



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102022012182-6 A2

(22) Data do Depósito: 20/06/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
02/01/2024

(54) **Título:** PROCESSO DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS POR COMPOSTOS INOVADORES IMOBILIZADOS OU DILUIDOS NO MEIO

(51) **Int. Cl.:** C12P 1/02; A01N 65/24; A01N 33/06; C12R 1/865.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** PEDRO DE OLIVA NETO; FABIANE FERNANDA DE BARROS RANKE.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS POR COMPOSTOS INOVADORES IMOBILIZADOS OU DILUIDOS NO MEIO. A presente invenção refere-se ao uso de novas moléculas antibacterianas no controle sobretudo de bactérias lácticas contaminantes de processos fermentativos industriais com o uso de leveduras ou outros microrganismos que sejam resistentes às moléculas antimicrobianas propostas. Dentre as vantagens do uso dessas moléculas livres ou imobilizadas estão: a) os corantes violeta genciana e o azul de metileno, quando combinados com monensina ou dióxido de cloro podem reduzir substancialmente o uso dessas duas moléculas com vantagens para o processo; b) a semente de abacate moída é um excelente agente antibacteriano e quando combinada através do processo proposto com alginato de cálcio ou outros agentes gelificantes, pode inibir completamente o crescimento de *Limosilactobacillus fermentum* (antigo *Lactobacillus fermentum* sendo essa a principal espécie contaminante da fermentação alcoólica industrial para produção de etanol carburante. No processo proposto pode-se ainda adsorver o corante violeta genciana ao gel de alginato de cálcio, com ligações de cross-linking com glutaraldeído na estrutura da semente de abacate moída e assim formar um pélete capaz de ser reutilizado para o controle do crescimento de *L. fermentum* por 43 ciclos consecutivos,...).

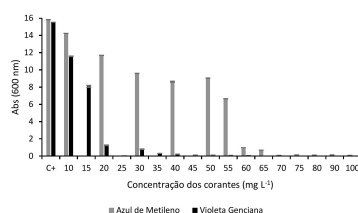


FIGURA 1

**“PROCESSO DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA
FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS POR COMPOSTOS INOVADORES
IMOBILIZADOS OU DILUIDOS NO MEIO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] A presente invenção se insere no campo da biotecnologia, e refere-se ao desenvolvimento de novas moléculas para uso como antibacterianos em processos fermentativos onde leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas, para a produção do etanol carburante, cerveja, cachaça, vinho, fermento de panificação, ou para outros fins.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[02] A bactéria láctica recentemente reclassificada *Limosilactobacillus fermentum* (também conhecida como *Lactobacillus fermentum*), outros lactobacilos e algumas bactérias do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*) representam predominantemente as bactérias contaminantes em destilarias brasileiras produtoras de etanol combustível (DELLIAS et al., 2018; OLIVA-NETO et al., 2013). *L. fermentum* utiliza carboidratos contidos no meio para produzir ácido láctico, que, além de reduzir a produção de álcool, inibe a fermentação de leveduras (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; DA SILVA-NETO et al., 2020; REIS et al., 2018).

[03] Estas bactérias causam vários distúrbios aos processos fermentativos tais como perda de etanol (rendimento menor), produção de moléculas que inibem as leveduras tais como ácidos orgânicos, levando ao aumento de proteína solúvel, o que aumenta a contaminação bacteriana, maior aglutinação do fermento (floculação celular), uso de antibióticos e biocidas caros, uso maior de dispersantes e antifloculantes (tais como ácido mineral), liberação de substâncias que alteram o gosto de bebidas fermentadas diminuindo a qualidade das mesmas.

[04] Por estas razões, métodos de controle do crescimento destas bactérias são frequentemente utilizados com destaque para o uso de antibióticos, biocidas, ácidos minerais, limpeza e desinfecção de equipamentos, o que significa aumento dos custos de produção. Há limitações também quanto ao tipo de agente de controle antimicrobiano, pois parte da levedura é comercializada como farinha de levedura o que limita o uso de antibióticos e outras moléculas que são

empregadas no controle do processo, diluindo-as no caldo fermentado ou suspensão de células.

ESTADO DA TÉCNICA

[05] Alguns documentos do estado da técnica descrevem a possibilidade de se obter etanol do caroço de abacate e destacam a inibição de leveduras pelo caroço de abacate nas concentrações testadas, bem como documentos que descrevem a atividade antimicrobiana do azul de metileno e seu uso como insumo de processo de avaliação de viabilidade celular, tais como:

[06] O documento de Amado et al. (2019) intitulado Braz. J. Food Technol. - "Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (*Persea americana* Mill.)" destaca a atividade antibacteriana do abacate que foi maior na casca e semente e mais baixa na polpa para a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* (2500 mg/L) e outros patógenos. Porém a bactéria que afeta a fermentação alcoólica é do grupo das lácticas, tais como o *Lactobacillus fermentum*, e não foi estudada por este e nenhum dos outros trabalhos citados neste artigo. Além disso, nesta invenção proposta não se pretende gastar 2500 mg/l de casca de abacate na fermentação, pois seria antieconômico, e mesmo que fosse 10 vezes menos, continuaria sendo inviável. Na presente invenção, temos uma reação da semente do abacate com o agente de cross-linking glutaraldeído envolvido numa matriz gelatinosa de alginato, o que confere uma aplicação da semente do abacate moída, agora aprisionada, fixada num suporte insolúvel, o que permite várias reutilizações do agente antimicrobiano, tornando tal procedimento viável economicamente.

[07] No artigo de Kate & Lucky (2009) testou-se apenas a atividade bioquímica do efeito da semente do abacate (*Persea americana*) em ratos e foram avaliados colesterol, glicose e outros parâmetros, mas não ação antibacteriana.

[08] Rodriguez-Carpena et al (2011) também avaliaram o abacate e encontrou-se uma ação antibacteriana contra bactérias classificadas como moderada. Novamente, o que foi realizado foi apenas o teste da extração de moléculas da fruta (casca, pele e semente) em solventes orgânicos (acetona, metanol ou acetato de etila) e testes genéricos de atividade antioxidante e antibacteriana. Nada comparável ao que está descrito neste documento, onde

uma nova tecnologia está sendo proposta para resolver o problema da contaminação na produção de etanol carburante, com ênfase no reuso de um composto peletizado (imobilizado) resultante da combinação dos compostos semente de abacate moída numa matriz de alginato de cálcio, reagida com glutaraldeído, a qual pode ainda receber um banho de imersão numa solução contendo um corante. Tais péletes tem formato de gel solidificado, com forma oval ou redonda, e resistente o qual pode ser filtrado e reutilizado várias vezes e inibe apenas as bactérias lácticas, sem que haja inibição da levedura do processo.

[09] O documento intitulado “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AVOCADO SEED EXTRACTS AGAINST BIOETHANOL YEAST STRAINS” dos anais do III Congresso Paranaense de Microbiologia compreende um estudo no qual são testados os efeitos de caroço de abacate contra leveduras. Os experimentos apresentaram um efeito de inibição do crescimento da levedura frente a aplicação do caroço de abacate, mas não em bactérias, e nem da forma como está sendo proposto, através de modificação química desta semente moída com o agente glutaraldeído e envolvida na matriz de alginato, forma essa que não inibiu a levedura nas dosagens testadas na presente invenção.

[010] O documento intitulado “Avaliação da produção de bioetanol a partir do caroço de abacate da variedade Hass”, apresentado durante o Seminário de Iniciação Científica e Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão, descreve a obtenção de bioetanol a partir de caroço de abacate, destacando o baixo teor obtido de etanol na produção. Neste caso, o caroço é usado como fonte de açúcares e não como antimicrobiano. A dissertação de mestrado referente à “Avaliação da produção de bioetanol a partir do caroço de abacate da variedade Hass” também avaliou o potencial de fornecimento de açúcares (fonte de carbono) para conversão em etanol, e não o uso da semente como antimicrobiano. Neste trabalho testes de viabilidade de leveduras foram realizados usando-se o corante azul de metileno, o qual é citado como insumo para análise da viabilidade da levedura num método de coloração celular, e não como descontaminante do processo.

[011] O artigo intitulado “Microbial inactivation properties of methylene blue - citrate solution” publicado pela Asaio bioengineering/tissue engineering abstracts destaca a atividade antimicrobiana do azul de metileno, porém este corante não foi associado ao caroço de abacate, e nem ligado quimicamente com

glutaraldeído para produção de péletes de agente antimicrobiano imobilizado, o qual tornou possível, nesta presente invenção, a re-utilização por 43 vezes. Também não se refere ao controle de bactérias lácticas como é o caso deste documento.

[012] Por fim, o artigo “Efecto antifúngico de la terapia fotodinámica sobre *Candida albicans* con diferentes fotosensibilizadores: violeta de genciana a 0.01 % e azul de metileno al 0.01%. Estudio “in vitro” publicado pela Universidad Central del Ecuador destaca a atividade antifúngica do corante violeta genciana (cloreto de pararosanilina). Neste caso, ressalta-se a ação fotossensibilizadora do corante em uma levedura patogênica e não em uma bactéria láctica, como descrito neste documento.

[013] A partir do estado da técnica citado, não foram encontrados estudos que apresentem uma proposta de um agente antimicrobiano a base de semente de abacate envolvido numa matriz gelatinosa de alginato de cálcio e que sofreu reação com glutaraldeído, para que, desta forma pudesse ser usado para uma ação específica de controle do crescimento de bactérias lácticas, sem alterar viabilidade da levedura ou causar inibição do seu crescimento, e ainda pudesse ser reutilizado com sucesso por várias vezes, o que é fundamental para que o processo seja econômico, atributo fundamental para o uso industrial. Ainda, não foram encontradas menções ao efeito técnico do azul de metileno em sinergia com outros descontaminantes de leveduras para fermentação alcoólica, o que foi feito na presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[014] A presente invenção tem por objetivo propor novas moléculas para uso como antibacterianos em processos fermentativos, onde leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas, seja para a produção do etanol carburante, cerveja, cachaça, vinho, fermento de panificação, ou para outros fins.

[015] Dentre os compostos utilizados destacam-se a semente de frutas com destaque para o abacate (*Persea americana*), com ou sem participação de corantes, tais como o cristal violeta, também conhecido como violeta genciana, podendo ser, preferencialmente, imobilizados numa matriz porosa ou suportes sólidos, o que permite o seu reuso, ou usados de forma dispersa na suspensão

de leveduras ou caldo fermentado, combinados ou não com outras moléculas de uso frequente na indústria, neste caso sem a capacidade de reutilização do produto. Portanto, a semente de abacate moída e o corante citado podem ser usados de forma livre, dispersa, ou imobilizada, presa numa matriz gelificada ou sólida. Estes agentes podem também ser usados em sinergia com antibióticos como monensina, biocidas tais como dióxido de cloro ou outros compostos.

[016] O processo de imobilização da semente de frutas moída, tal como abacate, pode ser realizado através de compostos como alginato de cálcio, poliacrilamida, gelatina, amido ou outras moléculas com capacidade de formar gel poroso ou matriz sólida, tais como ligação covalente com fibras, sílica ou metais. No entanto, neste trabalho foi feita a imobilização com gel de alginato de cálcio.

[017] O processo de imobilização da semente de abacate consiste de: a) uma mistura de 1 a 4% de alginato de sódio, preferencialmente 2,5% (m v^{-1}) e 0,1 a 20% (m v^{-1}), preferencialmente, 4% de semente de abacate moída (em pó) em meio aquoso, misturado bem a temperatura de 10 a 80 °C, preferencialmente 20-35 °C, pelo tempo que desejar, preferencialmente por alguns segundos ou até 60 min. b) após a mistura dos componentes num meio aquoso, é feito o processo de peletização, o qual consiste do gotejamento desta mistura via pipeta ou máquina específica para gotejar grandes quantidades desta mistura em recipiente contendo solução de cloreto de cálcio contendo 0,01 a 50 M preferencialmente 0,3 M (molar), com 0 a 30% (m v^{-1}) de glutaraldeído, preferencialmente 2% (m v^{-1}). O glutaraldeído serve para criar mais ligações com o grupo carbonila no caso de aprisionar outras moléculas, além da própria esterilização dos péletes. Após o preparo dos péletes de semente de abacate imobilizada, os mesmos podem, opcionalmente, ser lavados com solução de cloreto de cálcio, água ou qualquer outra solução salina a base de cálcio preferencialmente.

[018] Os péletes aqui também denominados esferas Al/Av (Alginato/Avocado ou Abacate) prontos já podem ser usados para a descontaminação do fermento de leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) ou outra biomassa que seja compatível com essa formulação, ou seja, não seja inibida por essa formulação.

[019] Opcionalmente, os péletes de Al/Av podem ser adsorvidos com solução

de cristal violeta e assim receber outro agente antibacteriano. Assim, 0,1 a 100 g, preferencialmente 4,0 g de esferas Al/Av são adicionados a 100 mL de solução de corante (100 mg L^{-1}) e agitados a 60°C durante 1 h; e depois disso, os péletes são mantidos em solução a 25°C durante a noite. Em seguida, eles são lavados com água destilada e armazenados em solução de cloreto de cálcio 0,3 M com glutaraldeído a 2%, tais péletes vão incorporar o corante e este não sai mais mesmo reutilizando os péletes por diversas vezes.

[020] Desta forma, com o uso dos péletes de semente de abacate moída e embebida em uma matriz gelatinosa de alginato, produzidos a partir do gotejamento dessa mistura em solução de cloreto de cálcio e glutaraldeído, podem ainda receber um banho (imersão) com corantes específicos tais como a solução de violeta genciana (cristal violeta). Tais péletes são então misturados com uma suspensão de leveduras contaminadas com bactérias, por tempo de contato que pode variar de 0,5 h a 24 h, preferencialmente 3 a 6 horas, ocorre a descontaminação do fermento, ocorre pela morte seletiva das bactérias que entram em contato com os agentes antimicrobianos presos na matriz gelatinosa dos péletes. Quando essas células bacterianas entram nestes péletes sofrem uma forte inibição do seu metabolismo e morrem, mantendo o metabolismo das células de leveduras ativo. Esta é a base principal da tecnologia proposta nesta patente.

[021] A partir dos ensinamentos da presente invenção é possível descontaminar fermentos em processos biológicos tais como produção de cerveja, cachaça, etanol carburante, vinho ou quaisquer outros processos que necessitem da descontaminação do fermento de leveduras contaminadas com bactérias lácticas. Trata-se, portanto, de um processo desenvolvido com perfeição e eficiência, no intuito de oferecer as condições operacionais específicas que resultam num cultivo de leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, com ausência ou baixos níveis de contaminação bacteriana.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[022] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas figuras as quais se faz referência, conforme a seguir.

[023] A Figura 1 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *Limosilactobacillus fermentum* perante diferentes concentrações de Azul de Metileno e Violeta Genciana em meio MRS a 37°C .

[024] A Figura 2 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento da bactéria láctica *Limosilactobacillus fermentum* perante diferentes concentrações de monensina sódica (sodium monensin) em meio MRS a 37 °C.

[025] A Figura 3 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *Limosilactobacillus fermentum* perante diferentes concentrações de Dióxido de Cloro de uso industrial marca A (DCA), em meio MRS a 37 °C.

[026] A Figura 4 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *Limosilactobacillus fermentum* perante diferentes concentrações de Dióxido de Cloro uso industrial marca B (DCB), em meio MRS a 37 °C.

[027] A Figura 5 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de Violeta Genciana e Monensina Sódica em meio MRS a 37 °C. As concentrações estão descritas na Tabela 1.

[028] A Figura 6 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de Violeta Genciana e Dióxido de Cloro de uso industrial marca A em meio MRS a 37 °C. As concentrações estão descritas na Tabela 1.

[029] A Figura 7 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de Violeta Genciana, Monensina Sódica e Dióxido de Cloro de uso industrial marca A em meio MRS a 37 °C. As concentrações usadas estão descritas na Tabela 1.

[030] A Figura 8 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de Violeta Genciana e Azul de Metileno em meio MRS a 37 °C. Concentrações descritas na Tabela 2.

[031] A Figura 9 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de Azul de Metileno e Monensina Sódica. Concentrações descritas na Tabela 2.

[032] A Figura 10 se refere ao gráfico representativo da absorbância

relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de azul de metileno e dióxido de cloro marca A em meio MRS a 37 °C. Concentrações descritas na Tabela 2.

[033] A Figura 11 se refere ao gráfico representativo da absorbância relacionada ao crescimento de *L. fermentum* para avaliar sinergia entre mistura de azul de metileno, monensina e dióxido de cloro marca A em meio MRS a 37 °C. Concentrações descritas na Tabela 3.

[034] A Figura 12 se refere ao gráfico representativo do efeito dos péletes de alginato com pó de semente de abacate e os corantes azul de metileno e violeta genciana no crescimento de *L. fermentum* em meio MRS a 37 °C.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[035] A contaminação bacteriana pode resultar na perda de 10.000 a 30.000 litros de bioetanol por dia em uma produção de um milhão de litros (AMORIM et al., 2011; OLIVA-NETO et al., 2013). Além da produção de ácido, *L. fermentum* causa sérios problemas de floculação de levedura, resultando na diminuição da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação e despesas químicas adicionais levando ao aumento do custo do etanol (CECCATO-ANTONINI, 2018; LOPES et al., 2016; OLIVA NETO; YOKOYA, 1997).

[036] Os tratamentos de controle bacteriano da fermentação de etanol combustível para serem eficazes incluem o controle do crescimento de *L. fermentum* e outras bactérias de ácido láctico. Os métodos explorados para combater a contaminação incluem pré-tratamento da matéria-prima, mudanças nas condições do processo, como sólidos e teor de pH, limpeza do equipamento de fermentação, antibióticos, bactericidas e lavagem da levedura utilizada nas fermentações da cana-de-açúcar (KIM et al., 2018).

[037] Atualmente, o tratamento ácido de leveduras, equipamentos de limpeza e antibióticos são as medidas mais utilizadas na indústria. No entanto, a lavagem ácida estressa a fermentação da levedura e pode levar à diminuição da eficiência da produção do etanol (BASSO et al., 2011; CECCATO-ANTONINI, 2018). Aumento do desenvolvimento de resistência a antibióticos em cepas contaminantes também foi observado (MURPHREE; HEIST; MOE, 2014).

[038] O tratamento ácido das células de levedura ao final de cada ciclo de fermentação é fundamental para reduzir a contaminação bacteriana e os efeitos

nocivos sobre as leveduras, utiliza-se a redução do pH 2,5 com ácido sulfúrico (BASSO et al., 2014). Este método é utilizado não apenas para reduzir contaminantes, mas também para prevenir a floculação de leveduras (OLIVA NETO; YOKOYA, 1997a). Experimentos in vitro mostraram uma redução de 3 log no número de *L. fermentum* com tratamento com ácido sulfúrico (COSTA; CERRI; CECCATO-ANTONINI, 2018); no entanto, na configuração industrial os números não são conhecidos.

[039] A lavagem com ácido das células para diminuir a contaminação bacteriana não é exclusiva da fermentação do etanol combustível. As cervejarias vêm usando essa técnica há muitos anos para eliminar as bactérias da levedura. Apesar dos efeitos negativos do ácido sobre a viabilidade e fisiologia da levedura, especialmente em condições desfavoráveis (armazenamento de longo prazo do inóculo, alto nível de contaminação e fermentações lentas), o tratamento com ácido em condições adequadas (agitação, temperatura de lavagem, sem armazenamento) não afeta sua fisiologia (SIMPSON; HAMMOND, 1989).

[040] Dentre os compostos químicos antimicrobianos testados em escala industrial, o dióxido de cloro é o que tem mais sucesso. Esta molécula é um forte oxidante com propriedades antimicrobianas contra bactérias, vírus, esporos e algas, e geralmente utilizada em sistemas hídricos (CECCATO-ANTONINI, 2018; LAPOLLI et al., 2005; OLMSTEAD, 2012). Destilarias brasileiras substituíram antibióticos e 40% da lavagem ácida por dióxido de cloro a 30 mg L⁻¹ (CECCATO-ANTONINI, 2018; FURTADO, 2013). Em 2012 a patente do dióxido de cloro foi aprovada no Brasil e comercializada para uso em fermentação pela DuPont™ Ferasure® (HARIS et al., 2018). Segundo os fabricantes, não deixa resíduos na levedura e outros subprodutos e evita o problema de resistência aos antibióticos e os riscos da lavagem com ácido sulfúrico (MENEHIN et al., 2008).

[041] Como apresentado, são poucos os produtos hoje disponíveis para o controle das bactérias da fermentação por leveduras e todos apresentam algum tipo de limitação para o seu uso. Por isso, há uma demanda crescente por antibacterianos menos nocivos para a produção de bioetanol combustível para evitar infecção bacteriana e diminuição da produção de etanol.

[042] O violeta de genciana (GV), também conhecida como genciana ou violeta

cristal ou cristal violeta, é um corante roxo derivado da anilina com propriedades antimicrobianas. Este corante se dissocia em íons positivos, que penetram em células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, interagindo com componentes carregados negativamente da parede celular bacteriana, incluindo lipopolissacarídeo, peptidoglicano e DNA (DRAGAN; MICHALAK, 2019). O GV pode causar danos ao DNA ou disfunção mitocondrial e a morte de microrganismos. Outra hipótese supõe que haja formação de complexos com a parede celular de bactérias ou distúrbios do metabolismo do ácido glutâmico com alta atividade bactericida ou bacteriostática. Observou-se também que o GV é capaz de se combinar com proteínas (GARUFI et al., 2014; PERRY et al., 2006). Esse potencial inibitório se aplica positivamente em bactérias Gram-positivas.

[043] A semente de abacate (*Persea americana*) entendemos que também é possível ser usada como agente antimicrobiano. Ela é subutilizada e representa grande parte da fruta, portanto seu uso pode ser uma alternativa para reduzir o custo de produção de alguns produtos como o óleo comestível (DUARTE et al., 2016). Esses resíduos da fruta são ricos em polifenóis com diversas propriedades funcionais como antioxidante, antimicrobiana, analgésica (SETYAWAN; SUKARDI; PURIWANGI, 2021), anticancerígeno, anti-inflamatório (AHMED et al., 2018), antidiabético, anti-hipertensivo, redutor de colesterol, efeitos dermatológicos, inseticida e até mesmo como corante (DABAS et al., 2013). Essas características são atribuídas a diversos grupos de compostos bioativos (fitoquímicos) como polifenóis, carotenoides, tocoferóis, entre outros (JIMENEZ et al., 2021). Extratos orgânicos de semente de abacate inibiram o crescimento in vitro de cepas de *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis* (LEITE et al., 2009), *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. ulcerans*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. typhi* (IDRIS; NDUKWE; GIMBA, 2009).

VANTAGENS DA TECNOLOGIA

[044] Como já foi dito, os métodos atuais de combate aos contaminantes dos processos fermentativos a partir de leveduras tem algum tipo de limitação. No caso de antibióticos como a monensina, podem deixar resíduos grudados nas leveduras e gerar, entre outros fatores, a impossibilidade de utilizá-las como suplementação animal

(OLMSTEAD, 2012), impedindo ganhos econômicos com esse subproduto. Devido à detecção residual de antibióticos acima do esperado, bem como ao aumento da resistência e toxicidade microbiana, diversos compostos estão com uso restrito ou proibido (CAETANO; MADALENO, 2011).

[045] A penicilina foi estudada no passado e interferiu no transporte ativo por inibir a biossíntese de constituintes essenciais da membrana (EGUCHI, 2007), porém, ao longo do tempo, o uso contínuo em escala industrial levou a uma adaptação biológica de contaminantes, portanto, este método não é mais empregado (OLIVA-NETO et al., 2012; SPELLBERG; GILBERT, 2014).

[046] Os antibióticos cloranfenicol e tetraciclina também foram usados, embora a penicilina seja amplamente mais vantajosa economicamente, mas todos eles tiveram seu uso limitado devido à resistência bacteriana (KARIKARI et al., 2017).

[047] O biocida pentaclorofenol foi utilizado durante anos nas proporções de 0,01 a 0,05 g L⁻¹ de mosto, com excelentes resultados, mas seu uso foi proibido devido aos efeitos tóxicos e cumulativos (LIMA et al., 2001). O hexaclorofeno, que em doses de 4 mg L⁻¹ de mosto, contribuiu para boas fermentações, porém também posteriormente teve efeitos tóxicos atribuídos a esse composto para animais, e esse método foi proibido no Brasil (GONÇALVES; GRAZIANO; KAWAGOE, 2012; LIMA et al., 2001).

[048] O tratamento ácido é atualmente empregado e traz benefícios ao processo, porém o ácido sulfúrico traz também efeitos negativos sobre a viabilidade e fisiologia da levedura, especialmente em condições desfavoráveis (armazenamento de longo prazo do inóculo, alto nível de contaminação e fermentações lentas), condições desfavoráveis onde a viabilidade do fermento (*S. cerevisiae*)

normalmente já é baixa. Nestes casos, o tratamento ácido acaba prejudicando o fermento (SIMPSON; HAMMOND, 1989, OLIVANETO et al 2013). Daí a necessidade de alternativas químicas que não afetem o fermento *S. cerevisiae*, quando este encontra-se em condições desfavoráveis.

[049] Pesquisas apontaram que o efeito do dióxido de cloro, atualmente utilizado para tratamento do fermento e outros processos de desinfecção, causa inibição da síntese proteica e a extensão dessa inibição é proporcional à dosagem inicial do dióxido de cloro (ROLLER; OLIVIERI; KAWATA, 1980). No entanto, o dióxido de cloro pode afetar a levedura no processo, causando inibição da viabilidade celular (MENECHIN et al., 2008), e seu uso deve ser limitado. Novamente, nos casos de alta contaminação, onde o fermento *S. cerevisiae* já está com baixa viabilidade, torna-se temeroso usar um produto que pode inibir ainda mais seu metabolismo, já enfraquecido por outros fatores adversos.

[050] Devido a todas essas limitações e problemas decorrentes das tecnologias vigentes, o uso do processo ora proposto é promissor tendo em vista que:

- 1) A semente de abacate com ou sem adição de outros compostos nos péletes de alginato é um produto seguro, que contém suas moléculas ativas predominantemente imobilizadas e, portanto, não irão ficar presas às leveduras ou liberadas no meio ambiente, evitando assim impacto ambiental.
- 2) O processo proposto é econômico tendo em vista que o alginato de cálcio é relativamente barato, a semente de abacate ou outras frutas são resíduos, os corantes se utilizados ficam presos na estrutura do pélete, não contaminando o meio ambiente. Além disso, o processo foi testado por 43 vezes sendo reutilizado, o que significa uma grande economia

para o custo de fabricação do etanol.

- 3) O processo proposto é seguro para uso com *S. cerevisiae* tendo em vista que não afetou a viabilidade e o crescimento desta levedura.
- 4) O processo proposto afetou drasticamente o crescimento e viabilidade da principal bactéria da fermentação alcoólica para produção de etanol carburante, o *L. fermentum*.
- 5) Testes de sinergia entre o cristal violeta e agentes atualmente empregados para a produção de etanol, tais como a monensina e o dióxido de cloro, mostraram sinergia com o corante usado de forma, livre, dispersa em solução, reduzindo a necessidade dos outros produtos, o que o torna compatível para um multiuso no processo (Tabelas 1 a 3 e Figuras 1 a 11).
- 6) Neste trabalho, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *L. fermentum* foi utilizada para alguns antimicrobianos em condições de cultivo puro. No entanto, testes em cultivo misto, ou seja, bactérias e leveduras, também foram executados com sucesso com o uso da tecnologia de imobilização de semente de abacate.
- 7) Os testes de CMI in vitro em meio MRS foram determinados com as moléculas alvo puras ou combinadas com os corantes propostos nesta invenção, dissolvidos neste meio. A CMI é de 0,9 mg L⁻¹ para a Monensina Sódica (MS) pura e dispersa (Figura 2), dosagem essa capaz de inibir completamente a bactéria *L. fermentum*. Atualmente a concentração utilizada nas destilarias representa 3-4 mg L⁻¹.
- 8) O Dióxido de Cloro (DC) tem a CMI de 250 mg L⁻¹ para o produto comercial A (DCA) (Figura 3) e 150 mg L⁻¹ para o produto comercial B (DCB) (Figura 4), ambos dosados de forma pura, dissolvidos no meio, sem mistura com outros agentes.
- 9) Dentre os corantes testados de forma pura, dissolvidos no meio, a CMI da Violeta genciana (VG) é de 35 mg L⁻¹ (Figura 1) e o Azul de Metileno (AM) (Figura 1) inibe a bactéria com 65 mg L⁻¹.
- 10) O antibiótico Monensina Sódica (MS) e o biocida Dióxido de Cloro (DC) podem ter suas concentrações de uso reduzidas se usados em combinação com o corante Violeta Genciana (VG) ou Azul de Metileno (AM). Das combinações sinérgicas destaca-se o tratamento 29 (Figura

- 7): VG (20 mg L^{-1}), DCA (75 mg L^{-1}) e MS ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$) que juntos reduziram a CMI deles puros em respectivamente: 50%, 70% e 88,9%.
- 11) Outra combinação interessante é o tratamento 59 (Figura 10) do corante azul de metileno (5 mg L^{-1}) e o DCA (125 mg L^{-1}), com redução em relação aos produtos puros de respectivamente 92,5% e 50%.
 - 12) Outra possibilidade é o tratamento 74 (Figura 11) que combina AM (5 mg L^{-1}), DCA (125 mg L^{-1}) e MS ($0,30 \text{ mg L}^{-1}$) com redução de, respectivamente 92,3%, 50% e 66,7%.
 - 13) Os dois corantes violeta genciana e azul de metileno não demonstraram sinergismo quando atuaram juntos.
 - 14) Considerando a menor toxicidade dos corantes em relação ao dióxido de cloro para *S. cerevisiae*, ou o menor uso de monensina em combinação com corantes, portanto menor efeito residual de antibióticos, esses resultados podem ser considerados como uma alternativa para o controle bacteriano na fermentação de etanol combustível com estratégia de diferentes mecanismos de ação atuando juntos no controle do crescimento de *L. fermentum*.
 - 15) Testes realizados com diferentes combinações de agentes químicos que fazem a formação do gel de alginato e semente de abacate em pó (Al/Av), e o aprisionamento das moléculas antimicrobianas ativas na estrutura do gel, estão descritos em 4 Fases subsequentes na Tabela 4.
 - 16) As diferentes operações de tratamento químico dos péletes com semente de abacate em pó e adsorção com Violeta Genciana, além dos testes de ação antibacteriana estão descritos nas Tabelas 5 e 6.
 - 17) O teste de avaliação de adsorção dos corantes (Tabela 7), Violeta Genciana e Azul de Metileno, na estrutura do gel de 4% de semente de abacate em pó, revelou que apenas a violeta genciana adsorveu e reteve 100% o corante nas Fases 1, 2, 3 e 4.
 - 18) Na Figura 12 estão os testes antibacterianos de cultura pura de *L. fermentum* (inóculo de 0,5 mL) em 5 mL de meio MRS, usando 5 g de péletes de alginato (equivalente a 75 unidades) com 4% de semente de abacate moída, adsorvida de violeta genciana ou azul de metileno, com pH 6,0 a 37 °C por 48 h. Estes testes revelaram que as Fases 1, 3 e 4 inibiram completamente o crescimento bacteriano. Já a Fase 2 não inibiu

o crescimento com violeta genciana. Aqui o fato relevante é a Violeta Genciana inibir a bactéria apenas com a Fase 1 (formação do gel de 2,5% de alginato e 4% de semente de abacate na presença de 2% de glutaraldeído) e não soltar o corante no meio MRS, diferentemente do corante Azul de Metileno que se desprende dos péletes e coloriu o meio.

- 19) Os testes de contato de 5 mL da suspensão de células contendo uma razão de biomassa úmida de 6,65 g da bactéria *L. fermentum* e 100 g de *S. cerevisiae* (Tabela 8) em contato com 5 g de péletes de alginato com 4% de semente de abacate moída, tratada apenas na Fase 1, adsorvida de violeta genciana ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), em pHs 5,0, 5,5 e 6,0, por até 6 horas revelaram que os péletes não inibiram a levedura, tendo em vista que houve apenas uma pequena queda da viabilidade inicial de 97,5% para 80-89% com pHs 5,5 e 6,0 e 63,4% para o pH 5,0.
- 20) A Tabela 9 mostra a porcentagem de redução das unidades formadoras de colônias de bactérias *L. fermentum*, através da técnica de plaqueamento, com amostras de até 6 horas de contato, no teste com 5 mL da suspensão de células de bactérias e leveduras em contato com 5 g de péletes de alginato com 4% de semente de abacate moída, adsorvida de violeta genciana na fase 1 do tratamento dos péletes, em pHs 5,0, 5,5 e 6,0. No intervalo de 3 a 6 horas houve redução do número de bactérias de 99,9% nos diferentes pHs demonstrando a eficiência da técnica para a limpeza do fermento *S. cerevisiae* do contato com bactérias lácticas.

Tabela 1. Concentrações variáveis de agentes antimicrobianos em base pura, para determinação da Concentração Mínima Inibitória contra *L. fermentum* a

partir de violeta genciana, azul de metileno, monensina sódica, dióxido de cloro da marca A.

Tratamento	Violeta genciana (mg L ⁻¹)	Azul de metileno (mg L ⁻¹)	Monensina Sódica (mg L ⁻¹)	Dióxido de cloro marca A (DCA) (mg L ⁻¹)
1	3	-	0,4	-
2	5	-	0,5	-
3	8	-	0,6	-
4	10	-	0,7	-
5	13	-	0,8	-
6	15	-	0,9	-
7	18	-	0,9	-
8	20	-	0,9	-
9	10	-	-	230
10	15	-	-	230
11	30	-	-	230
12	25	-	-	230
13	30	-	-	230
14	35	-	-	230
15	40	-	-	230
16	45	-	-	230
17	50	-	-	230
18	55	-	-	230
19	60	-	-	230
20	20	-	0,35	100
21	12.5	-	0,1	100
22	5	-	0,35	100
23	12.5	-	0,35	100
24	12.5	-	0,35	75
25	12.5	-	0,6	100
26	5	-	0,1	125
27	20	-	0,1	125
28	20	-	0,6	125
29	20	-	0,1	75
30	20	-	0,6	75
31	5	-	0,6	75
32	12.5	-	0,35	125
33	5	-	0,1	75
34	5	-	0,6	125

Tabela 2. Concentrações variáveis de agentes antimicrobianos em base pura, para determinação da Concentração Mínima Inibitória contra *L. fermentum* a

partir de violeta genciana, azul de metileno, monensina sódica, dióxido de cloro da marca A.

Tratamento	Violeta genciana (mg L ⁻¹)	Azul de metileno (mg L ⁻¹)	Monensina Sódica (mg L ⁻¹)	Dióxido de cloro marca A (DCA) (mg L ⁻¹)
35	5	60	-	-
36	40	5	-	-
37	23	43	-	-
38	32	8	-	-
39	31	34	-	-
40	20	30	-	-
41	40	60	-	-
42	5	5	-	-
43	-	35	0,024	-
44	-	5,27	0,5	-
45	-	35	0,976	-
46	-	10	0,1	-
47	-	60	0,9	-
48	-	10	0,9	-
49	-	60	0,1	-
50	-	35	0,5	-
51	-	64.73	0,5	-
52	-	70	-	125
53	-	60	-	125
54	-	50	-	125
55	-	40	-	125
56	-	30	-	125
57	-	20	-	125
58	-	10	-	125
59	-	5	-	125
60	-	70	-	230
61	-	60	-	230
62	-	50	-	230
63	-	40	-	230
64	-	30	-	230
65	-	20	-	230
66	-	10	-	230
67	-	5	-	230

Tabela 3. Concentrações variáveis de agentes antimicrobianos em base pura, para determinação da Concentração Mínima Inibitória contra *L. fermentum* a

partir de violeta genciana, azul de metileno, monensina sódica, dióxido de cloro da marca A.

Tratamento	Violeta genciana (mg L ⁻¹)	Azul de metileno (mg L ⁻¹)	Monensina Sódica (mg L ⁻¹)	Dióxido de cloro marca A (DCA) (mg L ⁻¹)
68	-	22,5	0,3	177,5
69	-	22,5	0,5	230
70	-	22,5	0,5	125
71	-	5	0,5	177,5
72	-	40	0,1	177,5
73	-	5	0,3	125
74	-	40	0,5	177,5
75	-	5	0,3	230
76	-	22,5	0,3	177,5
77	-	22,5	0,3	177,5
78	-	40	0,3	125
79	-	22,5	0,1	125
80	-	22,5	0,1	230
81	-	5	0,1	177,5
82	-	40	0,3	230

Tabela 4. Quatro Fases de preparo dos géis de alginato de cálcio com pó de semente de abacate (Al/Av).

Fases	Produtos Químicos	Tempo de reação	Temperatura
F1	0,3 M solução de cloreto de cálcio com 2% glutaraldeído (v v ⁻¹)	2 horas	25 °C
F2	1% polietilenoimina (v v ⁻¹)	2 horas	25 °C
F3	10% dimetilformamida (v v ⁻¹)	30 minutos	60 °C
F4	10% epicloridrina (v v ⁻¹)	12 horas	25 °C

Tabela 5. Condições do tratamento químico para formação dos péletes de Al/Av com adsorção do corante Violeta Genciana e teste antimicrobiano.

Operações	Condições químicas
OP1	Formação dos péletes de Al/Av (1% de pó de sementes de abacate)
OP2	Formação dos péletes de Al/Av (4% de pó de caroço de abacate)
OP3	Modificação química dos péletes de Al/Av em 4 Fases (Tabela 4)
OP4	Adsorção em solução de Violeta Genciana (0,1 mg L ⁻¹) usando NaCl 20% (m v ⁻¹) a 60°C por 1 h
OP5	Adsorção em solução de Violeta Genciana (0,1 mg L ⁻¹) a 60 °C por 1 h
OP6	Adsorção em solução de Violeta Genciana (0,1 mg L ⁻¹) a 60 °C por 1 h e “overnight” a 25 °C
OP7	Somente Fase F1: Solução de CaCl ₂ 0,3 M com 2% (v v ⁻¹) glutaraldeído por 2 h a 25 °C
OP8	Teste antimicrobiano em tubos com 1 g de péletes de Al/Av
OP9	Teste antimicrobiano em tubos com 5 g de péletes de Al/Av

Tabela 6. Protocolos para avaliação da adsorção do corante Violeta Genciana (0,1 mg L⁻¹) nos péletes de Al/Av.

Etapas	Protocolo 1	Protocolo 1.1	Protocolo 2	Protocolo 2.2	Protocolo 3
1 ^a	OP1	OP1	OP1	OP1	OP2
2 ^a	OP3	OP3	OP4	OP4	OP6
3 ^a	OP4	OP5	OP3	OP3	OP7
4 ^a	OP7	OP8	OP8	OP8	OP9

Tabela 7. Resultados da adsorção dos corantes violeta genciana e azul de metileno nos péletes de Al/Av usando solução de corantes a 100 mg L⁻¹.

Corantes	Fase do tratamento dos péletes	% adsorção corante (1% de semente abacate em pó)	% adsorção corante (4% de semente de abacate em pó)
Violeta Genciana	F1	20	100
	F2	15	100
	F3	80	100
	F4	10	100
Azul de Metileno	F1	10	-
	F2	10	-
	F3	10	-
	F4	10	-

Obs. F1: CaCl_2 0.3 M com 2% (v v^{-1}) glutaraldeído; F2: 1% (v v^{-1}) polietilenoimina; F3: 10% (v v^{-1}) dimetilformamida e F4: 10% (v v^{-1}) epicloridrina. Esferas de alginato 2.5% com 1% e 4% de semente de abacate em pó.

Tabela 8. Viabilidade celular de *S. cerevisiae* em testes de cultivo misto (*L. fermentum* e *S. cerevisiae*) na presença de péletes de Al/Av com adsorção de Violeta Genciana em diferentes pHs.

Tempo (horas)	pH	Viabilidade (%)
0	5,0	84
0	5,5	100
0	6,0	95
3	5,0	95,6
3	5,5	85
3	6,0	82
6	5,0	63,4
6	5,5	80
6	6,0	89

Tabela 9. Redução do crescimento de *L. fermentum* por plaqueamento após teste com mistura das culturas (*L. fermentum* e *S. cerevisiae*) e tratamento com

os péletes de Al/Av em diferentes pHs (5, 5,5 e 6,0) e tempos de 3 e 6 horas de exposição.

Tempo (horas)	pH	Testes	Diluições	UFC/mL	% Redução do crescimento
0	5	C+	1,0E+07	1,10E+08	
		VGB	1,0E+03	6,40E+04	94,18
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	5.5	C+	1,0E+07	2,60E+08	
		VGB	1,0E+03	1,03E+06	60,4
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	6	C+	1,0E+07	9,00E+07	
		VGB	1,0E+01	1,36E+02	99,98
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	5	C+	1,0E+07	1,10E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
3	5.5	C+	1,0E+07	2,60E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	6	C+	1,0E+07	9,00E+07	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	5	C+	1,0E+07	1,10E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	5.5	C+	1,0E+07	2,60E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
6	5.5	C+	1,0E+07	2,60E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	6	C+	1,0E+07	9,00E+07	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100
	5	C+	1,0E+07	1,10E+08	
		VGB	1,0E+07	<1,10E+01	100
		AV	1,0E+01	<1,10E+01	100

Obs. (C+) Controle positivo; (VGB) péletes de Al/Av com adsorção de Violeta Genciana; (AV) péletes de Al/Av com 4% de pó de carvão de abacate sem corante.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[51] **Microrganismos e manutenção de cepas para os testes** - A cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* M-26 foi previamente isolada de destilaria de bioetanol, trata-se de organismo não modificado geneticamente e identificado como pertencente à espécie *S. cerevisiae* OLIVA NETO; FERREIRA; YOKOYA, 2004). As leveduras foram armazenadas a 75 °C em Eppendorf em meio YM contendo 2% de sacarose, 0,5% de extrato de levedura, 0,10% de sulfato de amônio, 0,087% de fosfato dipotássico, 0,024% de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,0017% de sulfato de manganês hepta-hidratado, 0,0028% de sulfato de zinco hepta-hidratado para 100 mL de água destilada (com 10% de glicerol) em pH 5. O meio de cultura para propagação da levedura e produção do inóculo foi preparado por (w v-1): sacarose 2%, extrato de levedura 0,5%, sulfato de amônio 0,10% , 0,1140% de fosfato dipotássico 3H₂O, 0,024% de sulfato de magnésio 7H₂O, 0,0012% de sulfato de manganês H₂O, 0,0028% de sulfato de zinco 7H₂O (pH 5) (DORTA et al., 2005). A bactéria láctica *Limosilactobacillus fermentum* CCT 0559 foi obtida pela André Tosello Culture Collection (Campinas, Brasil) e cultivada a pH 6 em meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

[052] Os testes de avaliação das drogas seguiram duas metodologias: a 1ª consiste na determinação da CMI – Concentração Mínima Inibitória do antimicrobiano para avaliar o efeito na bactéria e levedura durante um cultivo. Neste caso, utiliza-se culturas puras (testes axênicos) ou em mistura, mas com padronização do inóculo, e avalia-se o crescimento por turbidez e microscopia.

[053] O segundo teste foi de exposição de uma suspensão de células mista (*S. cerevisiae* e *L. fermentum*) simulando a condição

industrial, com alta concentração de células, e a aplicação dos péletes nesta suspensão celular, por um período de tempo de até 6 horas para verificação da inibição das bactérias e leveduras, em diferentes pHs. Neste caso a avaliação da morte bacteriana foi feita por plaqueamento e da levedura por viabilidade celular – método de coloração com azul de metileno.

[054] **Análise da CMI com agentes dissolvidos no meio cultivado (não imobilizados):** os testes com antimicrobianos não imobilizados foram feitos com violeta de genciana, azul de metileno, monensina sódica e dióxido de cloro de duas marcas distintas (A e B) com os produtos isolados ou em diferentes combinações, a fim de avaliar um possível efeito sinérgico entre eles. Para os testes foi utilizada a técnica do método de caldo de macrodiluição adaptado (JONES et al., 1985). O corante violeta genciana (VG) e corante azul de metileno (AB) por 100 mg L⁻¹, a monensina sódica por até 20 mg L⁻¹ e dióxido de cloro por até 500 mg L⁻¹. Para que quantidades iguais de levedura e bactérias fossem distribuídas em tubos de ensaio, o inóculo foi padronizado de acordo com o padrão de McFarland 0,5 em condições assépticas. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MRS com os agentes antimicrobianos dissolvidos. A CIM foi definida como a concentração mínima de compostos químicos capazes de inibir pelo menos 90% do crescimento microbiano e foi realizada em triplicata.

[055] **Testes de avaliação da ação antimicrobiana para cada fase da imobilização com cultura mista (*L. fermentum* e *S. cerevisiae*)**
– Testes antimicrobianos para cada corante e para cada concentração de grânulos de Al / Av (1 e 4% do pó da semente de abacate), foram realizados testes individuais para avaliar a atividade antibacteriana de cada quatro fases de modificação química do gel.

Primeiros testes: 5 mL de meio MRS foram adicionados a cada tubo de ensaio e 1 g (aproximadamente 15 e 25 grânulos para 1 e 4% de pó de semente de abacate, respectivamente) de grânulos de Al / Av previamente tratados em quatro estágios de modificação química e fixados com 100 mg L⁻¹ de corantes de azul de metileno e violeta de genciana. Os experimentos foram incubados a 37 ° C por 48 horas, realizados em triplicata. Testes posteriores: a mesma metodologia foi aplicada, mas usando 5 g (quase 75 contas) de 4% de pó de semente de abacate em contas de alginato. O crescimento microbiano foi verificado por turbidez do meio a olho nu e leitura em espectrofotômetro (600 nm). Todos os testes foram realizados em triplicata. Teste de inibição bacteriana associando grânulos de alginato e semente de abacate com violeta genciana em uma cultura de mistura com *L. fermentum* e *S. cerevisiae*.

[056] **Procedimentos analíticos - Crescimento e viabilidade de microrganismos:** Após 48 horas de incubação na temperatura ótima o crescimento microbiano foi verificado pela turbidez do meio a olho nu e leitura em espectrofotômetro (600 nm). Além disso, a verificação ao microscópio foi realizada para determinação do crescimento celular e viabilidade por contagem de células vivas / mL de extrato pela adição de 1 mL de cada amostra a 1 mL de solução de corante azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981). Após a homogeneização, as células vivas foram contadas (não coradas) em uma Câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi determinada pela razão de células vivas / células totais por mL de extrato (DORTA et al., 2005). A determinação da quantidade foi encontrada de acordo com as equações:

$$\text{Número de células / mL} = \sum \text{dos quadrantes} \times 5 \times 10^4 \times \text{Fator diluição (1)}$$

Σ dos quadrados = soma do número de células contadas nos cinco quadrantes;
 10^4 = ajuste de volume na câmara de Neubauer;

Viabilidade celular (%) = (número total de células vivas x 100) / (número total de células (vivas + mortas)) (2)

[057] Inibição do crescimento de microorganismos - A eficiência antibacteriana foi calculada usando as seguintes equações:

Porcentagem de inibição = ((Absorbância no tratamento (trat) em 48 h cultivo - Absorbância no trat. em 0h) x 100) / ((Abs no controle em 48 h- Abs no controle T0 h)) (3)

[058] Testes de descontaminação do fermento: avaliação dos péletes com agentes químicos imobilizados em contato com suspensão de levedura (*S. cerevisiae*) e bactéria (*L. fermentum*), com curta duração (até 6 h) e alta concentração celular. Primeiramente, foram realizados ensaios com pré-inóculo de *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido MRS e incubados a 37 e 30 °C, respectivamente, por 48 horas. Após o crescimento, uma mistura de biomassa (bactéria + fermento) foi preparada por diluição em 500 mL de água destilada estéril, onde 0,665 g de bactéria foi equivalente a 10 g de fermento (em base úmida). O pH da suspensão de bactérias e leveduras foi corrigido para pH 5,0, 5,5 e 6,0 com HCl e NaOH 1 M. Para os testes antimicrobianos, em cada tubo de ensaio foram colocados 5 mL da suspensão mista de cada pH juntamente com 5 g de Al / Av contas (pó de semente de abacate 4%) coradas com violeta genciana. Os ensaios foram incubados a 25 ° C por 0,3 e 6 horas e amostras de 1,5 mL foram coletadas para posterior plaqueamento para contagem de colônias bacterianas, contagem microscópica de células / mL e para análise de viabilidade de levedura. Todos os testes foram realizados em triplicata. Após a incubação das

suspensões de células tratadas com as esferas Al / Av com GV, foi feita uma diluição em série usando peptona 0,1% diluída em água. Três diluições de caldo foram selecionadas (10-1, 10-3 e 10-7) como amostras para a técnica de espalhamento em placa. As placas com 30 mL de meio MRS previamente fundido com 0,01% de cetoconazol foram colocadas em temperatura ambiente até a solidificação total e, a seguir, semeadas em triplicata com 0,5 mL de cada concentração de caldo diluído para cada pH. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. O controle positivo (C +) (sem adição de grânulos) e o controle negativo (C-) (com grânulos não tingidos) também foram realizados.

[059] **Preparação dos péletes de alginato com semente de abacate moída:** A seguir, para melhor entendimento e compreensão de como se constitui o pélete de alginato e pó de caroço de **abacate** (Al/Av) com e sem adsorção de corante Violeta Genciana, que aqui se pleiteia, apresenta-se as diferentes etapas que serão descritas pormenorizadamente a seguir:

- a) A presente invenção refere-se ao processo cujo principal objetivo é inibir o crescimento de bactérias lácticas e evitar a contaminação durante o processo de fermentação para produção de etanol carburante, aumentando não só a eficiência etanólica, mas o rendimento da produtividade e evitando os resíduos deixados por antimicrobianos tóxicos quando aplicados de forma livre durante a produção.
- b) O processo se baseia na síntese de esferas de alginato contendo pó de caroço de abacate imobilizado, com ou sem adição de corante Violeta Genciana para o pré-tratamento do fermento utilizado nas bateladas fermentativas, no processo industrial de produção alcóolica. Dessa maneira, é possível reciclar as esferas em novos processos de batelada, tornando o processo menos oneroso e evitando a toxicidade dos agentes no meio ambiente.

[060] Preparo das soluções e processamento do substrato

- c) O processo inclui o preparo da solução de Violeta Genciana de 100 mg L^{-1} (m v^{-1}) em água destilada, homogeneizada mecanicamente por 30 minutos a 25°C .
- d) Uma solução de alginato de sódio 2,5% (m v^{-1}) deve ser preparada em 100 mL de água destilada, com agitação mecânica a 60°C .
- e) A solução de CaCl_2 0,3 M deve ser preparada com adição de 2% de glutaraldeído (v v^{-1}).
- f) Para obtenção do pó de caroço de abacate (*Persea americana*) inicialmente é feita a separação da polpa, lavagem do caroço, fragmentação em pedaços pequenos e secagem em estufa a 50°C , por 24 horas. Após essas etapas, o caroço fragmentado e seco é triturado em liquidificador por 10 minutos e macerado em cadinho de porcelana até a formação de um pó com malha de 35 mm. O pó é estocado em um frasco esterilizado, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

[062] Etapas do processo de imobilização

- g) Sequencialmente ao preparo da solução de alginato de sódio, é feita a adição de 4% (m v^{-1}) de pó de caroço de abacate e agitado por pelo menos 30 minutos. Em seguida, a solução contendo alginato e pó de caroço de abacate deve ser lentamente gotejada na solução de cloreto de cálcio e glutaraldeído para a polimerização por interação eletrostática instantânea das esferas. Manter as esferas na solução por duas horas a 25°C , sob agitação branda. Após esse período os péletes estão prontos para aplicação com ação antibacteriana. Alternativamente o caroço de abacate pode ser diretamente utilizado através de um filtro que faça a retenção do mesmo sem a necessidade de imobilizá-lo em alginato ou outro polímero gelificante ou sólido ou deixando ele livre na solução. Mas nessa invenção preferimos realizar a imobilização do caroço de abacate para facilitar a parte operacional via reutilização dos péletes.
- h) Alternativamente, para adsorção de corante Violeta Genciana, acrescentar 0,001 g a 100 gramas, preferencialmente 1 a 5 gramas das esferas já polimerizadas em 100 mL de solução de corante e manter em agitação branda a 60°C por 1 hora. Em seguida, manter a solução em repouso por 0,1 minuto até muitos meses, preferencialmente por 12 a 24

horas. Após esse período, colocar em solução de cloreto de cálcio com adição de glutaraldeído por 0 a muitos meses, preferencialmente por 2 horas, a 25 °C sob agitação branda. Após essa etapa de adsorção, os péletes podem ser utilizados como agentes antibacterianos.

[063] Reciclo dos péletes de Alginato-Abacate (Al/Av)

- i) Posteriormente à adição dos péletes no primeiro ciclo fermentativo ou de contato com suspensão de células, utilizando-os como pré-tratamento do fermento antes da batelada ou colocando diretamente os péletes nas dornas em contato com o fermento, fazer a separação da suspensão celular e lavar os péletes em água destilada. Então, colocar em solução de 0,001 a 0,9 M, preferencialmente 0,3 M de cloreto de cálcio com 0,001% a 50%, preferencialmente 2% de glutaraldeído por minutos ou meses, preferencialmente por 2 horas, a 0 a 60°C preferencialmente 25 a 35 °C com agitação branda de zero a 100 rpm, preferencialmente 30 rpm. Após essas etapas, já podem ser novamente utilizados em ciclos subsequentes.
- j) O tempo de reação de contato entre os péletes e a suspensão de células para determinação da CMI é de 12 a 96 horas, mas usualmente com 24 a 48 h já é feita a determinação. Já para os testes de avaliação da cultura mista com alto teor de células simulando uma situação industrial, o tempo pode ser o mesmo, mas preferencialmente de 3 a 6 horas, realizando a inibição do crescimento bacteriano (morte seletiva das bactérias) em culturas mistas de leveduras e bactérias, praticamente sem afetar a levedura.

[064] Utilização dos péletes para inibição bacteriana

- k) Para assepsia das esferas de Al/Av contendo ou não o corante Violeta Genciana ou outro corante, opcionalmente, pode ser feita a exposição dos péletes à luz ultravioleta por 20 minutos antes da utilização. Esta operação não é fundamental ao processo, mas pode ser feita de forma adicional e esporádica, entre os ciclos fermentativos, para o reuso das esferas.
- l) Em seguida, acrescenta-se 5 g (75 unidades) de péletes de Al/Av com corante adsorvido ou não, para cada 5 mL de suspensão de células de *L. fermentum* e *S. cerevisiae*. O tempo de contato é de 0 a 6 horas podendo estender sem prejuízo à levedura. O processo não precisa ser asséptico

e é possível incubar a temperaturas variadas, de preferência entre 15 a 45°C, mais preferencialmente à temperatura ambiente. Alternativamente o uso dos péletes pode ser feito diretamente nas dornas durante o processo de fermentação alcoólica, mas preferencialmente, os péletes devem ser aplicados quando a suspensão de leveduras foi centrifugada e encontra-se no “pé-de-cuba”, onde recebe água, ácido sulfúrico e ar. No caso, o pH ideal é de 5,0 a 6,0, mas outros pHs, inferiores ou superiores a essa faixa podem ser utilizados.

[065] **Referências Bibliográficas**

- [063] AMADO, D.A.V., HELMANN, G.A.B., DETONI, A.M., DE CARVALHO, S.L.C., DE AGUIAR, C.M. , MARTIN , C.A., TIUMAN, T.S., COTTICA , S.M. Antioxidant and antibacterial activity and preliminary toxicity analysis of four varieties of avocado (*Persea americana* Mill.). *Braz. J. Food Technol.* 22, 2019. <https://www.scielo.br/j/bjft/a/D5ZXYLRqrY5K6RX6G8mj8sw/?lang=en>
- [067] AHMED, N. et al. Analytical Method To Detect and Quantify Avocatin B in Hass Avocado Seed and Pulp Matter. *Journal of natural products*, v. 81, n. 4, p. 818–824, abr. 2018.
- [068] AMORIM, H. V et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- [069] BASSO, T. O. et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metabolic Engineering*, v. 13, n. 6, p. 694–703, 1 nov. 2011.
- [070] 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, 1 jun. 2017.

- [071] 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.
- [072] CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB*, v. 2, n. 1, p. 27–37, 2011.
- [073] COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 77–85, 2018.
- [074] DA SILVA-NETO, J. M. et al. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 37, n. 2, p. 323–332, 2020.
- [075] DABAS, D. et al. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current pharmaceutical design*, v. 19, n. 34, p. 6133–6140, 2013.
- [076] DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1 abr. 1960.
- [077] DELLIAS, M. DE T. F. et al. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of *lactobacilli* contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 111, n. 9, p. 1631–1644, 2018.
- [078] DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22,

n. 2, p. 177, 2005.

[079] DRAGAN, J.; MICHALAK, S. S. Gentian violet: What we know and what is ahead of Us. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 76, n. 3, p. 389–396, 2019.

[080] DUARTE, P. F. et al. Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciência Rural*, v. 46, n. 4, p. 747–754, abr. 2016.

[081] EGUCHI, S. Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. *Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*, v. 22, p. 35–39, 2007.

[082] ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. et al. Characterization of adsorbent materials prepared from avocado kernel seeds: Natural, activated and carbonized forms. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 78, p. 185–193, 31 jan. 2007.

[083] FURTADO, M. Ambiente - Beraca usa ClO₂ na Fermentação alcoólica. Disponível em: <<https://www.quimica.com.br/ambiente-beraca-usa-clo2-na-fermentacao-alcoolica/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

[084] GARUFI, A. et al. Gentian violet induces wtp53 transactivation in cancer cells. *Int J Oncol*, v. 44, n. 4, p. 1084–1090, 2014.

[085] GONÇALVES, K. DE J.; GRAZIANO, K. U.; KAWAGOE, J. Y. Revisão sistemática sobre antissepsia cirúrgica das mãos com preparação alcoólica em comparação aos produtos tradicionais. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 46, n. 6, p. 1484–1493, dez. 2012.

[086] HARIS, S. et al. Natural antibacterial agents from arid-region pretreated lignocellulosic biomasses and extracts for the control of lactic acid bacteria in yeast fermentation. *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 127, 2018.

[087] IDRIS, S.; NDUKWE, G. I.; GIMBA, C. E. Preliminary

phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea americana* (avocado pear). v. 2, n. 1, p. 173–176, 2009.

[088] JIMENEZ, P. et al. Pulp, Leaf, Peel and Seed of Avocado Fruit: A Review of Bioactive Compounds and Healthy Benefits. *Food Reviews International*, v. 37, n. 6, p. 619–655, 18 ago. 2021.

[089] JONES, R. N. et al. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: LENNETTE, E. H. et al. (Eds.). . *Manual of Clinical Microbiology*. Washington - DC: American Society of Microbiology, 1985. p. 972–977.

[090] KARIKARI, A. B. et al. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Recovered from Faeces and Carcasses of Healthy Livestock. *BioMed research international*, v. 2017, p. 4091856, 2017.

[091] KATE, I.E; LUCKY, O.O. Biochemical evaluation of the tradomedicinal uses of the seeds of *Persea Americana* Mill (Family:Lauraceae) . *W. J. Medical Science* , v. 4, n. 2, 143-146. 2018

[092] KIM, J.-S. et al. Yeast Derived LysA2 Can Control Bacterial Contamination in Ethanol Fermentation. *Viruses* , 2018.

[093] LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários através de dióxido de cloro. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 10, n. 3, p. 200–208, set. 2005.

[094] LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Anais...United States: Univ. of Michigan, ann Arbor*, 1981

[095] LIMA, U. DE A. et al. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 3. ed. São Paulo: Blucher, 2001.

[096] LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 64–76, 2016.

[097] MENECHIN, S. P. et al. Chlorine dioxide against bacteria and

yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 337–343, abr. 2008.

[098] MURPHREE, C. A.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. *Current Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 277–285, 2014.

[099] OLIVA-NETO, P. et al. Contaminação microbiana na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante. In: *Bioenergia: Desenvolvimento, pesquisa e inovação*. [s.l.] Cultura Acadêmica, 2012. p. 407–488.

[100] OLIVA-NETO, P. et al. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation - yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. *Materials and processes for energy: communicating current research and technological development*. Anais...Badajoz: Formatex Spain, 2013

[101] OLIVA NETO, P. DE; FERREIRA, M. A.; YOKOYA, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology*, v. 92, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2004.

[102] OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n. 1, p. 25–31, 1997.

[103] OLMSTEAD, J. Bugs in the system: How de FDA fails to regulate antibiotics in ethanol production. *Institute for Agriculture and Trade Policy*, p. 11, 2012.

[104] Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M. F., Carvalho, A. P., Domingues, V. F., Gomes, A. M., Becker, H., Longhinotti, E., & Delerue-Matos, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172,

462-468. 2015. PMid:25442579.

[105] PERRY, B. N. et al. Pharmacologic Blockade of Angiopoietin-2 Is Efficacious against Model Hemangiomas in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, p. 2316–2322, 2006.

[106] REIS, V. R. et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 23, 16 fev. 2018.

[107] RODRÍGUEZ-CARPENA, J. G.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M. Avocado by-products as inhibitors of color deterioration and lipid and protein oxidation in raw porcine patties subjected to chilled storage. *Meat science*, v. 89, n. 2, p. 166–173, out. 2011.

[108] ROLLER, S. D.; OLIVIERI, V. P.; KAWATA, K. Mode of bacterial inactivation by chlorine dioxide. *Water Research*, v. 14, n. 6, p. 635–641, 1980.

[109] SETYAWAN, H. Y.; SUKARDI, S.; PURIWANGI, C. A. Phytochemicals properties of avocado seed: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 733, n. 1, 2021.

[110] SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. . R. M. The response of brewing yeast to acid washing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 95, n. 5, p. 347–354, 10 set. 1989.

[111] SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 59 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S71-5, set. 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS **caracterizado por:**

a) uma mistura de semente de abacate seca e moída com alginato de sódio, sendo essa mistura peletizada, através de gotejamento em solução de cloreto de cálcio com glutaraldeído, para assim formar os péletes contendo o abacate moído imobilizado a uma matriz gelatinosa sólida arredondada denominada aqui de pélete;

b) os referidos péletes são imersos em solução do corante tal como o violeta genciana (cristal violeta) e, assim, parte desse corante é absorvido pelo pélete ficando este corado e com ação antibacteriana reforçada, sendo usado em contato com a suspensão de leveduras ou caldo fermentado, contendo as bactérias contaminantes, tais como o *Limosilactobacillus fermentum*, dentre outros, que contaminam o processo fermentativo realizado por *Saccharomyces cerevisiae* ou outras linhagens, que após tempo determinado promove substancial queda da população de bactérias contaminantes presentes no processo industrial;

c) após a utilização dos péletes por 0 a 24 horas, preferencialmente 1,5 a 6 horas, o mesmo recebe um novo tratamento com uma solução contendo cloreto de cálcio e glutaraldeído para que seja reposta a quantia de cálcio perdida a cada ciclo de uso, e assim mantenha-se a integridade dos péletes;

d) a confecção dos péletes com alternados banhos com solução cloreto de cálcio ou outras formas de cálcio e, preferencialmente com a presença de glutaraldeído, permite que sejam realizadas 43 reutilizações (ou mais) destes peletes para a descontaminação do fermento, os referidos peletes se mantendo em perfeitas condições com a ação desejada.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** os corantes azul de metileno e/ou cristal violeta solúveis podem também ser usados dissolvidos no meio de fermentação ou na suspensão de leveduras, isolados ou associados entre si e/ou em sinergia com os agentes já utilizados nos processos de produção de etanol, tais como monensina sódica e/ou dióxido de cloro.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pelo fato de que** pode ser aplicado de forma flexível para os diferentes bioprocessos tais como fabricação de etanol carburante, cerveja, vinho, cachaça e outros processos que tenham problemas com bactérias lácticas contaminantes, tratando-se tanto o fermento

através de sua descontaminação pelas bactérias, ou mesmo, o caldo fermentado.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo fato de que** os agentes antimicrobianos não diluídos no meio de fermentação são aplicados de forma imobilizada, presa numa matriz porosa, usado em tempo preferencial de 0 a 3 horas de contato, utilizando-se somente a semente de abacate moída livre ou peletizada em solução de alginato de sódio e glutaraldeído, corada ou não, numa proporção volumétrica de aproximada de 10% a 60% de péletes para o correspondente em suspensão celular, portanto 90 a 40%, preferencialmente na proporção de 50% de volume de péletes para 50% de suspensão de leveduras, permitindo descontaminar o fermento por 43 reutilizações, ou mais, dos mesmos péletes.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo fato de que** o seu uso com leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* é seguro, tendo em vista que a viabilidade e o crescimento desta levedura são mantidos.

6.—Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo fato de** ser possível reutilizar os péletes, que continuam ativos contra o crescimento da bactéria contaminante.

7.—Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pelo fato de que** através dos testes de avaliação de adsorção dos corantes, Violeta Genciana e Azul de Metileno, na estrutura do gel de 4% de semente de abacate em pó, revela que apenas a violeta genciana adsorve e retém 100% o corante nas Fases 1, 2, 3 e 4, portanto sendo a única recomendável para o uso aprisionada no gel de alginato.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado pelo fato de que** através dos testes de antibacterianos de cultura pura de *Limosilactobacillus fermentum* no meio MRS, usando 5 g de péletes de alginato (equivalente a 75 unidades) com 4% de semente de abacate moída adsorvida de violeta genciana, para cada 5 ml de meio contendo a bactéria, em pH 6,0 a 37 °C por 48 horas revela que as Fases 1, 3 e 4 inibem completamente o crescimento bacteriano, o que as tornam aptas para o uso no combate às bactérias.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado pelo fato de que** o uso da Violeta Genciana inibe a bactéria apenas com a Fase 1, (formação do gel de 2,5% de alginato e 4% de semente de abacate na

presença de 2% de glutaraldeído), não sendo necessárias as demais fases, o que demonstra a simplificação e economia desse processo, sendo plenamente possível preparar péletes contendo a semente de abacate com ou sem participação do corante violeta genciana, para descontaminar o fermento *Saccharomyces cerevisiae* de processos industriais, apenas com a Fase 1.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado pelo fato de que** através dos testes de contato de suspensão de células contendo uma mistura de biomassa úmida de *Limosilactobacillus fermentum* e *S. cerevisiae*, em contato com péletes de alginato com 4% de semente de abacate moída, tratada apenas na Fase 1, adsorvida de violeta genciana (0,1 mg L⁻¹), em pHs 5,0, 5,5 e 6,0, por até 6 horas revelam que os péletes mantém a ~~não inibem~~ a levedura *Saccharomyces cerevisiae* viável, tendo em vista que houve apenas uma pequena queda da viabilidade inicial que era de 97,5% e caiu para 80-89% com pHs 5,5 e 6,0 e caiu para 63,4% para o pH 5,0.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado pelo fato de que** a porcentagem de redução das unidades formadoras de colônias de bactérias *Limosilactobacillus fermentum*, através da técnica de plaqueamento, no teste com a suspensão de células de bactérias e leveduras, em contato os péletes de alginato com 4% de semente de abacate moída, adsorvida de violeta genciana na fase 1 do tratamento dos péletes, em pHs 5,0, 5,5 e 6,0, e nos intervalos de 3 a 6 horas, sofre redução do número de bactérias de 99,9 a 100%, nos diferentes pHs, demonstrando a alta eficiência da técnica para a limpeza do fermento *Saccharomyces cerevisiae* do contato com bactérias lácticas.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado pelo fato de que** pode também utilizar os corantes azul de metileno e/ou cristal violeta livres, dissolvidos no meio, aproveitando a sinergia quando misturados com os atuais produtos utilizados no processo, tais como monensina e dióxido de cloro, reduzindo as dosagens deles atualmente utilizadas industrialmente.

13. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 12, **caracterizado pelo fato de que** através dos testes de CMI (Concentração mínima inibitória) com a bactéria *Limosilactobacillus fermentum*, em cultivo “in vitro” com meio MRS é possível uma diminuição da CMI dos antibióticos Monensina Sódica (MS) e o biocida Dióxido de Cloro (DC), se usados em combinação sinérgica com o corante Violeta Genciana (VG) ou Azul de Metileno (AM), demonstrando assim compatibilidade e sinergia entre

esses agentes de uso industrial e os corantes testados.

14. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 13, **caracterizado pelo fato de que** demonstra que a sinergia verificada entre os agentes antibacterianos de uso corrente na prática industrial e os corantes testados devem ter proporções específicas, para que a mistura seja eficiente e produza a sinergia esperada, sendo que, o uso da Monensina Sódica (MS) e do dióxido de cloro (DC) nas seguintes concentrações, ou dosages, com o corante VG (tratamento 29): VG (20 mg L⁻¹), DCA (75 mg L⁻¹) e MS (0,10 mg L⁻¹) resulta numa significativa redução da CMI dos antimicrobianos de forma pura em respectivamente: 50%, 70% e 88,9%.

15. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 14, **caracterizado pelo fato de que** no tratamento 59, onde há uma combinação específica de dosagens do corante azul de metileno (5 mg L⁻¹) e o DCA (125 mg L⁻¹), a qual permite uma redução significativa em relação aos produtos puros de respectivamente 92,5% e 50%.

16. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 15, **caracterizado pelo fato de que** o tratamento 74, onde há uma combinação de dosagens de AM (5 mg L⁻¹), DCA (125 mg L⁻¹) e MS (0,30 mg L⁻¹), resulta numa redução significativa de, respectivamente, 92,3%, 50% e 66,7%, em relação aos agentes puros.

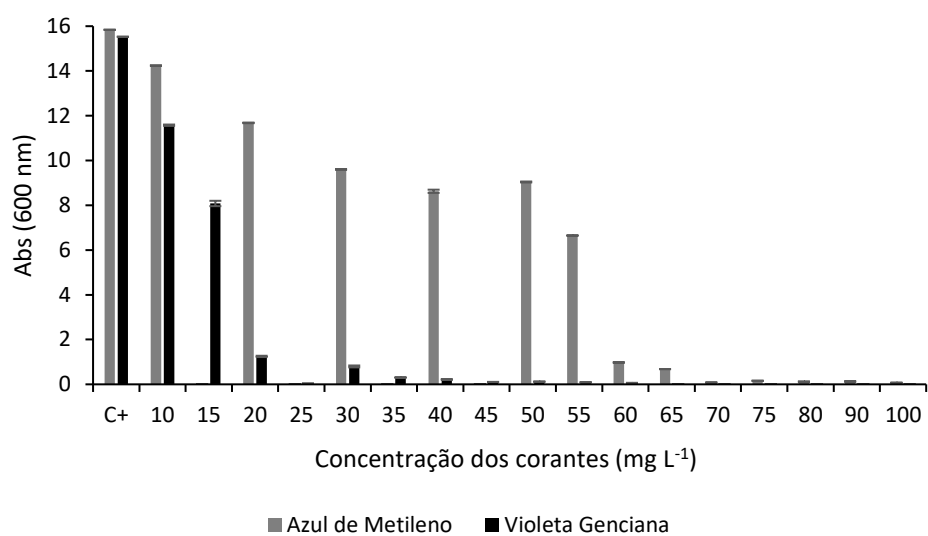


FIGURA 1

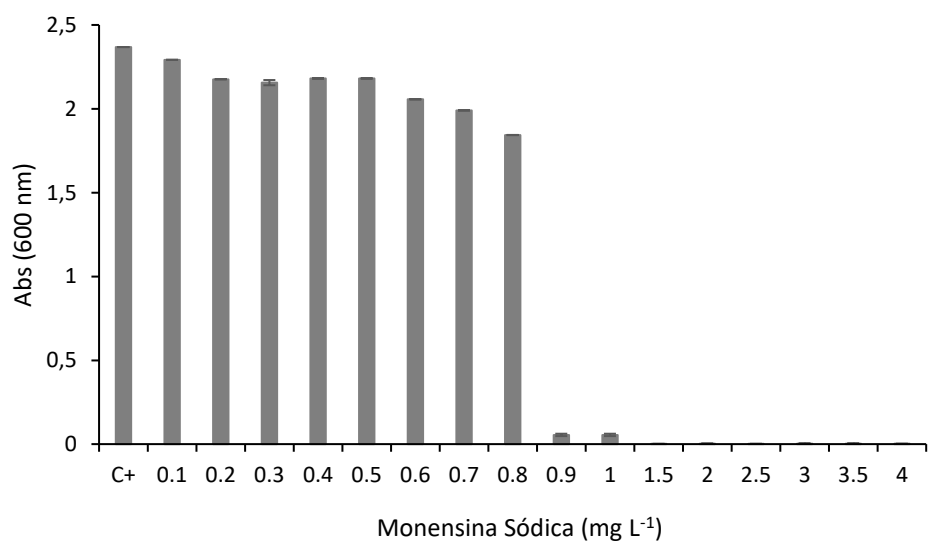


FIGURA 2

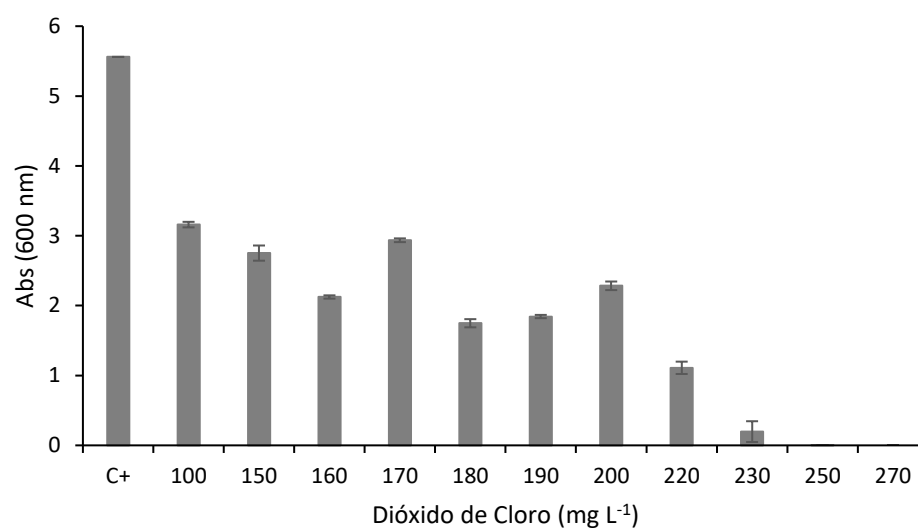


FIGURA 3

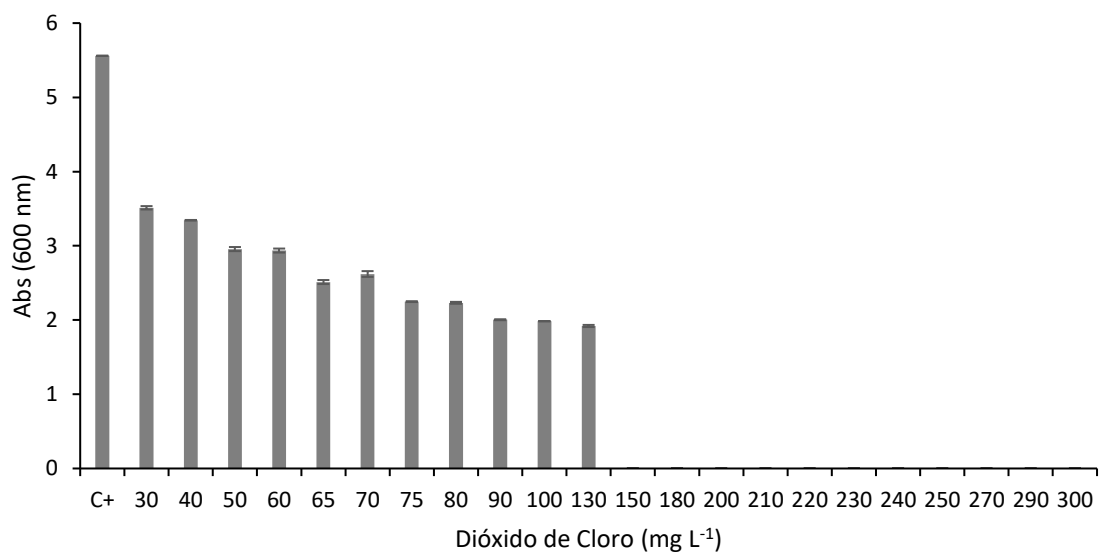


FIGURA 4

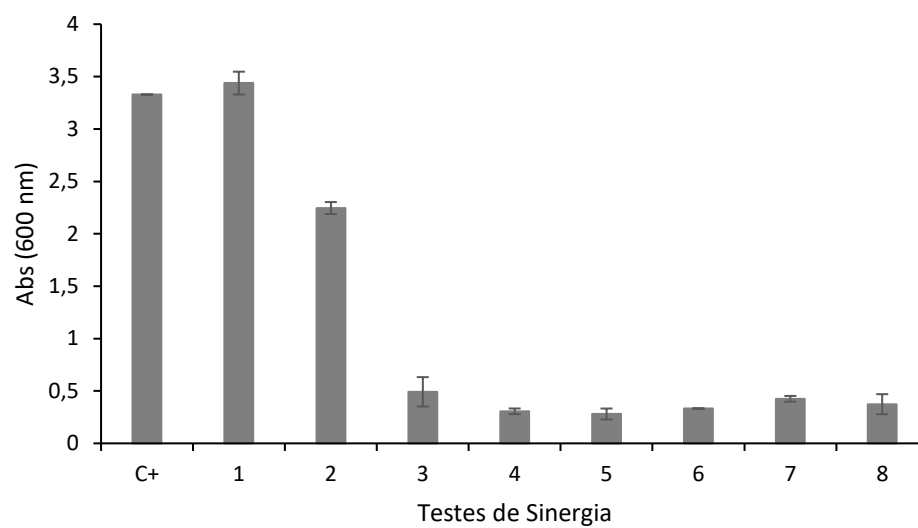


FIGURA 5

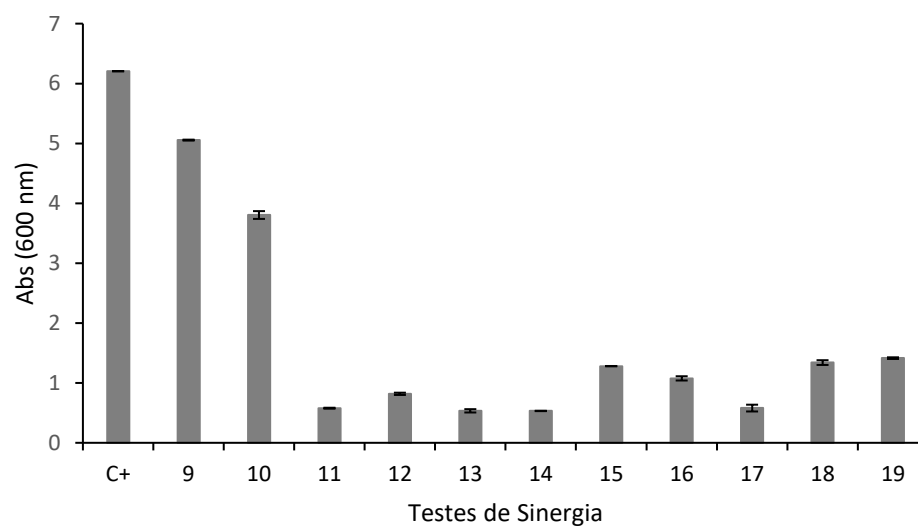


FIGURA 6

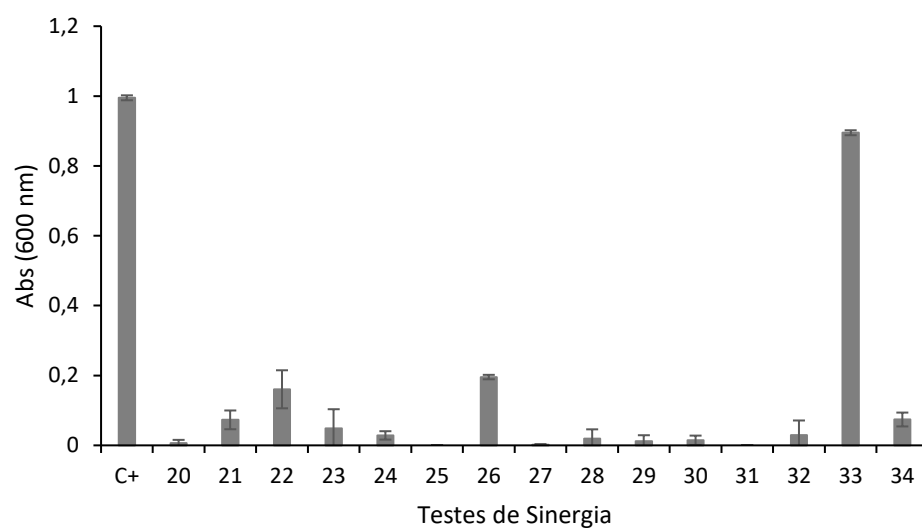


FIGURA 7

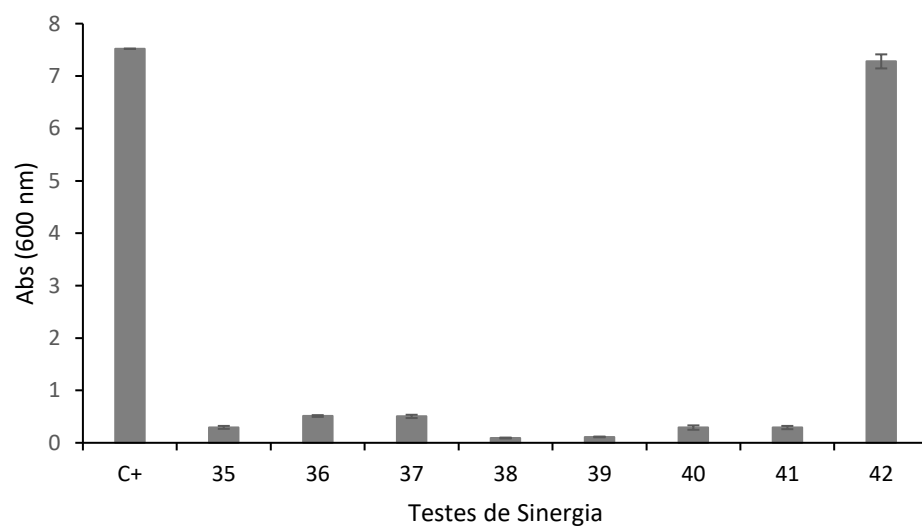


FIGURA 8

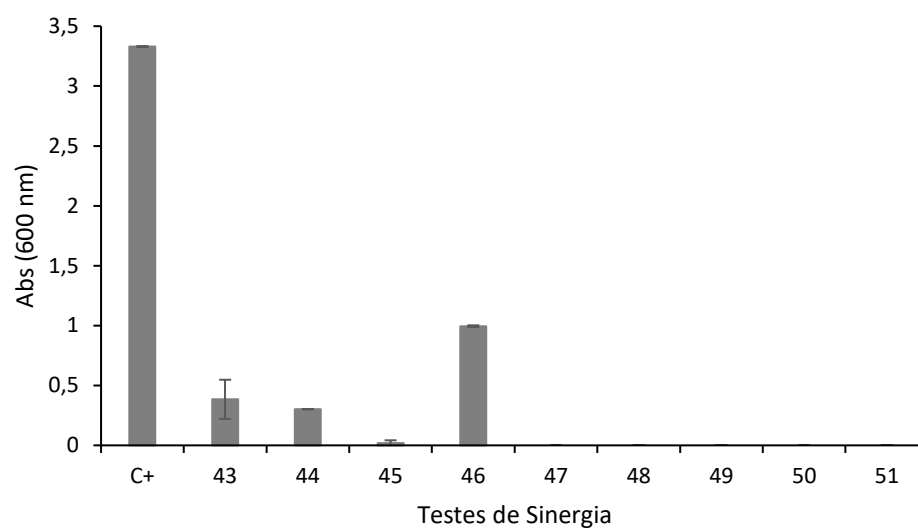


FIGURA 9

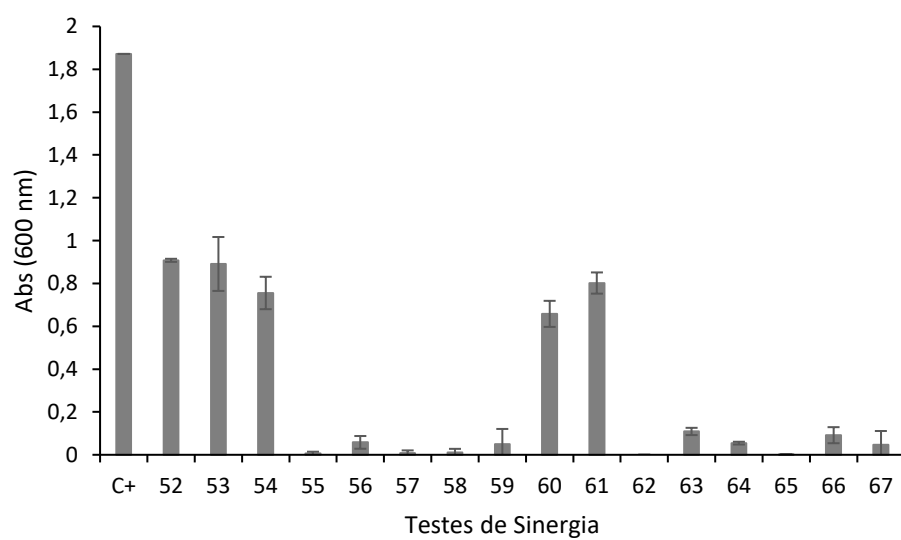


FIGURA 10

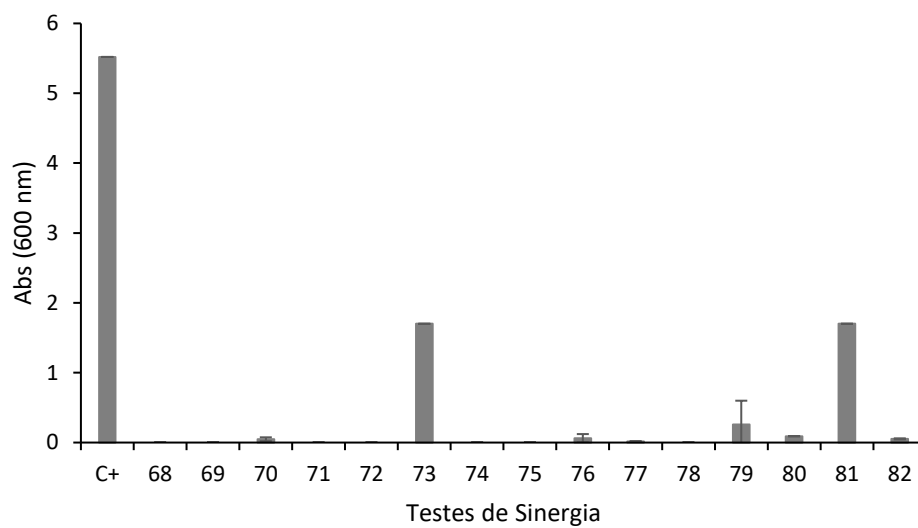
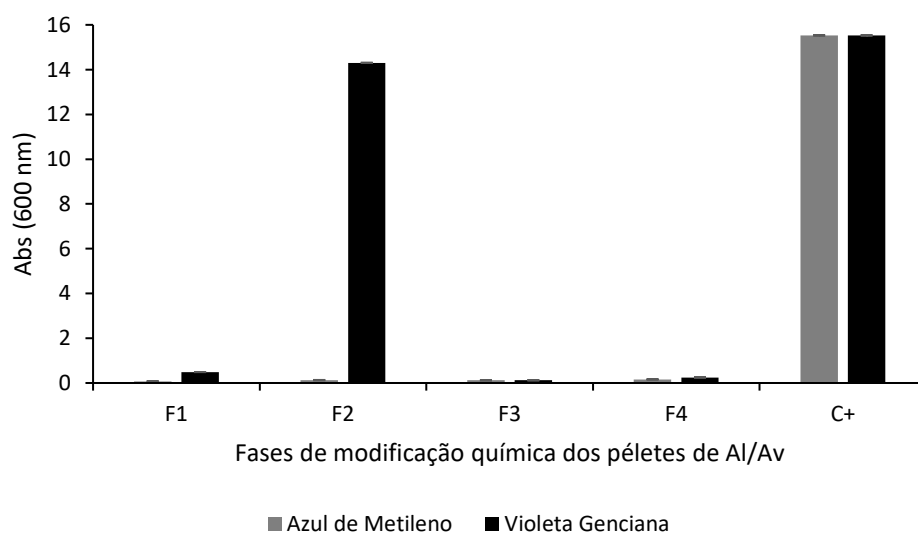


FIGURA 11



Obs. F1: CaCl_2 0.3 M com 2% (v v^{-1}) glutaraldeído; F2: 1% (v v^{-1}) polietilenoimina; F3: 10% (v v^{-1}) dimetilformamida e F4: 10% (v v^{-1}) epícloridrina.

FIGURA 12

RESUMO

**“PROCESSO DE INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA
FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS POR COMPOSTOS INOVADORES
IMOBILIZADOS OU DILUIDOS NO MEIO”**

A presente invenção refere-se ao uso de novas moléculas antibacterianas no controle sobretudo de bactérias lácticas contaminantes de processos fermentativos industriais com o uso de leveduras ou outros microrganismos que sejam resistentes às moléculas antimicrobianas propostas. Dentre as vantagens do uso dessas moléculas livres ou imobilizadas estão: a) os corantes violeta genciana e o azul de metileno, quando combinados com monensina ou dióxido de cloro podem reduzir substancialmente o uso dessas duas moléculas com vantagens para o processo; b) a semente de abacate moída é um excelente agente antibacteriano e quando combinada através do processo proposto com alginato de cálcio ou outros agentes gelificantes, pode inibir completamente o crescimento de *Limosilactobacillus fermentum* (antigo *Lactobacillus fermentum*) sendo essa a principal espécie contaminante da fermentação alcoólica industrial para produção de etanol carburante. No processo proposto pode-se ainda adsorver o corante violeta genciana ao gel de alginato de cálcio, com ligações de cross-linking com glutaraldeído na estrutura da semente de abacate moída e assim formar um pélete capaz de ser reutilizado para o controle do crescimento de *L. fermentum* por 43 ciclos consecutivos, sempre inibindo completamente o contaminante mesmo na presença da levedura *S. cerevisiae*, sem inibir essa última, provando assim a sua eficácia na descontaminação de fermentos utilizados em processos fermentativos industriais.