

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 22/02/2023.

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

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

ANDREI MOCHEUTI KRONKA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

ARARAQUARA - SP

2021

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

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

ANDREI MOCHEUTI KRONKA

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

ARARAQUARA - SP

2021

- 
- K93e** Kronka, Andrei Mocheuti.  
Estudo de antimicrobianos naturais sobre Bactérias Gram + (*Lactobacillus*) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica / Andrei Mocheuti Kronka. – Araraquara: [S.n.], 2021.  
53 f. : il.
- Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.
- Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.  
Coorientador: Álvaro Baptista Neto.
1. Antimicrobianos naturais. 2. Fermentação Alcoólica. 3. Bactérias Gram +. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Baptista Neto, Álvaro, coorient. III. Título.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Araraquara**



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

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

**AUTOR:** ANDREI MOCHEUTI KRONKA

**ORIENTADORA:** ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

**COORIENTADOR:** ALVARO DE BAPTISTA NETO

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

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

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

Araraquara, 22 de fevereiro de 2021

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

Marie Curie.

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Dados e expectativas da produção de etanol no Brasil ..... | 15 |
|-----------------------------------------------------------------------|----|

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - As perdas de açúcares no processo de produção do etanol ..... | 17 |
|--------------------------------------------------------------------------|----|

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

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

ART: açúcares reductores totais

## Sumário

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                  | 14 |
| 2. CONCLUSÃO .....                  | 18 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 19 |

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: CONAB,  
2019.

Nota: Estimativa  
em  
dezembro/2019

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

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

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

Na fermentação alcoólica é onde ocorre o maior percentual de perdas de açúcares do processo de produção do etanol, conforme mostra a Figura 1. Além das perdas devido à qualidade da matéria prima, ocorre a presença de bactérias contaminantes, que produzem fermentações indesejáveis, resultando em produtos prejudiciais a fermentação normal. Essas bactérias contaminantes, também fermentam os açúcares e produzem ácidos orgânicos (lático, acético entre outros), que reduzem o rendimento fermentativo da levedura e modificam, tanto a morfologia das leveduras, quanto as características do vinho (líquido após a fermentação, contendo até 12% de etanol, segundo Gay-Lussac), diminuindo o teor alcoólico. Quanto maior a concentração dessas substâncias no vinho, mais rigorosa deverá ser a destilação (separação do etanol do vinho). Considerando que o etanol deve atender especificações quanto aos teores máximos de componentes, estas operações de purificação do destilado sempre têm perdas que resultam em reduções das eficiências do processo (CHERUBIN, 2003).

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



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

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

## 2. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugar cane must. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.677-681, Oct./Dec. 2003.
- ALWAN, W.S.; KARPOORMATH, R.; PALKAR, M.B.; PATEL, H.M.; RANE, R.A.; SHAIKH, M.S.; KAJEE, A.; MLISANA, K.P. Novelimidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 514-25, May 2015. ISSN 1768-3254.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de Análises e Monitoramento Microbiológico em Laboratório de Destilaria**. Araras: UFSCAR, Universidade de São Carlos, 2004.
- ARAUJO, L.F.; JUNQUEIRA, O.M.; LOPES, E.L.; ARAUJO, C.S.S.; ORTOLAN, J.H.; LAURENTIZ A.C. Utilização da levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1576-1581, 2006.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M. L. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BEGUM, N.A.; ROY, N; LASKAR, R.A.; ROY, K. Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure-activity relationship analysis. **Medicinal Chemistry Research**. v. 20, p. 184-191, 2011.
- BONATELLI, M.L.; IENCZAK, J.L.; LABATE, C. A. Sugarcane must fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: impact of sterilized and non-sterilized sugarcane must. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 1177–1187, 2019.
- BORIA, I.; BOATTI, L.; PESOLE, G.; MIGNONE, F.; NGS-Trex. Next Generation Sequencing transcriptome Profile Explorer, **BMC Bioinformatics**, v.14, p.1-8, 2013.
- BREGAGNOLI, F.C.R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

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

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

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

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. (Rede e-Tec Brasil).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KRONKA, E. A. M.; PAIM, A. P. S.; REIS, B. F.; COSTA LIMA, J. L.; LAPA, R. A. Determination of glucose in soft drink and sugar cane juice employing a

multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 364, p. 358-361, 1999.

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

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

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

LIMAYEM A.; HANNING I.B.; MUTHAIYAN A.; ILLEGHEMS K.; KIM J-L.; CRANDALL P.G.; O'BRYAN C.; RICKE, S.C. Alternative antimicrobial compounds to control potential *Lactobacillus* contamination in bioethanol fermentations. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 46, n. 8, p. 709–714, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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