondentes aos meses de colheita da cultura da cana. Considerando o mês de abril, no ano corrente teve a maior produção dos últimos nove anos.



Fonte: ANP, 2020b.

Figura 2. Evolução mensal da produção anual brasileira de bioetanol

A Tabela 4 mostra os dados de moagem de cana e a Tabela 5 os dados da produção de bioetanol durante o ano separado por safra (abril a março) e por região produtora. É possível verificar o predomínio da produção nacional na Região Centro-Sul do país, a qual na safra anterior foi responsável pela obtenção de 93,4% do total produzido.

Tabela 4. Moagem de Cana-de-Açúcar no Brasil nas Últimas Cinco Safras

Moagem de Cana-de-Açúcar Safras – 2015/2016 até 2019/2020 (Mil toneladas)					
Safra	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020
Região Centro-Sul	617.709	607.137	596.260	573.125	590.361
Região Norte-Nordeste	49.115	44.704	44.806	47.707	52.316
Brasil	666.824	651.841	641.066	620.832	642.677

Fonte: UNICA, (2020). Tabela adaptada.

Tabela 5. Produção de biotanol no Brasil por safra

Etanol Total – 2015/2016 até 2019/2020 (Mil m³)					
Safra	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020
Região Centro-Sul	28.225	25.651	26.088	30.953	33.258
Região Norte-Nordeste	2.008	1.603	1.771	2.150	2.337
Brasil	30.232	27.254	27.859	33.103	35.595

Fonte: UNICA, (2020). Tabela adaptada.

Além da produção relatada, o país tem adotado outras formas de obtenção do bioetanol na tentativa de aumentar essa produção e corresponder às expectativas do RenovaBio, como a obtenção de etanol de milho a partir do milho e o desenvolvimento e consolidação das tecnologias de segunda geração, que permitirão o aumento da produtividade, sem aumentar a área destinada ao plantio,

por meio de culturas de cana especializadas em energia, como a Cana Energia e resíduos agrícolas (GRASSI; PEREIRA, 2019).

A região Centro-Oeste brasileira, produtora de grãos, tem apresentado um crescente aumento produção de etanol devido à disponibilidade da matéria-prima e a possibilidade de aproveitamento do complexo produtor de etanol a partir da cana também na entressafra para produção a partir do milho (VIDAL, 2019). A produção de etanol a partir do milho no Brasil é destacada como um importante propulsor do desenvolvimento energético, econômico, social e ambiental na produção, minimizando perdas em logística e exportação de grãos (ECKERT, *et al.*, 2018). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a estimativa nacional de plantio do milho, na temporada 2019/20, deve apresentar uma produção recorde de 101 milhões de toneladas (CONAB, 2020a), sendo a região Centro-Oeste responsável por cerca de 95% da produção de etanol a base de milho, considerando a estimativa de produção para a safra 2020/21 de 2,7 bilhões de litros no país, dos quais 2,56 bilhões nessa região, distribuídos entre Mato Grosso e Goiás (CONAB, 2020b).

O aumento da produção de bioetanol impulsionado pelas políticas públicas contribui para a transição energética na qual o mundo deve se ajustar e em especial no Brasil, já fez parte, junto com a energia advinda de outras fontes renováveis, 45% da matriz energética brasileira em 2018 (EPE, 2019).

A Tabela 6 apresenta uma perspectiva da fonte de energia a ser utilizada no Brasil e no mundo no ano de 2025. É possível verificar o destaque do Brasil em relação ao cenário mundial no que diz respeito ao uso de energias renováveis.

Tabela 6. Perspectiva de oferta interna de Energia – Brasil e Mundial no ano de 2025

Fonte de Energia	Brasil	Fonte de Energia	Mundial
Energia Não Renovável	51,2%	Energia Não Renovável	82,7%
Derivados da Cana	20,2%	Bioenergia Moderna	6,9%
Hidráulica e Eletricidade	13,6%	Hidráulica	3,0%
Lenha e Carvão Vegetal	7,4%	Biomassa Sólida	2,8%
Outras Renováveis	5,0%	Outras Renováveis	4,6%
Eólica	2,2%		
Solar	0,5%		
Total	333,8 M _{TEP}	Total	14,1 G _{TEP}

Fonte: EPE, 2019. Tabela adaptada.

Com base na tabela acima, foi possível calcular a participação dos derivados da cana em M_{TEP} (Milhões de toneladas de petróleo equivalente) com o incremento projetado para 2025 de 57,4% conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Substituição de M_{TEP} por Derivados da Cana

Incremento na Substituição de M _{TEP} por Derivados da Cana			
Ano	Total M _{TEP}	Derivados da Cana	Substituição de M _{TEP}
2008	252,0	17,0%	42,8
2018	288,0	17,4%	50,1
2025	333,8	20,2%	67,4
Incremento na substituição de M _{TEP} de 2008 a 2025			57,4%

Fonte: Dados da pesquisa.

O Brasil ocupa um espaço considerável no perfil energético mundial, principalmente pelo caráter renovável da sua matriz, advindo de seu potencial, e, em especial, das políticas públicas que incentivam a segurança energética nacional com o uso dos recursos renováveis. Assim, a matriz energética brasileira acaba sendo modelo e incentivo para muitos países na adoção de energias renováveis, como o bioetanol.

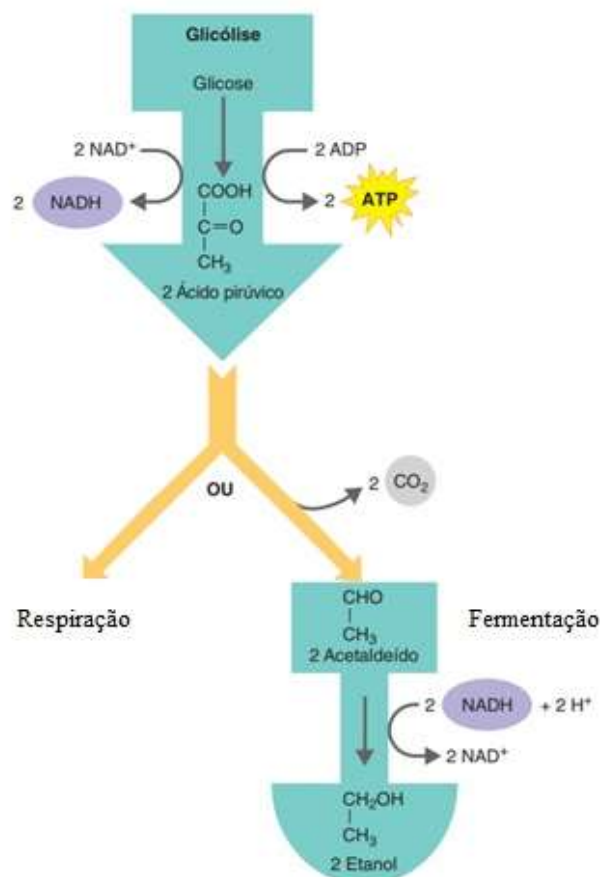
3.2 Processo fermentativo

Através do processo fermentativo tradicional é que ocorre a obtenção da maior parte (90-95%) do bioetanol mundial (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016), por ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual metaboliza os açúcares (hexoses) solúveis disponíveis, gerando neste processo, além do bioetanol, dióxido de carbono.

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular (ascomiceto) anaeróbico facultativo, podendo obter energia para sua sobrevivência através da respiração aeróbica ou através da fermentação. Na respiração aeróbica ocorre a produção de 18 a 19 vezes mais energia biologicamente utilizável disponível para a levedura do que na fermentação, sendo assim, a respiração um processo mais benéfico, em termos energéticos, do que a fermentação para a levedura (SARRIS; PAPANIKOLAOU, 2016).

Baixas concentrações de glicose favorecem o processo respiratório e a produção de biomassa, sendo essas condições utilizadas para a produção industrial de leveduras secas selecionadas. No entanto, mesmo na presença de oxigênio, se a concentração de açúcar for maior que um valor crítico (por exemplo, 9 g.L⁻¹) a respiração torna-se impossível e apenas ocorre a metabolização dos açúcares pela via fermentativa (PRONK; YDE STEENSMA; VAN DIJKEN, 1996).

A hexose assimilada pela célula sofre o processo de glicólise gerando duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e duas moléculas da coenzima reduzida NADH. Na respiração, a molécula de piruvato é direcionada para o ciclo de Krebs, onde será totalmente oxidada. Na fermentação etanólica, o piruvato é convertido, em acetaldeído, o qual sofre rearranjo molecular para formar a molécula de etanol, com utilização de NADH (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). A molécula de etanol pode ser utilizada como fonte de energia, pois ainda concentra a maior parte da energia da molécula de glicose que não foi totalmente oxidada neste processo. A Figura 3 apresenta um esquema do processo de fermentação etanólica.



Fonte: TORTORA; CASE; FUNKE, 2016. Figura adaptada.

Figura 3. Processo bioquímico de fermentação etanólica

Durante a fermentação pode haver também a síntese de produtos secundários, como glicerol, succinato, álcoois superiores, ácidos orgânicos e outros, os quais estão relacionados com a adaptação e sobrevivência da levedura (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). A levedura é um organismo resistente, mas sob stress, a cada 1°C de aumento na temperatura acima de 35°C causa depressão na levedura, e com isso, pode não funcionar adequadamente (NARENDRANATH, 2003).

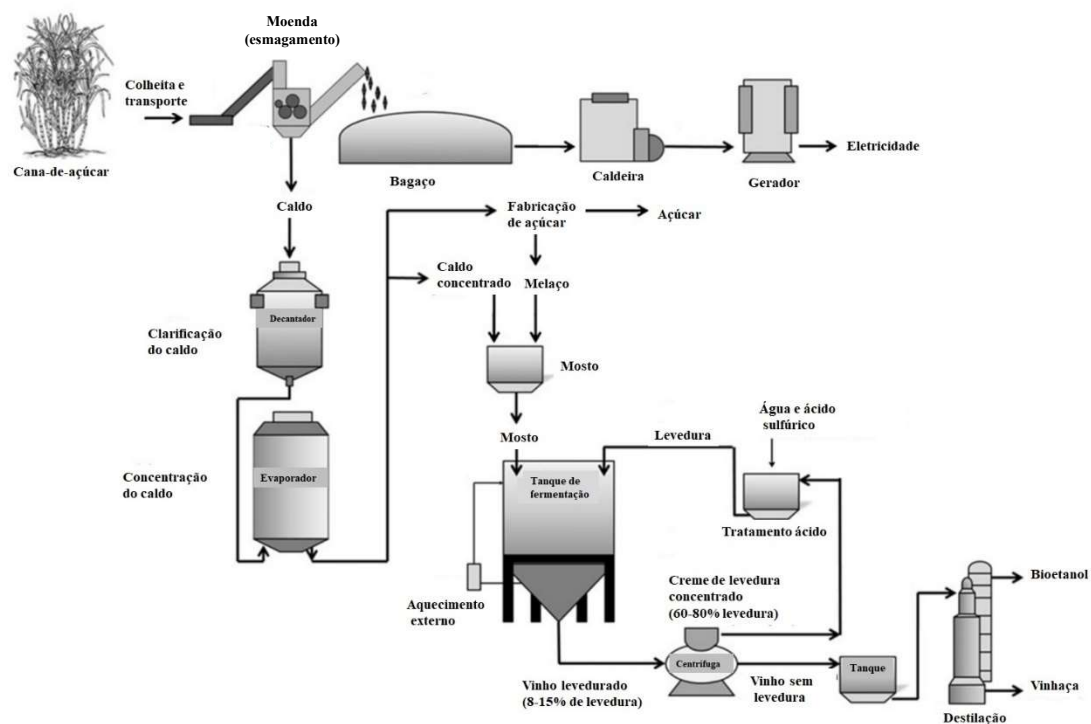
3.3 Parâmetros tecnológicos do processo fermentativo

Nas usinas brasileiras o processo fermentativo chega a ter rendimentos teóricos de 92-93% enquanto os outros 7 a 8% são direcionados para o metabolismo celular. O processo ocorre em grandes tanques industriais (0,5 a 3 milhões de litros) e com altas densidades de células de levedura (10–15% p/v) e com o uso do mosto a partir do caldo de cana-de-açúcar ou do melaço (resíduo da produção de açúcar) diluído em água ou uma mistura de ambos (AMORIM *et al.*, 2011). A produtividade do processo está relacionada a quantidade de açúcares disponíveis para serem fermentados, ou seja, açúcares fermentescíveis, presentes no mosto (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Geralmente, o processo ocorre em um período de 6 a 12 horas a aproximadamente 30°C, sendo que ao final do processo a concentração de bioetanol atinge 7-11% (v/v), com menos de 0,1% de açúcar restantes sem fermentar. O vinho levedurado é centrifugado para separação de leveduras e do vinho, o qual é direcionado para o processo de destilação, gerando ao final o bioetanol e a vinhaça. As leveduras concentradas (creme de levedura) recebem um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0-2,5), e quando necessário também antibióticos, que visam reduzir a contaminação bacteriana. Após 2 a 3 horas, as

leveduras retornam aos tanques de fermentação para iniciar um novo ciclo. Durante todo o processo são realizadas análises para acompanhamento da contaminação bacteriana e também da viabilidade da levedura. O processo de reutilização da levedura ocorre durante toda a produção industrial, no período da safra e representa uma vantagem para a indústria, pois economiza açúcar e aumenta o rendimento da fermentação (AMORIM *et al.*, 2011, BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Um esquema do processo industrial brasileiro de obtenção de bioetanol acoplado à produção de açúcar pode ser verificado na Figura 4.



Fonte: AMORIM *et al.*, (2011). Figura adaptada.

Figura 4. Esquema da produção brasileira de bioetanol

Para que o processo seja atrativo industrialmente e executável economicamente deve apresentar expressiva taxa de fermentação e

consequentemente, alto rendimento e custo de produção por hectare relativamente baixo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

3.4 Controle microbiológico durante a produção de etanol

Durante a fermentação industrial pode ocorrer a contaminação do processo com bactérias e leveduras selvagens. Dentre os contaminantes bacterianos comumente são encontradas espécies Gram-positivas, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus* (LUCENA *et al.*, 2010; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; BREXÓ; SANT'ANA, 2017), os quais podem adentrar o processo em todas as etapas (MADALENO *et al.*, 2019).

A contaminação microbiana é um fator limitante para o processo, pois resulta em queda de 2 a 22% de perda na produção (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011), porém em casos extremos, a redução no rendimento do processo pode chegar de 20 a 30% (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Concentração bacteriana acima de 10^7 UFC/mL, frequentemente alteram a cinética do processo resultando em perdas de aproximadamente 20.000L de bioetanol por dia (SEKOAI; MHLONGO; EZEOKOLI, 2019) e acima de 10^8 UFC/mL, a perda pode chegar a 30.000L de bioetanol por dia em uma destilaria capaz de produzir um milhão de litros por dia (CECCATO-ANTONINI, 2018). Essa redução ocorre principalmente devido à competição pelo açúcar, floculação do fermento, formação de goma, inibição e morte das leveduras (RAVANELI *et al.*, 2011), além de poderem favorecer o processo respiratório da levedura, o acúmulo de glicerol (DONG; LIN; LI, 2015) e a formação de biofilmes recalcitrantes (RICH *et al.*, 2015).

O crescimento bacteriano acaba gerando custos adicionais no processo de produção com a utilização de produtos químicos para controlar os efeitos da contaminação, como antiespumantes, antibióticos, entre outros (NAGHSHBANDI *et al.*, 2019). No controle industrial da proliferação bacteriana é realizado o tratamento com ácido sulfúrico e para altos níveis de contaminação é feita a utilização de antibióticos, que são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que causam a morte ou inibem microrganismos específicos de maneira seletiva (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; FREITAS; ROMANO, 2013).

Muitos antibióticos, como a penicilina G, virginiamicina, monensina entre outros, são empregados frequentemente na redução da contaminação (LEITE *et al.*, 2013; WALTER, *et al.*, 2019). Entretanto, a utilização destes produtos resultam em resíduos nas leveduras descartadas do processo, as quais após a secagem não podem mais ser utilizadas como complemento na ração animal (FREITAS; ROMANO, 2013), dificultando o comércio deste subproduto, pois as leveduras secas, com resíduos de antibióticos devem ser incineradas. Outro problema enfrentado pelo uso de antibióticos é a seleção de bactérias resistentes (WALTER, *et al.*, 2019), gerando questionamentos quanto ao uso contínuo destas substâncias.

Além disso, o gasto com antibióticos torna-se um dos grandes desafios do processo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017), sendo o desenvolvimento de formas alternativas de controle uma necessidade do setor.

O crescimento do uso de antibióticos no mundo vem preocupando as agências de saúde mundial e local. O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), avaliou o uso de antibióticos, apontando o Brasil como o décimo nono maior consumidor, dentre os em 65 países participantes da pesquisa (WHO, 2018). KLEIN, *et al.*, (2018), destacam um aumento 65% no consumo de antibióticos no

mundo entre os anos 2000 e 2015, chegando a 34,8 bilhões de DDDs (Dose Diária Definida por 1000 habitantes) em 2015, sendo 70% o uso na agropecuária. No Brasil o consumo foi de 22,75 DDDs (WHO, 2018), neste período. Considerando o valor médio dos antibióticos mais consumidos no país, o preço atual ao consumidor de R\$/DDD 4,12 equivalente a US\$/DDD 1,04, podemos estimar (Tabela 8) os valores do consumo desse medicamento no Brasil e no Mundo, levando em conta os dados da população brasileira apontados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística como 210.286.630 de habitantes (IBGE, 2019) e os valores estimados para uso na agropecuária (Tabela 9). É possível estimar que o Brasil gasta 4,23 Bi US\$/ano com antibióticos no setor agropecuário.

Tabela 8. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no mundo

Estimativa do gasto anual com antibióticos no mundo – Consumo humano			
Ano	DDDs (Bilhão)	US\$/DDD	Bi US\$/ano
2015	34,8	1,04	36,19

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9. Cálculo do valor estimado com consumo de antibióticos no Brasil

Estimativa do gasto anual com antibióticos no Brasil em 2016 (Consumo humano e Agropecuário)			
Setor do Consumo	Valor (Bi R\$/ano)	Valor (Bi US\$/ano)	Participação
Humano	7,19	1,81	30%
Agropecuária	16,79	4,23	70%
Total	23,98	6,04	100%

Fonte: Dados da pesquisa.

3.5 Controle microbiológico natural

A busca de formas alternativas de controle deve levar em consideração alguns aspectos primordiais como: não interferir na produção das leveduras, possuir amplo espectro de ação contra a maioria dos contaminantes, desenvolvimento mínimo de resistência, facilidade de administração, não ser tóxico para plantas, animais e seres humanos e possuir viabilidade econômica (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Neste sentido, o uso de plantas tem se mostrado promissor, uma vez que os vegetais, além dos metabólitos primários, relacionados à manutenção da vida vegetal, também produzem diversos compostos relacionados à sua adaptação ao ambiente, autodefesa e interação com outros organismos, os metabólitos secundários (SALAM; QUAVE, 2018), dentre os quais, os alcaloides e polifenóis demonstraram eficácia antimicrobiana (ANAND, et al, 2020).

As plantas contribuem de forma significativa na obtenção de produtos com atividades terapêuticas de interesse sendo os extratos vegetais bioativos amplamente utilizados na saúde, agricultura, pecuária entre outras áreas (PETROVSKA, 2012; ABU-DARWISH E EFFERTH, 2018).

Diversos autores destacam a importância do uso de produtos naturais como uma fonte potencial de controle microbiano (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; MOLONEY, 2016). Vários derivados de plantas tem sido associados com propriedades antibacterianas (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), e têm sido empregados extratos vegetais frente às bactérias de interesse (GONÇALVES *et al.*, 2005; SALES *et al.*, 2014; FURTADO *et al.*, 2015), sendo chamado por alguns autores de antimicrobianos de origem vegetal – PDAs, plant-derived antimicrobials (UPADHYAY *et al.*, 2014).

Extratos vegetais apresentando ação contra bactérias Gram-positivas, em estudos clínicos ou mesmo na agricultura, pecuária ou indústria alimentícia podem ser uma fonte potencial para estudos de ação nos contaminantes bacterianos normalmente encontrados na produção do bioetanol (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011). Diversas especiarias utilizadas em alimentos tem sido relatadas com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (LIU et al 2017), sendo que algumas já estão em avaliação na produção de bioetanol (MADALENO *et al.*, 2016).

Anand, *et al*, (2020), revisando trabalhos sobre a família *Apocynaceae*, destaca que os vegetais podem ter um papel fundamental no desenvolvimento de drogas antimicrobianas mais eficazes e menos tóxicas, que podem superar a resistência aos antibióticos comumente utilizados.

O estudo do uso de extratos naturais como alternativa na produção de bioetanol tem sido considerado promissor com ampla possibilidade de exploração (SALAM; QUAVE, 2018) e interesse quando considerado as questões como de saúde pública, aspectos ecológicos e econômicas, sendo mais viável economicamente para uso industrial quanto menos nível de pureza for necessário, ou seja, quanto mais bruto for o extrato (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Atualmente, o vegetal mais utilizado na indústria de bioetanol é o lúpulo (*Humulus lupulus*), do qual derivam os α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas), eficazes principalmente contra bactérias Gram-positivas e encontrados comercialmente com os nomes de IsoStab®, LactoStab® e Betabio 45® (CECCATO-ANTONINI, 2018).

Os derivados vegetais apresentam-se como uma fonte valiosa de compostos bioativos com atividades antimicrobiana, por estarem prontamente disponíveis,

possuírem baixo custo de obtenção, quase não apresentarem efeitos colaterais, alguns deles mostrando-se eficazes na eliminação de bactérias resistentes à antibióticos e outros, embora não sejam eficaz por si só, apresentaram-se promissores quando combinados com antibióticos, sendo assim, ferramentas atraentes na pesquisa de produtos bioativos nos próximos anos (KHAMENEH, 2019).

3.6 *Byrsonima intermedia*

Diante da grande extensão do Brasil (8,5 milhões km²), ocupando quase a metade da América do Sul, ocorre a incidência de várias zonas climáticas no país, possibilitando grandes variações ecológicas, formando zonas biogeográficas distintas ou biomas, que abrigam maior biodiversidade do planeta, possuindo mais de 20% do número total de espécies da Terra (MMA, 2020a).

O Cerrado brasileiro destaca-se como o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando cerca de 22% do território nacional e abrigando 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas (MMA, 2020b). Este bioma ocupa parte do Estado de São Paulo (Figura 5), tendo o seu mapeamento oficializado com a RESOLUÇÃO SMA Nº 146, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2017, a qual instituiu o Mapa de Biomas do Estado de São Paulo elaborado a partir do Mapa de Vegetação do Brasil - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – 2004 (BIOMA LEGAL, 2017).



Figura 5. Biomas no Estado de São Paulo

O Cerrado possuiu uma vasta flora rica em espécies contendo vários compostos químicos com propriedades biológicas e potencial atividade terapêutica, como a presença de compostos fenólicos, provavelmente devido à própria condição ambiental (exposição ao estresse hídrico, alta radiação ultravioleta, ataques de herbívoros e infecções por fungos), os quais são precursores de compostos com atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, sendo assim, essas plantas alvo de bioprospecção (BAILÃO *et al.*, 2015)

Plantas do gênero *Byrsonima*, podem ser encontradas no Cerrado do Estado de São Paulo. Esse gênero é composto aproximadamente por 150 espécies e podem ser encontradas em toda a América tropical, sendo que 50% são encontradas no Brasil onde são comumente chamadas de “murici” (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011; SANTOS *et al.*, 2018). Espécies deste gênero apresentaram ação contra microrganismos implicados em doenças gastrointestinais

e de pele, revelando resultados positivos para diversas espécies de bactérias, enterobactérias e micobactérias (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

Uma espécie representativa deste gênero é a *Byrsonima intermedia* apresenta-se como um arbusto de 1–2,5m de altura, formando uma copa de até 3m de diâmetro, florescendo com cachos amarelos de outubro a dezembro (Figura 6), conhecida popularmente como "murici-do-campo", "murici-anão", "murici-pequeno", "canjica", "baga-de-tucano" ou "saratudo" o qual tem suas cascas e folhas utilizados popularmente no tratamento de diarreia, disenteria, dor de estômago, úlcera e inflamação, ações essas, confirmadas por estudos pré-clínicos farmacológicos (SANTOS *et al.*, 2018).



Fonte: CARDIM, (2011). Foto: Ricardo Cardim

Figura 6. *Byrsonima intermedia*

B. intermedia possui uma diversidade fitoquímica que contribui para as ações farmacológicas desta planta (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011), a qual

apresentou resultados positivos para ação antibacteriana de seus extratos contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em um screening realizado para várias plantas de uso popular (ALVES *et al.*, 2000). Ação antibacteriana também foi verificada contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus epidermidis* (MICHELIN *et al.*, 2008), *Helicobacter pylori* (SANTOS *et al.*, 2018).

Com a perspectiva do aumento da produção de etanol para cumprir as metas governamentais estabelecidas, o setor sucroenergético busca minimizar as contaminações microbianas utilizando antibióticos, gerando preocupações ambientais e limitando o comércio da levedura seca por deixar resíduos. Neste sentido é proposto a utilização de extratos vegetais de *Byrsonima intermedia* como uma forma alternativa e financeiramente atrativa de controle.

4 Material e métodos

4.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados na Fatec – Jaboticabal, no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP – Araraquara, no Instituto Federal de São Paulo – IFSP Campus Matão e Laboratório de Química Medicinal e Medicina Regenerativa – Quimmera da Universidade de Araraquara – Uniara.

4.2 Amostras vegetais

A espécie vegetal proveniente do cerrado brasileiro, *Byrsonima intermedia*, foi gentilmente fornecida e caracterizada (CARDOSO; BAUAB; VARANDA, 2015) pela Profa. Dra. Cássia Regina Primila Cardoso do Instituto de Ciências da Saúde de Sinop – UFMT, a qual em seu Pós Doutorado foi participante do projeto BIOTA da Fapesp, que busca integrar a caracterização, conservação, restauração e uso sustentável da biodiversidade (BIOTA, 2020).

O vegetal foi coletado na cidade de Itirapina – SP e identificado pelo Prof. Jorge Tamashiro, do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas. A autorização do IBAMA recebeu o número 32066-1 e a exsicata foi depositada no Herbário HUEC, da Unicamp, sob registro 1484. As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 45 °C por sete dias e após esse período foi pulverizada em moinho de facas. A armazenagem foi realizada em embalagem plástica devidamente rotulada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química Orgânica (IQ/Unesp Araraquara) e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bioprocessos da Fatec Jaboticabal.

4.3 Preparo dos extratos vegetais

Os extratos foram obtidos pela maceração (ANVISA, 2010) na proporção 1:10 (m/v) em etanol 70% por 5 dias ou em água por 3 dias. Após a filtração, os filtrados resultantes foram congelados em ultrafreezer a $-62\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem realizados os procedimentos de concentração em rotaevaporador e liofilizador para eliminação do solvente extrator hidroalcoólicos. Os extratos aquosos foram liofilizados diretamente. A Figura 7 ilustra as etapas realizadas. Os extratos obtidos no final do processo foram armazenados sob refrigeração em frasco âmbar.

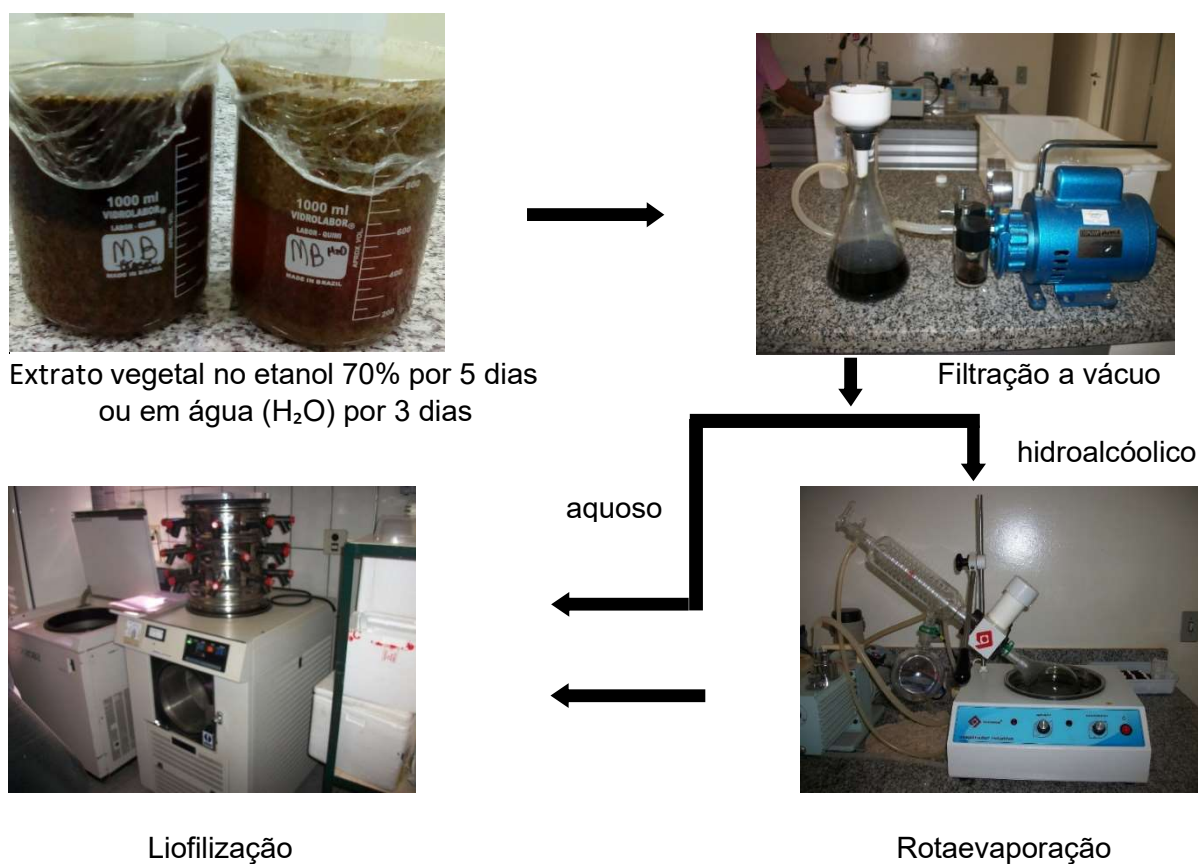


Figura 7. Obtenção dos extratos vegetais hidroalcoólico e aquoso

4.4 Determinação da solubilidade em água dos extratos

A determinação da solubilidade em água foi realizada, conforme descrito por Nascimento, (2008). Para tal determinação uma quantidade específica (Tabela 10) dos extratos foram transferidos para tubo de ensaio ou erlenmeyer, seguida de adição de alíquotas do solvente (Tabela 10), utilizando o agitador mecânico vórtex (Phoenix AP56) para homogeneização e confirmação da ausência de material suspenso. A solubilidade foi expressa conforme os termos descritivos definidos pela ANVISA (2010) e apresentados na Tabela 11, a qual refere-se à dissolução de uma parte (1 g) da amostra no número de partes (volume, em mL) do solvente.

Tabela 10. Quantidades de amostra e de solventes utilizados para avaliação da solubilidade

Amostra (g)	Adição cumulativa de solvente (mL)	Volume de solvente (mL)	Partes de solvente para 1g de amostra
1,0	-	1	1
	9	10	10
	20	30	30
0,01	-	1	100
	9	10	1.000
	90	100	10.000

Fonte: NASCIMENTO, (2008).

Tabela 11. Termos descritivos para expressar a solubilidade

Termo descritivo	Volumes aproximados de solvente em mililitros por grama de substância
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1.000 partes
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

Fonte: ANVISA, 2010.

4.5 Microrganismos padrões

Foram utilizadas cepas padrões (American Type Collection Culture - ATCC) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.6 Obtenção das leveduras e dos contaminantes microbianos do processo fermentativo

As leveduras e os contaminantes microbianos foram isolados a partir da simulação de um processo fermentativo realizado na Fatec Jaboticabal e do material da cuba de tratamento do fermento de três unidades sucroenergéticas diferentes da região de Jaboticabal definidas neste trabalho como Usinas A, B e C. Os microrganismos foram crescidos em incubadora Shaker (CT 712 Cienter) a 32 °C em meio YPD (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, dextrose 20 g.L⁻¹ e peptona 20 g.L⁻¹) para isolamento das leveduras, e em caldo nutriente (extrato de carne 3 g.L⁻¹ e peptona 5 g.L⁻¹) para isolamento das bactérias.

Quando atingido a absorbância 0,3 no comprimento de onda de 600 nm, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Sppencer 80-2B), a 1.600xg por 5 minutos. O precipitado foi suspenso em solução estéril de glicerol 20% em água (H₂O) e distribuído em tubos de microcentrífugas resistentes a baixas temperaturas (criotubos). Os microrganismos foram estocados em ultrafreezer até o momento de utilização. Um esquema desta etapa pode ser verificado na Figura 8.

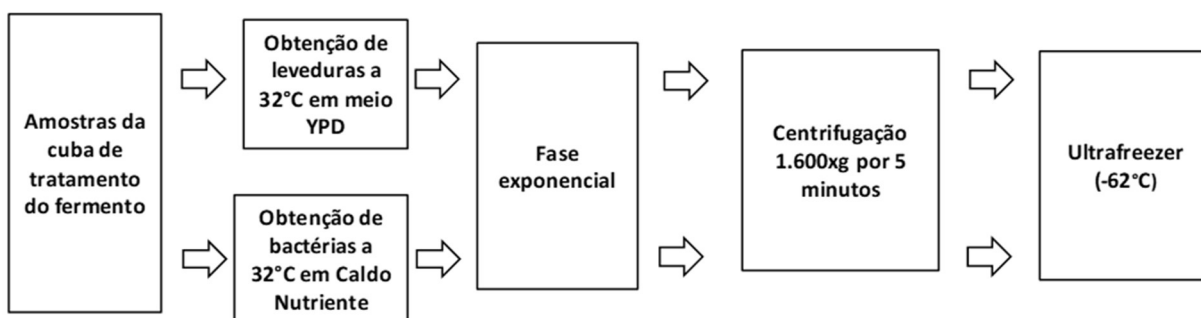


Figura 8. Fluxograma da obtenção dos microrganismos.

4.7 Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos vegetais in vitro

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos foi avaliada pelo método hole plate de difusão em ágar, conforme descrito por Silva, (2012). Essa técnica também é conhecida como teste de difusão por poço (BONA *et al.*, 2014).

Para os ensaios, as amostras bacterianas foram crescidas em caldo Mueller-Hinton (extrato bovino 2 g.L⁻¹, Hidrolisado ácido de caseína 17,5 g.L⁻¹ e amido 1,5 g.L⁻¹) ou ágar Mueller-Hinton (adicionado de ágar a 2%). Após o crescimento em incubadora Shaker (CT 712 Cienter) a 32°C, a cultura foi diluída até densidade ótica correspondente ao padrão 0,5 da escala de Mac-Farland (OD₆₂₀ = 0,10). Após isso, 100 µL da suspensão microbiana foram espalhados com alça de Drigalsky em placas de ágar Mueller-Hinton (Caldo anteriormente descrito adicionado de 2% de ágar). Em seguida, orifícios de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar e 30 µL dos extratos solubilizados em água (H₂O) na concentração de 150 mg.mL⁻¹ foram adicionados (Figura 9).

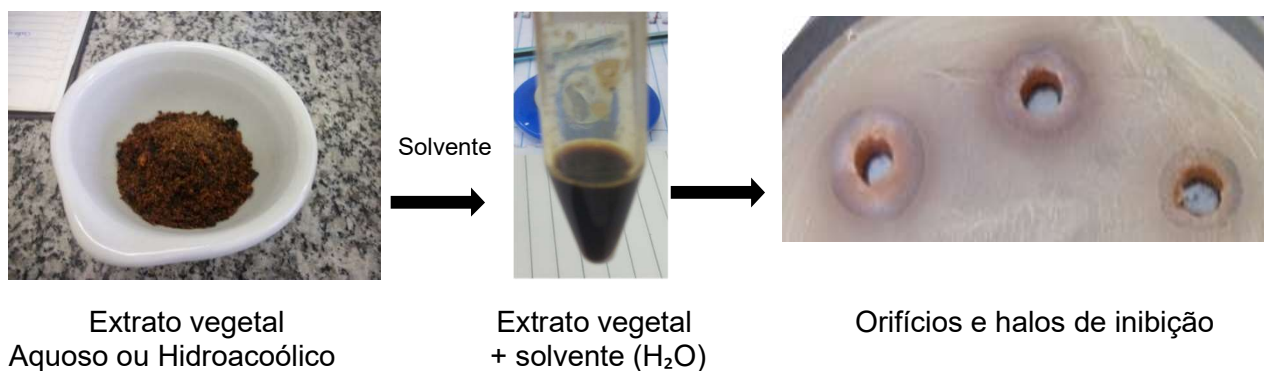


Figura 9. Etapas realizadas na avaliação pelo método Hole plate.

Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas resultantes foram incubadas em estufa bacteriológica a 32 °C por 48 horas. Após esse período, foi observado o desenvolvimento de halos de inibição, cujo diâmetros foram medidos em milímetros. Valores de diâmetro dos halos maiores que 7 mm foram considerados como positivos. Um esquema desta etapa pode ser verificado na Figura 10.

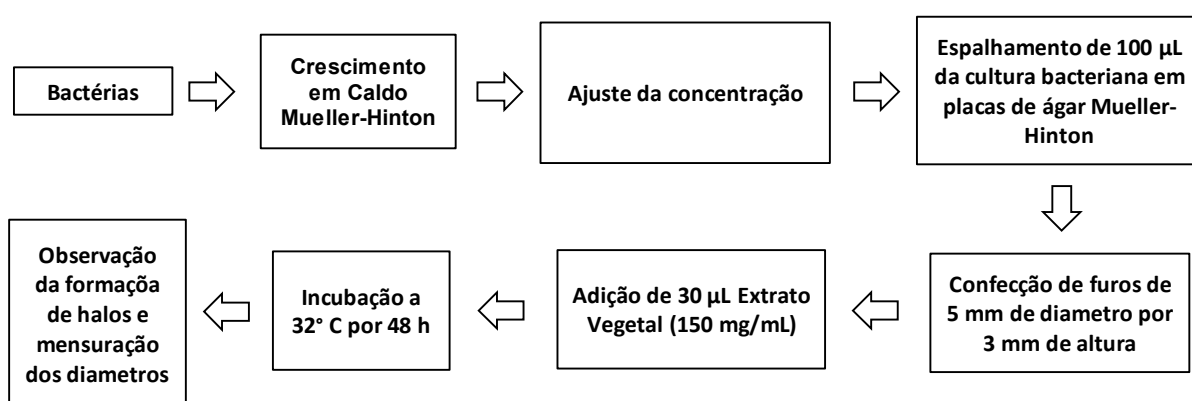


Figura 10. Fluxograma da avaliação do potencial antimicrobiano in vitro.

As análises de suscetibilidade também foram realizadas utilizando as amostras de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, como descrito anteriormente, porém ao invés dos extratos serem colocados em orifícios, foram aplicados em

discos de papel absorvente (método disco-difusão), após as leveduras serem crescidas em meio YPD (extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹ e glicose 20 g.L⁻¹) e aplicadas em placas contendo o mesmo meio na forma sólida (adicionado de ágar a 2%).

4.8 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com CLSI, (2016). As amostras bacterianas foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de BHI (Brain Heart Infusion KASVI) e incubadas durante 18 h a 35-37 °C. Após esse período, foram diluídas até atingir a turbidez 1,0 da escala nefelométrica de McFarland (~ 3,0 x 10⁸ UFC/mL). Um volume de 50 µL do extrato vegetal suspenso em solução aquosa de DMSO 20% (estoque 10 mg.mL⁻¹) foi adicionado a partir do segundo poço da microplaca de 96 poços acrescidos de 50 µL de meio BHI estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (10,0 mg.mL⁻¹ a 0,156 mg.mL⁻¹) e, 100 µL da suspensão bacteriana anteriormente preparada foram adicionados a cada poço, em um volume final de 200 µL/poço.

No primeiro poço da microplaca, utilizado como controle de crescimento, foram adicionados 50 µL de meio BHI estéril, 50 µL da solução aquosa de DMSO 20% e 100 µL das suspensões bacteriana, na escala 1,0 McFarland. As microplacas foram incubadas durante 18 h a 35-37 °C em câmara úmida sob agitação a 150 rpm. Decorrido o período, foram transferidos 5 µL de cada poço, para placas de ágar Muller-Hinton, as quais foram incubadas por 18 h a 35-37 °C. Um esquema geral do experimento pode ser verificado na Figura 11.

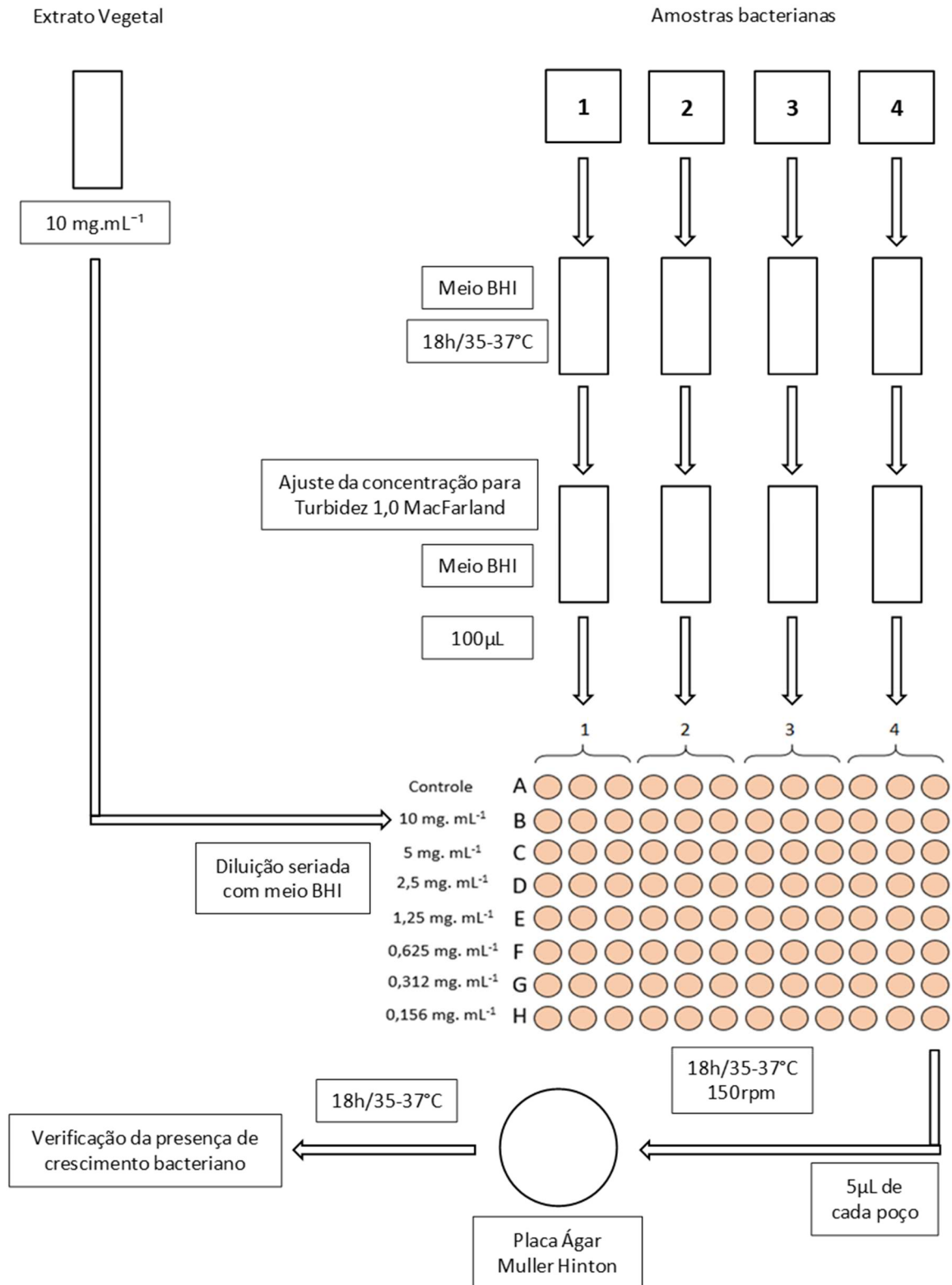


Figura 11. Esquema do procedimento realizado na avaliação da CIM. Códigos da origem das amostras bacterianas: 1 (Usina B), 2 (Fatec), 3 (Usina C) e 4 (Usina A).

4.9 Estudo do controle de microrganismos, verificando os produtos obtidos da fermentação

Para realizar a fermentação, inicialmente foi necessário o preparo do mosto de melaço (gentilmente cedido por uma usina da região de Jaboticabal-SP) através do uso da Cruz de Cobenze (regra das diluições) a qual teve como objetivo a correção dos sólidos solúveis (SCHNEIDER, 1979) de 74,8° para 14 °Brix. A confirmação da correção dos sólidos solúveis foi realizada através do refratômetro (ABBE Refractometer Quimis®). Foi corrigido também o pH do mosto para 4,5 com a adição de ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4 - 5N), utilizando-se para verificação o peagâmetro (PG 1800, Gehaka). Após a preparação, o mosto foi identificado como amostra 1 e armazenado em ultrafreezer a - 62 °C para posterior análises cromatográficas (HPLC). Na Figura 12 é apresentado o fluxograma do experimento. O mosto foi contaminado com 1% de cultura bacteriana ($\text{DO}_{600\text{nm}}=1,0$) isolada da Usina C.

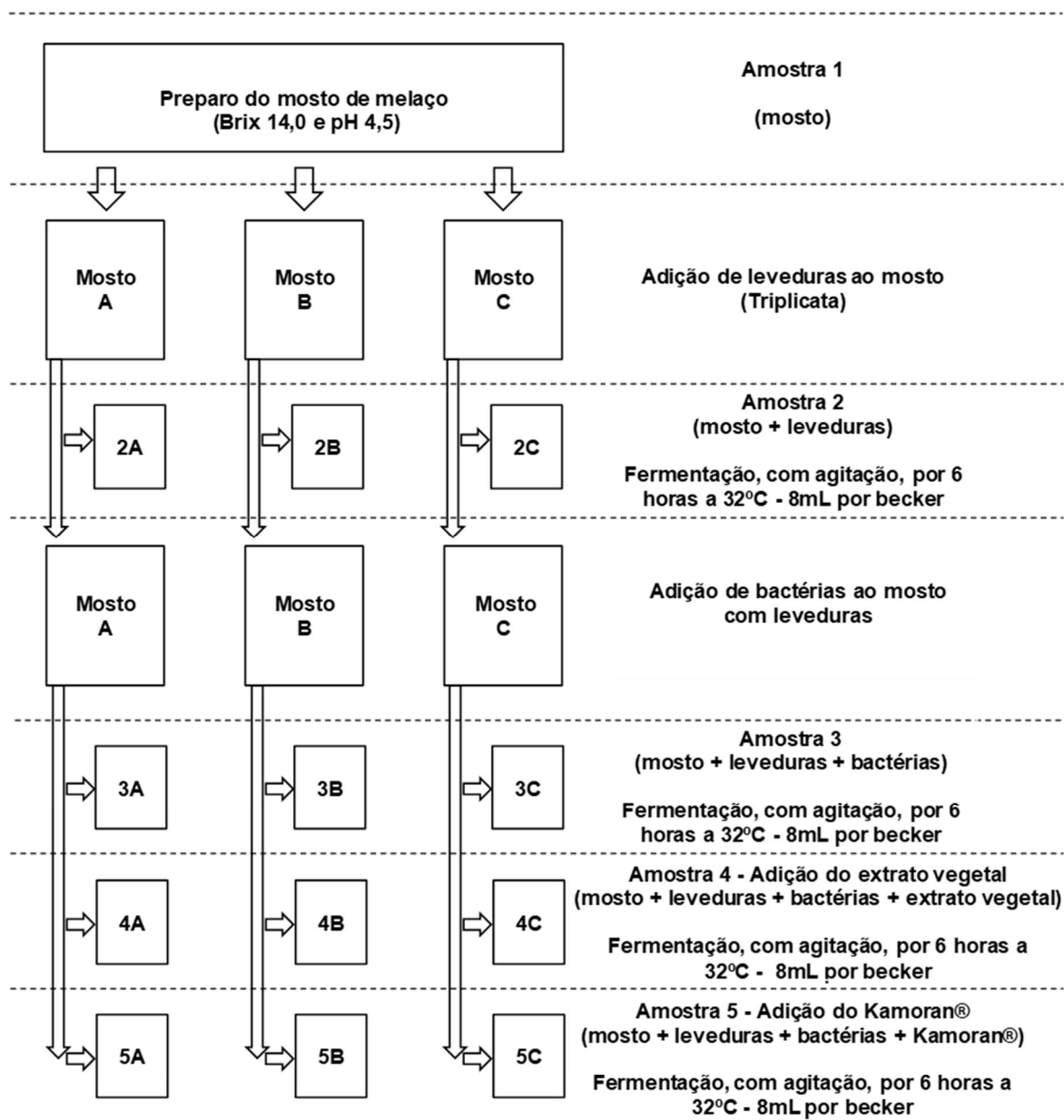
Para o processo de fermentação foi utilizada levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) isolada também da Usina C, na quantidade de 30 g.L⁻¹ de mosto. Como controle, foi utilizado um antibiótico comercial frequentemente utilizado nas usinas sucroenergéticas (Kamoran®, Química Real).

O mosto foi submetido a quatro tratamentos identificados como 2 (mosto + leveduras), 3 (mosto + leveduras + bactérias), 4 (mosto + leveduras + bactérias + extrato vegetal a 20 mg.mL⁻¹) e 5 (mosto + leveduras + bactérias + Kamoran® a 6 ppm), os quais foram realizados em triplicata (A, B e C), totalizando o acompanhamento de 12 fermentações simultâneas. As amostras foram mantidas sob agitação em incubadora Shaker (CT 712 Cienter) a 32 °C durante 6 horas.

Decorrido o tempo de fermentação, amostras foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer a -62°C para posteriores análises cromatográficas (HPLC) do vinho.

As análises cromatográficas foram realizadas usando um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de índice de refração (HPLC Shimadzu, Detector RID20A). O HPLC foi equipado com uma coluna HPX 87H, e condicionado com os seguintes parâmetros: fluxo de $0,6\text{ mL/min}$, temperatura de 60°C com temperatura máxima de 65°C , pressão de 55 Kgf/cm^2 com pressão máxima de 102 Kgf/cm^2 , fase móvel $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }0,005\text{M}$ e detector RID.

Para o preparo da fase móvel foi utilizado 5 mL de ácido sulfúrico ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }1\text{M}$) e água (H_2O) ultrapura para completar 1.000 mL em balão volumétrico apropriado, obtendo-se dessa forma a fase móvel $\text{H}_2\text{SO}_4\text{ }0,005\text{M}$.



Após a fermentação todo material é transferido para microtubos devidamente identificados.

São retiradas amostras para a determinação da contaminação microbiana.

Os microtubos são transferidos para o ultrafreezer a -62°C para posterior análise cromatográfica no HPLC

Figura 12. Fluxograma do processo fermentativo realizado.

Para o preparo das amostras para a leitura cromatográfica, após o descongelamento, foi realizada a centrifugação durante 10 minutos a 10.000 rpm. Após isso, o sobrenadante foi filtrado (filtro de 0,22 micras), diretamente no vial de

cromatografia e identificado com o respectivo número da amostra. As amostras filtradas foram diluídas para atingir uma concentração esperada dentro da escala da curva padrão previamente estabelecida e calibrada, para as substâncias a serem analisadas. A diluição da amostra 1 foi de 140 vezes, para isso foi utilizado balão de 25 mL (25.000 μ L) e o volume da amostra pipetado no balão foi de 178,6 μ L (25.000 μ L/140), sendo completado com o solvente até o menisco do balão volumétrico. As demais amostras, foram diluídas 30 vezes, para isso foram utilizados balões volumétricos de 5 mL (5.000 μ L) e o volume de cada amostra pipetada no balão foi de 166,6 μ L (5.000 μ L/30), sendo completado com solvente. Foi utilizado como solvente a fase móvel H₂SO₄ 0,005M, para manter um pH mais adequado para a leitura no HPLC.

Antes das leituras o HPLC foi preparado nas condições operacionais acima descritas, fluxo, temperatura e pressão. O software utilizado, LabSolution, requer preparação antecipada para salvar os arquivos gerados a cada leitura, cria-se a pasta de destino para essa finalidade, a cada leitura, corrida, obtém-se um cromatograma com todas as informações necessárias para o cálculo da quantidade em g.L⁻¹ de cada substância alvo das análises, as quais tem que ser nomeadas antes de cada corrida. Ao final de todo o processo é possível resgatar cada cromatograma (Figura 13) e utilizando o software excluir curvas não pertencente às análises alvo.

Para injetar as amostras no HPLC foi utilizada seringa apropriada de 50 μ L e as amostras foram injetadas (20 μ L) seguindo os procedimentos requeridos.

Após ligado o aparelho, foi necessário aguardar o aquecimento do forno e em seguida ajustar os parâmetros das condições de análise, o fluxo de 0,6 mL/min é atingido de forma gradual, a cada mudança no valor, espera-se a estabilização dos

demais parâmetros, até o fluxo de 0,6 mL/min. Verifica-se a estabilidade dos demais parâmetros para passar pelo sistema a fase móvel por um período entre 20 minutos (purga). Antes de iniciar a injeção de cada amostra a seringa é lavada internamente com água (H₂O) ultrapura, repetindo essa operação por três vezes. Esse procedimento foi repetido entre cada análise, ou seja, após a injeção da amostra, faz-se a limpeza da seringa.

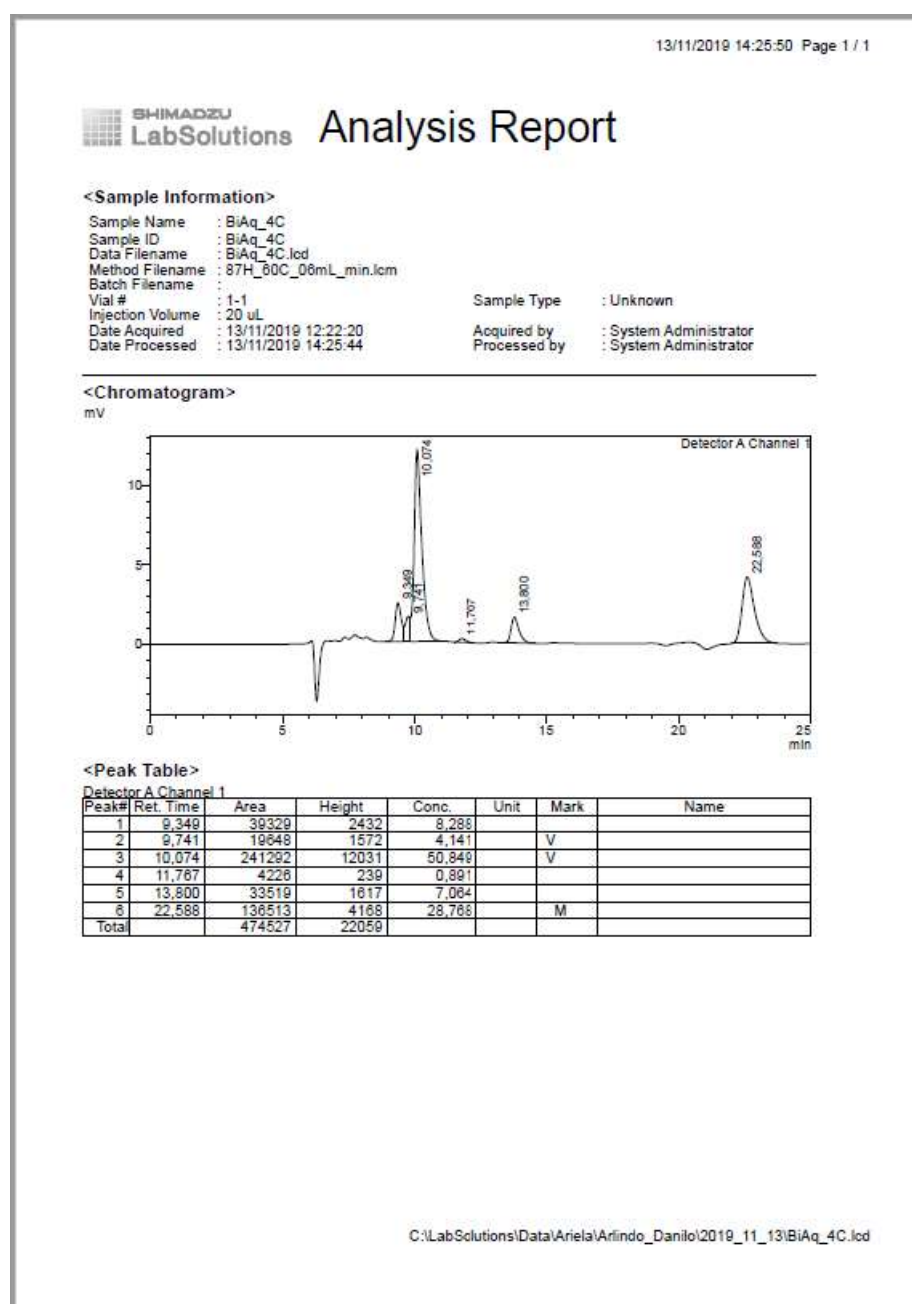


Figura 13. Cromatograma obtido para a Amostra C do Tratamento 4.

As corridas de cada amostra para atingir todas as substâncias a serem analisadas tiveram duração de 25 minutos. Cada substância tem seu tempo de eluição, conforme pode ser visto na Tabela 12. Ao final de todas as análises é verificado se todos os cromatogramas estão dentro dos parâmetros, caso seja necessário repetir a análise com erro. Após a conferência, os arquivos são salvos para os cálculos futuros. Após a lavagem e secagem das vidrarias e materiais utilizados, os que não são descartáveis voltam para o processo, os descartáveis devem ter a destinação correta conforme sua categoria. O fluxograma desse procedimento pode ser observado na Figura 14.

Tabela 12. Tempo de eluição das substâncias de interesse por HPLC.

Substância	Glicose	Frutose	Ácido succínico	Ácido láctico	Glicerol	Ácido acético	Etanol
Tempo (min.)	9,5	10,1	11,8	13,0	13,8	15,3	22,6

Fonte: Dados da pesquisa.

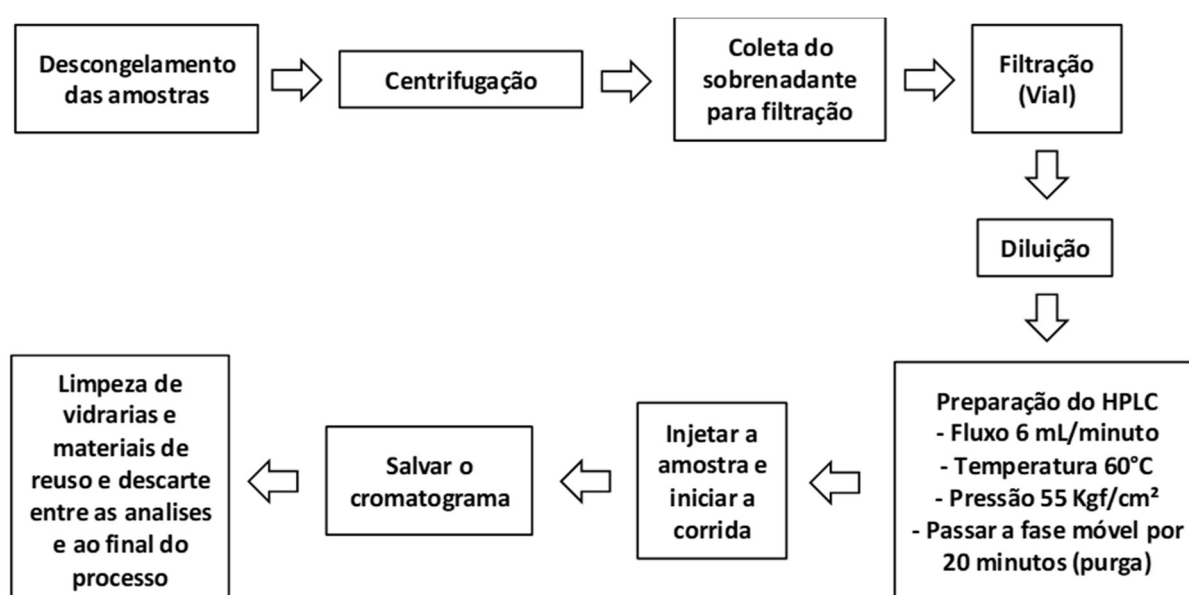


Figura 14. Fluxograma do preparo das amostras e análise no HPLC.

5 Resultados e discussão

5.1 Obtenção e avaliação da solubilidade dos extratos vegetais

Inicialmente, foi realizada a preparação dos extratos bruto de *Byrsonima intermedia*. Foram obtidos extratos aquosos e hidroalcoólicos pelo processo de maceração, o qual possui grande importância na obtenção de componentes termolábeis, em especial, de compostos fenólicos, apesar de o tempo de espera e o volume de solvente serem características de desvantagens deste método (ZHANG; LIN; YE, 2018). A vantagem econômica do uso industrial de extratos que necessitem de menor nível de pureza, ou seja, quanto mais bruto for o extrato mais atrativo, como é o nosso caso, foram ressaltadas por Muthaiyan; Limayem e Ricke, (2011).

O interesse na utilização de água no preparo do extrato foi de obter um produto de baixo custo e com praticidade de utilização por ser facilmente solúvel, característica essa que foi confirmada pela avaliação de solubilidade como mostrado na Tabela 13. A utilização de água torna-se também um atrativo na obtenção de compostos com características polares (ALTEMIMI *et al.*, 2017).

Tabela 13. Solubilidade de extratos vegetais em termos descritivos

Espécie vegetal	Extrato vegetal	Segundo critérios estabelecidos por ANVISA, 2010
<i>Byrsonima intermedia</i>	Hidroalcoólico	Ligeiramente solúvel
	Aquoso	Solúvel

Fonte: Dados da pesquisa.

A presença de atividade antimicrobiana no extrato aquoso no presente estudo tem sido almejada, uma vez que, Tiwari *et al.*, (2011), estudando os extratos

aquosos e etanólicos de *Tinospora cordifolia*, mostraram a presença de bioatividade nos dois casos.

Após a obtenção do extrato, a determinação da solubilidade em água (Tabela 13) foi realizada para verificar a possibilidade do uso desse solvente na diluição do extrato (ou possível produto comercial) no momento de uso, o qual torna-se atraente para o setor industrial por ser um solvente universal, abundante e relativamente de baixo custo. Foi possível verificar a facilidade da solubilização dos extratos em meio aquoso, enquanto os extratos em meio hidroalcoólicos apresentaram maior dificuldade. Essa observação também foi relatada por Nascimento, (2008). Em um estudo realizado por Kubiliene *et al.*, (2018), utilizando extrato aquoso, etanólico e aquoso com adição de polietilenoglicol de própolis foi destaca a importância da solubilidade em água como uma forma mais segura de utilização e biocompatível, o que é muito significativo para o presente estudo, uma vez que, o extrato obtido será manipulado pelos operadores e entrará em contato direto com as leveduras do processo, sendo importantíssimo a inocuidade do solvente.

5.2 Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos vegetais *in vitro*

Nos ensaios de avaliação do potencial antimicrobiano realizados em *Saccharomyces cerevisiae* não foi observado a formação de halo de inibição para nenhum dos extratos avaliados (Figura 15). Esse resultado é muito interessante pois o objetivo é utilizar o extrato durante o processo fermentativo e para isso é necessário que apenas os contaminantes apresentem sensibilidade e que a ação da levedura não sofra influência.



Figura 15. Não observação de halo para levedura em extrato aquoso.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados da sensibilidade bacteriana pelo método Hole plate. Cada extrato foi testado para os microrganismos padrões (Tabela 14) e para os microrganismos isolados do processo fermentativo realizados na Fatec e nas unidades sucroenergéticas da região de Jaboticabal (Usinas A, B e C), separadamente (Tabela 15).

Tabela 14. Medida dos halos de inibição obtida para os microrganismos padrões.

Espécie vegetal	Extrato vegetal	Diâmetro dos halos (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Byrsonima intermedia</i>	Hidroalcoólico	14,12 ± 0,97	9,64 ± 0,71
	Aquoso	13,95 ± 1,07	10,63 ± 0,21
Controle	-	*	*

*Medida do halo < 7mm. Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 15. Medida dos halos de inibição para microrganismos isolados do processo de fermentação.

Espécie vegetal	Extrato vegetal	Diâmetro dos halos (mm)			
		Fatec	Usina A	Usina B	Usina C
<i>Byrsonima intermedia</i>	Hidroalcoólico	9,26 ± 0,39	9,85 ± 0,59	15,30 ± 0,49	15,70 ± 0,61
	Aquoso	9,65 ± 0,31	10,17 ± 0,26	15,13 ± 0,60	15,05 ± 0,79
Controle	-	*	*	*	*

*Medida do halo < 7mm. Fonte: Dados da pesquisa.

Foi possível observar que os extratos de *Byrsonima intermedia*, apresentaram maior ação sobre a bactéria *S. aureus* em relação à *E. coli* (Tabela 14). Os extratos também apresentaram efetividade sobre os quatro grupos de bactérias isoladas (Tabela 15), apresentando os maiores valores de halo para as amostras bacterianas oriundas das usinas B e C. A ação foi verificada tanto para o extrato hidroalcoólico quanto para o extrato aquoso, com valores similares.

Os métodos de difusão são a escolha inicial na seleção de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, devido principalmente à facilidade de execução e ao baixo custo (OSTROSKY *et al.*, 2008). Bona *et al.*, (2014) ressaltam a importância do método Hole plate ou teste de difusão por poço na avaliação preliminar dos extratos vegetais com potencial antimicrobiano.

Michelin *et al.*, (2008), verificaram resultados positivos de ação antibacteriana por difusão de extratos metanólicos de *Byrsonima intermedia* contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus epidermidis*. Em concordância aos resultados obtidos para o extrato aquoso, Alves *et al.*, (2000), estudando vários vegetais, observou atividade antibacteriana no ensaio de difusão do extrato aquoso de *Byrsonima intermedia* contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Moreira,

(2010), empregando também o extrato aquoso verificou pelo método Hole plate a presença de atividade antibacteriana para *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis*.

5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A placa resultante na avaliação da CIM pode ser verificado na Figura 16 para o extrato hidroalcoólico e na Figura 17 pra o extrato aquoso. Na Tabela 16 constam os valores obtidos para cada extrato.

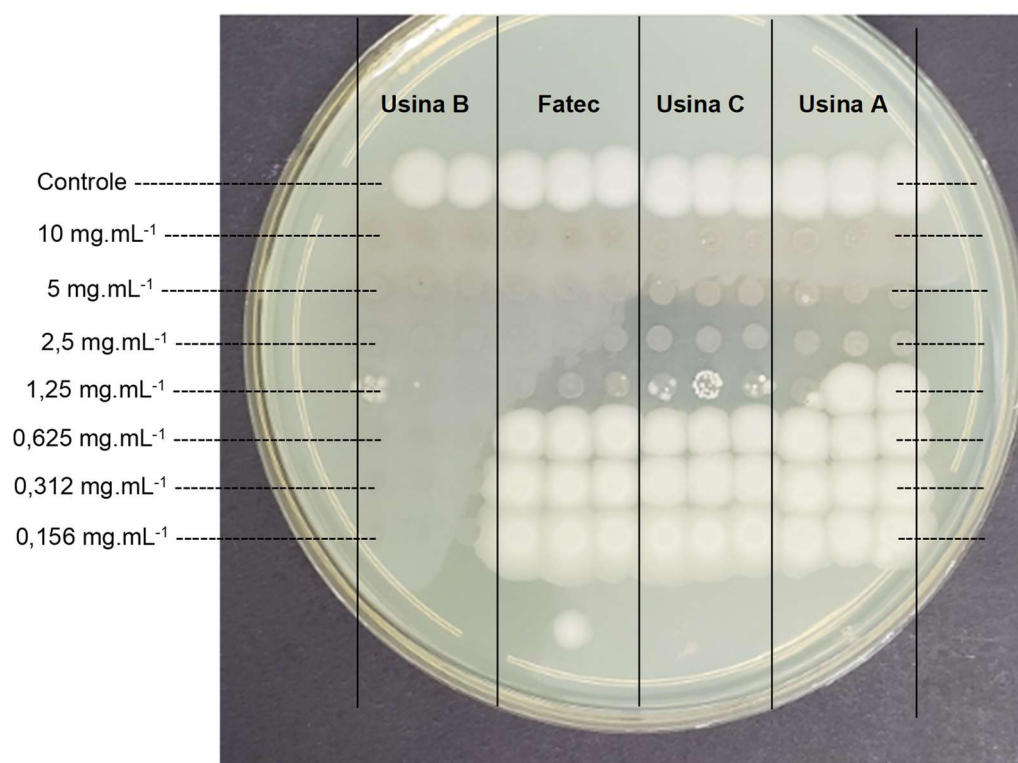


Figura 16. Avaliação da CIM para o extrato hidroalcoólico de *Byrsonima intermedia*.

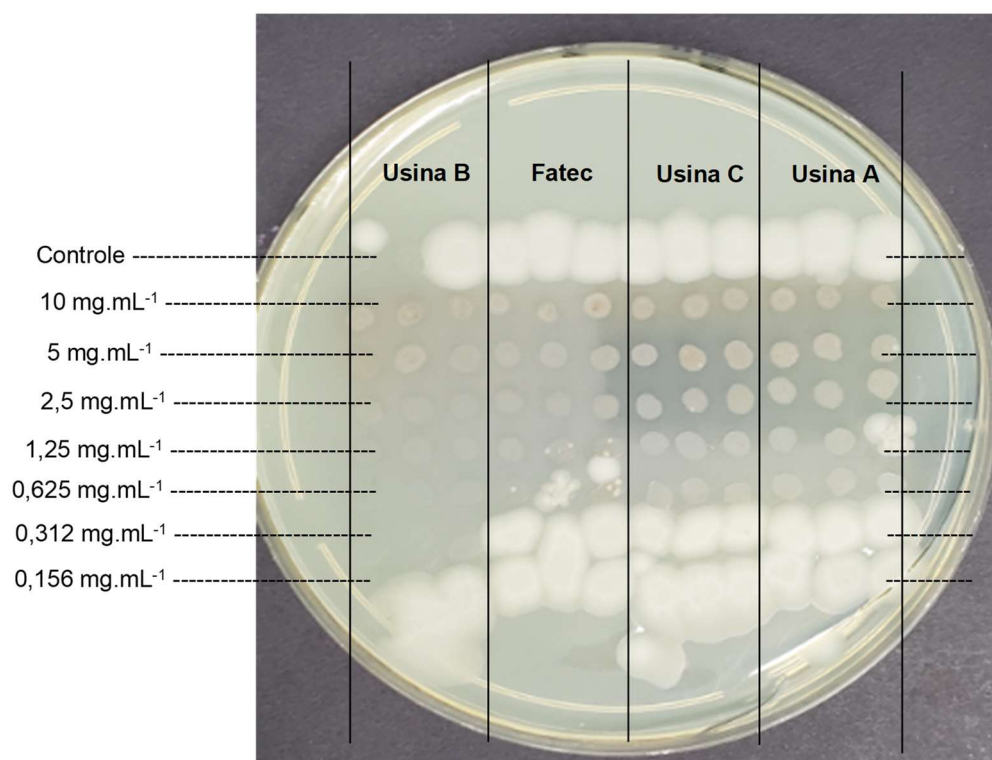


Figura 17. Avaliação da CIM para o extrato aquoso de *Byrsonima intermedia*.

Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima dos extratos.

Espécie vegetal	Extrato vegetal	Fatec (mg.mL ⁻¹)	Usina A (mg.mL ⁻¹)	Usina B (mg.mL ⁻¹)	Usina C (mg.mL ⁻¹)
<i>Byrsonima intermedia</i>	Hidroalcoólico	1,25	2,5	≥ 0,156	0,625
	Aquoso	1,25	0,625	0,312	0,625

Fonte: Dados da pesquisa.

Os extratos mostraram resultados muito promissores na inibição das amostras bacterianas isoladas da Fatec e das três usinas sucroalcooleiras, revelando efetividade em baixas concentrações. O extrato hidroalcoólico apresentou maior variação na CIM (variando entre 2,5 a 0,156 mg.mL⁻¹), com valores maiores na amostra da Usina A e menores na Usina B. O extrato aquoso mostrou menor variação (entre 1,25 a 0,312 mg.mL⁻¹), com valores maiores para a amostra da Fatec e menores também para a Usina B.

Bona *et al.*, (2014) destacam que a técnica utilizada apresenta resultados reprodutíveis e confiáveis para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Michelin *et al.*, (2008), estudando extrato metanólico de *Byrsonima intermedia*, observou menores valores de CIM contra *E. faecalis* (1,5 mg.mL⁻¹) e *B. subtilis* (3,0 mg.mL⁻¹), sendo ambas gram-positivas. Moreira, (2010), utilizando extrato aquoso verificou valores de CIM para *Bacillus subtilis* (2,5 mg.mL⁻¹), *Bacillus cereus* (0,62 mg.mL⁻¹), *Staphylococcus aureus* (1,25 mg.mL⁻¹), *Micrococcus luteus* (1,25 mg.mL⁻¹) e *Proteus mirabilis* (2,5 mg.mL⁻¹).

Santos *et al.*, (2012), utilizando extrato metanólico deste vegetal também observou a presença de ação antimicrobiana nos mesmos microrganismos padrões utilizados no presente estudo, *Staphylococcus aureus* (0,250 mg.mL⁻¹) e *Escherichia coli* (0,500 mg.mL⁻¹), além da bactéria *Helicobacter pylori* (0,125 mg.mL⁻¹). Porém, quando o extrato bruto metanólico foi separado em frações com o uso de acetato de etila e água, o efeito sobre a *H. pylori* foi perdido passando a apresentar CIM > 0,1000 mg.mL⁻¹ e 0,500 mg.mL⁻¹, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2019). O autor conclui que os resultados sugerem que a atividade da *B. intermedia* se deve a mais de um constituinte e que ocorre uma ação sinérgica entre os bioativos presentes no extrato bruto, sendo isso também confirmado por Cardoso; Bauab; Varanda, (2015), que estudando um dos componentes majoritários de *B. intermedia*, o bioflavonóide amentoflavona, deixou de observar a ação antimicrobiana obtendo valores de CIM > 0,1000 mg.mL⁻¹ contra *E. coli* e *S. aureus*. Esses dados reforçam o interesse no uso do extrato bruto no controle de bactérias contaminantes no processo fermentativo.

5.4 Estudo do controle de microrganismos, verificando os produtos obtidos da fermentação

Foram realizados o acompanhamento fermentações simultâneas para obtenção das amostras simuladas do processo produtivo sucroalcooleiro. Para controle foi utilizado somente o mosto (Amostra 1) e para simulação, quatro tipos de tratamentos: mosto + leveduras (Amostra 2), mosto + leveduras + bactérias (Amostra 3), mosto + leveduras + bactérias + extrato vegetal (Amostra 4) e mosto + leveduras + bactérias + Kamoran® (Amostra 5).

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos pelas análises por cromatografia líquida (HPLC) do mosto e dos vinhos resultantes. Na Tabela 18 podem ser verificados os resultados dos açúcares fermentescíveis totais e do consumo para conversão em produtos (substâncias) da fermentação.

Tabela 17. Resultado das análises por cromatografia líquida (HPLC).

Produto	Amostras (g.L ⁻¹)				
	Mosto	Vinho (fermentação – 6 horas)			
	1	2	3	4	5
Glicose	83,8	8,4	6,4	5,8	5,2
Frutose	58,8	29,6	23,8	28,1	23,4
Ácido Succínico	0,0	0,9	0,8	0,7	0,8
Glicerol	0,0	4,5	3,8	5,5	4,2
Etanol	0,0	37,6	31,6	36,1	36,3

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 18. Açúcares fermentescíveis totais e consumo para conversão em produtos da fermentação

Produto	Amostras (g.L ⁻¹)				
	Mosto	Vinho (fermentação – 6 horas)			
	1	2	3	4	5
Glicose	83,8	8,4	6,4	5,8	5,2
Frutose	58,8	29,6	23,8	28,1	23,4
Total	142,5	38,0	30,2	33,9	28,7
Consumo de açúcares (*)	-	104,5	112,3	108,6	113,8

(*) Açúcares consumido é a diferença entre açúcares totais do mosto e os açúcares totais residuais presentes no vinho após a fermentação por um período de 6 horas.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os dados sobre o açúcar total consumido e o etanol produzido são apresentados na Tabela 19 e as análises estatísticas para esse dado na Tabela 20.

Tabela 19. Açúcar total consumido e etanol produzido.

Produto	Amostras (g.L ⁻¹)			
	2	3	4	5
Açúcar consumido	104,5 ± 0,7	112,3 ± 5,1	108,6 ± 1,6	113,8 ± 4,2
Etanol produzido	37,6 ± 0,5	31,6 ± 4,1	36,1 ± 3,8	36,3 ± 4,9

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 20. Análise estatística das variáveis da Tabela 19.

Produto	F	CV%
Açúcar consumido	2,44 ns	3,8
Etanol produzido	0,76 ns	7,5

ns, * - não significativo e significativa a 5% de probabilidade respectivamente.

Foi possível observar que a produção média de etanol, pelo processo de fermentação (g.L⁻¹), nos quatro tratamentos foram diferentes, sendo no tratamento 2

a maior produção (37,6 g.L⁻¹) e no tratamento 3 a menor produção (31,6 g.L⁻¹). Os tratamentos 4 (com extrato vegetal) e 5 (com Kamoran®) ficaram com uma produção próximo do tratamento 2, com produção de 36,1 g.L⁻¹ e 36,3 g.L⁻¹, respectivamente. Esses valores indicam uma tendência de que os tratamentos com extrato vegetal e com o Kamoran® contribuíram para o controle dos microrganismos contaminante. A análise estatística ANOVA, análise de variância estatística, que é um robusto método estatístico, e fornece resultados confiáveis mesmo em tratamentos onde tenha uma considerável heterocedasticidade, mas para isso é fundamental que os tamanhos amostrais sejam iguais ou, pelo menos, aproximadamente iguais, indicou pelo teste F que não há diferença significativa entre as médias (Tabela 20).

As Tabelas 21 e 22 apresentam os dados da produção de etanol (g) por 100g de açúcar total e eficiência fermentativa, respectivamente.

O rendimento prático (Y_P), corresponde a quantidade real produzida de etanol, e sua relação com a quantidade de substrato, os açúcares fermentescíveis consumidos, e utilizando o cálculo do fator de conversão (SILVA; BARBON; BRONZATTO, 2017) é possível calcular a quantidade de etanol por 100g de açúcar.

Tabela 21. Produção de etanol – g.100g⁻¹ de açúcar total

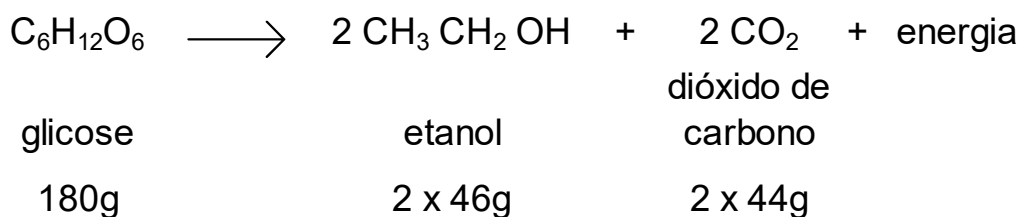
Produto	Amostras (g.100g ⁻¹ de açúcar total)			
	2	3	4	5
Etanol	36,00	28,09	33,23	31,91

Fonte: Dados da pesquisa.

A eficiência fermentativa, calculada a partir da relação entre o rendimento prático (Y_P) e o teórico (Y_t), o rendimento teórico deduzido da equação de Gay-Lussac para a fermentação alcoólica (Figura 18), onde 180g de glicose produz 92g de etanol e para 100g de glicose produz 51,11g de etanol, dessa forma a eficiência

fermentativa (Eficiência (%)) = $Y_P/Y_t \times 100$), apresentada na Tabela 22, é um parâmetro que pode ser usado para comparar os resultados obtidos com o processo fermentativo dos tratamentos.

Reação de Gay-Lussac



Cálculo do rendimento teórico (Y_t)

180g (glicose) ——— 92g (etanol)

100g (glicose) ——— Xg (etanol)

X = 51,11g de etanol

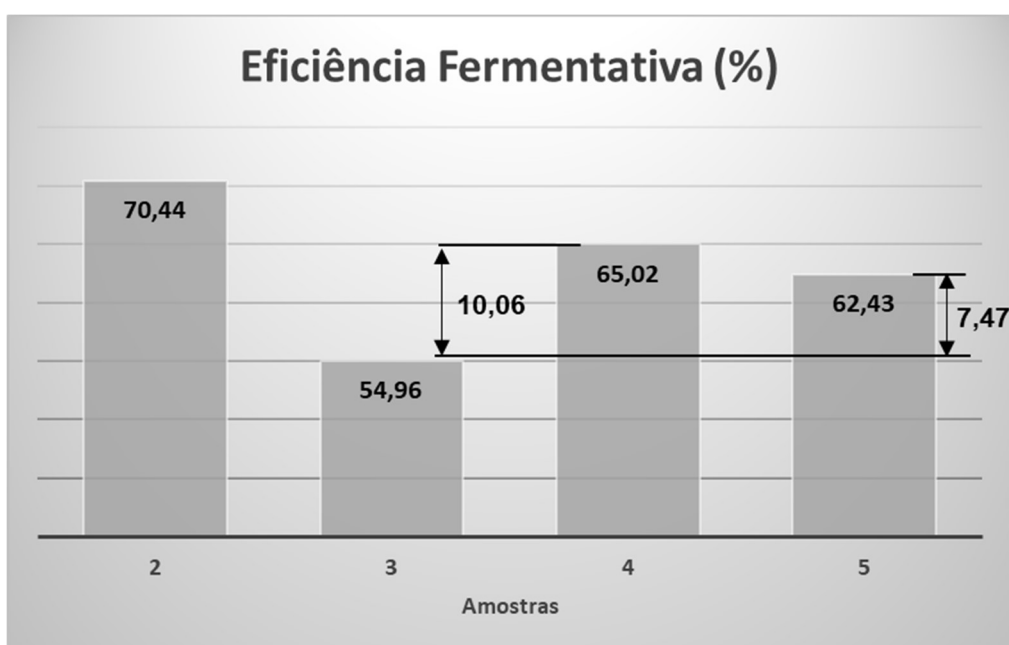
Figura 18. Cálculo do rendimento teórico (Y_t) a partir da reação de Gay-Lussac.

Tabela 22. Eficiência fermentativa

Rendimento	Amostras (g.L ⁻¹)			
	2	3	4	5
Teórico (Y_t)	51,11	51,11	51,11	51,11
Prático (Y_P)	36,00	28,09	33,23	31,91
Eficiência (%) ($Y_P/Y_t \times 100$)	70,44	54,96	65,02	62,43

Fonte: Dados da pesquisa.

Os dois tratamentos onde foram adicionadas as bactérias e receberam extrato vegetal (tratamento 4), e Kamoran® (tratamento 5), tiveram ganhos em pontos percentuais de eficiência fermentativa de 10,06 e 7,47 respectivamente (Figura 19) o que indica que os produtos utilizados para o controle dos microrganismos contaminantes produziram efeitos positivos no processo fermentativo, indicando um melhor desempenho do processo de produção com o uso do extrato de *Byrsonima intermedia*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 19. Eficiência fermentativa (%) e o ganho em pontos percentuais.

Leite *et al.*, (2013), estudando extrato de lúpulo na fermentação, também obteve valores semelhantes ao observado para o produto comercial Kamoran®. Mutton *et al.*, (2014), observaram um aumento de 7% no teor alcoólico do vinho obtido da fermentação com extrato de própolis verde.

Outras substâncias encontradas nas amostras, formadas durante o processo fermentativo, como ácido succínico (Tabelas 23 e 24) e glicerol (Tabelas 25 e 26), competiram com a produção de etanol consumindo açúcares para sua produção. O ácido succínico consumiu uma média de 0,3 a 1,2 g.100g⁻¹ de açúcar total e o glicerol em torno de 2,0 a 6,0 g.100g⁻¹ de açúcar total.

Tabela 23. Produção de ácido succínico na fermentação

Tratamentos	2	3	4	5
Ácido Succínico (g.L ⁻¹)	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 24. Produção de ácido succínico na fermentação – g.100g⁻¹ de açúcar total

Tratamentos	2	3	4	5
Açúcar consumido (g.L ⁻¹)	104,5	112,3	108,6	113,8
Ácido succínico (g.L ⁻¹)	0,9	0,8	0,7	0,8
Ácido succínico g.100g ⁻¹ de açúcar total	0,8	0,7	0,7	0,7

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores médios obtidos nos tratamentos, para o ácido succínico e o glicerol, estão dentro da normalidade em um processo fermentativo (SANTOS; SOUZA, 2014).

Tabela 25. Produção de glicerol na fermentação

Tratamentos	2	3	4	5
Glicerol (g.L ⁻¹)	4,5 ± 0,1	3,8 ± 0,5	5,5 ± 0,8	4,2 ± 0,6

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 26. Produção de glicerol na fermentação - g.100g⁻¹ de açúcar total

Tratamentos	2	3	4	5
Açúcar consumido (g.L ⁻¹)	104,5	112,3	108,6	113,8
Glicerol (g.L ⁻¹)	4,5	3,8	5,5	4,2
Glicerol g.100g ⁻¹ de açúcar total	4,3	3,4	5,1	3,7

Fonte: Dados da pesquisa.

6 Conclusão

Com base nos dados obtidos foi possível verificar que o extrato aquoso do vegetal do cerrado, *B. intermedia*, mostrou ser efetivo em baixas dosagens para amostras bacterianas isoladas de processos fermentativos diferentes e durante a fermentação apresentou resultados semelhantes ao produto comercial Kamoran® para o controle de microrganismos contaminantes do processo.

Os resultados obtidos acentuam qualidades desejáveis do extrato aquoso para uso nas unidades produtoras, por ser mais viável economicamente sua obtenção e ser facilmente solúvel, podendo ser uma alternativa para o controle microbiano em processos fermentativos para a produção de bioetanol.

A análise econômica definiu um preço de equilíbrio por quilo do extrato vegetal em valores bem inferior ao preço do antibiótico comercial, mas a margem bruta gerada a cada 100 milhões de litros de etanol produzido, permite admitir que seu preço possa ser muito maior que o preço de equilíbrio, utilizando parte da margem obtida para custear um valor maior por quilo do extrato vegetal aquoso de *Byrsonima intermedia*.

7 Referências

ABU-DARWISH, M. S.; EFFERTH, T. Medicinal plants from near east for cancer therapy. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 56, 2018.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D. G.; LIGHTFOOT, D. A. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6, n. 4, p. 42, 2017.

ANAND, U.; NANDY, S.; MUNDHRA, A.; DAS, N.; PANDEY, D. K.; DEY, A. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 51, p. 100695-100695, 2020.

ALVES, T. M. D. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. D. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267, 2011.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>. Acesso em: 23 Jun. 2020a.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/dados-estatisticos>. Acesso em: 29 Jun. 2020b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5a ed. 2010. v. 2, p. 1-523.

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. **Amb Express**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2012.

BIOMA LEGAL. Biomas no Estado de São Paulo – Resolução SMA nº146, 2017. Disponível em: https://biomalegal.com.br/essential_grid/biomas-no-estado-de-sp-sma-146/. Acesso em: 07 Jul. 2020.

BIOTA. Integrando a caracterização, conservação, restauração e o uso sustentável da biodiversidade. Disponível em: <http://www.biota.org.br/>. Acesso em: 07 Jul. 2020.

BONA, E. A. M. D.; PINTO, F. G. D. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. D. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e

determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423–434, 2017.

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

CARDIM, R. Dia da árvore – homenagem aos muricis-do-campo paulistanos. 2011. <https://arvoresdesaopaulo.wordpress.com/2011/09/19/dia-da-arvore-homenagem-aos-muricis-do-campo-paulistanos/>. Acesso em: 07 Jul. 2020.

CARDOSO, C. R. P.; BAUAB, T. M.; VARANDA, E. A. Controle de qualidade e avaliação da atividade farmacológica do extrato de *Byrsonima intermedia* e da Amentoflavona. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 3, p. 35-42, 2015.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 80, 2018.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/consultas-ao-banco-de-dados-do-site.aspx>. Acesso em: 15 Set. 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Observatório Agrícola: monitoramento agrícola. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Nono levantamento, Safra 2019/20, v. 7, n. 9, p. 1-66, junho, 2020a. Disponível em:

https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/32042_910765cf5dc2d088c377e32cdef6fc72.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Observatório Agrícola: Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**. Primeiro levantamento, Safra 2020/21, v. 7, n. 1, p. 1-62, maio, 2020b. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31188_59a3ca776bb30fa3764094b3acad2b1c.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical Lab Standards Institute**. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.

DELLA-BIANA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. 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.

DONG, S. J.; LIN, X. H.; LI, H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. The **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 68, p.33-41, 2015.

ECKERT, C. T.; FRIGO, E. P.; ALBRECHT, L. P.; ALBRECHT, A. J. P.; CHRIST, D.; SANTOS, W. G.; BERKEMBROCK, E.; EGEWARTH, V. A. Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3907-3912, 2018.

EPE. Empresa de Pesquisa Energética. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis, ano 2018**. Anuário. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia, 2019. 77 p.

EUROPEIA, Comissão. Comunicação da comissão ao parlamento europeu, ao conselho, ao comité económico e social europeu e ao comité das regiões. **Relatório intercalar sobre as energias renováveis**, v. 225, 2019.

FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica. **Bioenergia em Revista**, v. 3, n. 2, p. 29–37, 2013.

FURTADO, J. M.; DA SILVA AMORIM, Á.; DE MACEDO FERNANDES, M. V.; OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. **Journal of Health Sciences**, v. 17, n. 4, p. 233-237, 2015.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 2019.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População do Brasil. População estimada. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html?utm_source=portal&utm_medium=popclock&utm_campaign=novo_popclock. Acesso em: 07 Ago 2019.

KHAMENEH, B.; IRANSHAHY, M.; SOHEILI, V.; BAZZAZ, B. S. F. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 118, 2019.

KLEIN, E. Y.; VAN BOECKEL, T. P.; MARTINEZ, E. M.; PANT, S.; GANDRA, S.; LEVIN, S. A.; GOOSSENS, H.; LAXMINARAYAN, R. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 15, p. E3463-E3470, 2018.

KUBILIENE, L.; JEKABSONE, A.; ZILIUS, M.; TRUMBECKAITE, S.; SIMANAVICIUTE, D.; GERBUTAVICIENE, R.; MAJIENE, D. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 165, 2018.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D.; REIS, M. H.; DE 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.

LIU, Q.; Meng, X.; Li, Y.; Zhao, C. N.; Tang, G. Y.; Li, H. B. Antibacterial and antifungal activities of spices. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1283, 2017.

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. A *et al.* Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (M. M. A.). Biodiversidade Brasileira. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: 07 Jul. 2020a.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (M. M. A.). O bioma cerrado. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 07 jul. 2020b.

MADALENO, L. L.; ARMOA, M. H.; SALARO, M. C. F. Control of contamination in dilution water used in molasses must preparation. **Ciência & Tecnologia**, v. 11, n. 1, p. 5-14, 2019.

MADALENO, L. L.; MINARI, G. D.; DE ANNUNZIO, F. R.; DE CARVALHO, M. R.; JÚNIOR, G. R. B.; SALES, D. C.; FRIGIERI, M. C. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. **Científica**, v. 44, n. 2, p. 226–234, 2016.

MASSON, I. D. S.; COSTA, G. H. G.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A. D.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1695-1700, 2015.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. D.; SOUZA-BRITO, A. R.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. Atividade antimicrobiana de espécies de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 690-695, 2008.

MOLONEY, M. G. Natural products as a source for novel antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8, p. 689-701, 2016.

MOREIRA, L. Q. **Avaliação química e biológica da espécie *Byrsonina intermedia* A. Juss.** 2010. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2010.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

MUTTON, M. J. R.; OLIVEIRA FILHO, J. H. D.; COSTA, G. H. G.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A. D. Green and brown propolis: efficient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 767-772, 2014.

NAGHSHBANDI, M. P; TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; GUPTA, V. K.; SULAIMAN, A.; KARIMI, K.; MOGHIMI, H.; MALEKI, M. Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109353, 2019.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D.R. (Editors). **The Alcohol Textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. 4th. ed. Nottingham, UK: Alltech Inc, 2003. Chapter 20, p. 287-298.

NASCIMENTO, A.M. **Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville.** 2008. 159p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. D. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1–16, 2010.

NIELSEN J.; LARSSON C.; VAN MARIS A.; PRONK J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 398–404, 2013.

OLIVEIRA, J. A.; GARBIN, J. R.; CAMARA, C.; FRIGIERI, M. C.; MADALENO, L. L. Radiação Ultravioleta no controle dos microrganismos na água de diluição e no mosto de melaço. **STAB**, v. 32, n.1, p. 49-53, 2013.

OSTROSKY, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O.; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PRONK, J. T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

RAVANELI, G. C.; GARCIA, D. B.; MADALENO, L. L.; MUTTON, M. Â.; STUPIELLO, J. P.; MUTTON, M. J. R. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 120–129, 2011.

RFA. Industry statistics, Renewable Fuels Association, Washington, DC., USA. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>. Acesso em: 7 Jul. 2020.

RICH, J. O.; BISCHOFF, K. M.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; LIU, S.; SKORY, C. D. Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 357–362, 2018.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, A. M.; NUNNALLY, M. S. Biofilmformation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 347-354, 2015.

ROITMAN, Tamar. Programas internacionais de incentivo aos biocombustíveis e o RenovaBio. **Boletim de Conjuntura**, n. 3, p. 19-25, 2019.

SALAM, A. M.; QUAVE, C. L. Opportunities for plant natural products in infection control. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 189-194, 2018.

SALES, G. W. P.; BATISTA, A. H. M.; ROCHA, L. Q.; NOGUEIRA, N. A. P. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 709-715, 2014.

SANTOS, M. A.; SOUZA, A. C. C. Aspectos da conversão de glicerol em etanol: análise bibliográfica. In: **ENEPEX: Encontro de ensino, pesquisa e extensão, 8º ENEPE UFGD–5º EPEX UEMS**, 2014. Disponível em: <http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/375.pdf>. Acesso em: 28 Jul 2020.

SANTOS, R. D. C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; ZANATTA, A. C.; RODRIGUES, C. M.; TAMASHIRO, J. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1112-1123, 2019.

SANTOS, R. D. C.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; SANNOMIYA, M.; DA ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss. In: ALBUQUERQUE, U. P.; PATIL, U.; MÁTHÉ, Á. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Dordrecht: Springer Nature, 2018. p. 145-152.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 4, p. 307-329, 2016.

SCHNEIDER, Ferdinand (Ed.). **Sugar analysis: Official and tentative methods recommended by the international commission for uniform methods of sugar analysis (ICUMSA)**. 2nd. ed. Peterborough, England: ICUMSA, 1979.

SEKOAI, P. T.; MHLONGO, S. I.; EZEOKOLI, O. T. Progress in the development of methods used for the abatement of microbial contaminants in ethanol fermentations: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, p. 1-27, 2019.

SILVA, D. M. **Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina**. 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

SILVA, D. C. M. N.; BARBON, F. F.; BRONZATTO, R. B. Comparação da eficiência fermentativa na produção de etanol por linhagem nativa e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Científica de Ciências Aplicadas – FAIP**, v. 4, n. 7, p. 12-30, 2017.

TIWARI, P.; KUMAR, B.; KUMAR, M.; KAUR, M.; DEBNATH, J.; SHARMA, P. Comparative anthelmintic activity of aqueous and ethanolic stem extract of *Tinospora cordifolia*. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 3, n. 1, p. 70-83, 2011.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Unicadata. 2020. Disponível em: <https://unicadata.com.br>.

UPADHYAY, A.; UPADHYAYA, I.; KOLLANOOR-JOHN, A.; VENKITANARAYANAN, K. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 761741, p. 1-18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/761741>.

VIDAL, M.F. Produção e uso de biocombustíveis no Brasil. **Caderno Setorial Etene**, v. 2, n. 79, p. 1-13, 2019.

WALTER, A. L.; Yang, D.; Zeng, Z.; Bayrock, D.; Urriola, P. E.; Shurson, G. C. Assessment of antibiotic resistance from long-term bacterial exposure to antibiotics commonly used in fuel ethanol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 66, 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018**. early implementation. Geneva: World Health Organization, 2018.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 20, 2018.