

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**Prospecção de extratos vegetais para o controle da contaminação bacteriana
em dornas de fermentação de usinas de açúcar e álcool**

VANESSA CORREIA MOTA

**Dourados - MS
2021**

VANESSA CORREIA MOTA

Prospecção de extratos vegetais para o controle da contaminação bacteriana em dornas de fermentação de usinas de açúcar e álcool

Área do CNPq:

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Área de concentração:

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fossa Paz

Coorientadores:

Prof^a. Dr^a. Margareth Batistote

Prof. Dr. Marcos Vinicius Bohrer Monteiro Siqueira

Dourados - MS
2021

Ficha Catalográfica – Elemento obrigatório*

*Elaborado pela Biblioteca

Esta ficha deve ser impressa no verso da folha de rosto (essa é depois da banca final)

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer _____, para a dissertação intitulada: **“Prospecção de extratos vegetais para o controle da contaminação bacteriana em dornas de fermentação de usinas de açúcar e álcool”**, de autoria de **VANESSA CORREIA MOTA**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Alessandro Minilo
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de agosto de 2021.

DEDICATÓRIA(S)

Este trabalho é dedicado especialmente a minha família que me apoiou em todos os momentos difíceis e nas minhas dificuldades estiveram a meu lado acreditando que eu era capaz.

Aos meus orientadores e companheiros de jornada, e a todas pessoas que direta ou indiretamente tem me ajudado.

A educação sempre teve papel importante na minha vida. Desde pequena ouvia que só através dela eu seria capaz de alcançar meus maiores sonhos e objetivos. Hoje, realizo um deles.

Dedico esse mestrado a todos que acreditaram em mim e acreditam que só a educação é o caminho. Escolhi entrar nesse desafio foi para propagar a ideia e os valores que só a educação é capaz de transformar. Não poderia ser mais grata a algo que modificou minha vida para melhor. Essa dissertação de mestrado é a prova de que nenhum sonho é inalcançável e de que só a educação cria pontes indestrutíveis.

AGRADECIMENTO(S)

À Deus....

Aos meus pais.....

EPÍGRAFE

Se quiseres conhecer uma pessoa,
não lhe pergunte o que pensa,
mas sim o que ama.

(SANTO AGOSTINHO)

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos frente a amostras de diferentes extratos vegetais35

Tabela 2 – Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos frente a amostras de extrato vegetal de *M. koenigii* em diferentes concentrações40

Tabela 3 – Ação de inibição do crescimento bacteriano pelo método de disco de difusão utilizando extrato de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações41

Lista de Figuras

Figura 1 – Panorama da produção brasileira de etanol nas safras de 2016/2017 a 2019/2020.....	12
Figura 2 – Exportação de etanol brasileiro.	13
Figura 3 – Evolução da área plantada (A) e da produtividade de cana-de-açúcar (B) no período de 2015 a 2019 no Brasil.	14
Figura 4 – Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação.	16
Figura 5 – Esquema do processo de fermentação contínua.....	17
Figura 6 – <i>Annona coriácea</i> (marolo)	22
Figura 7 – <i>Baccharis dracunculifolia</i>	23
Figura 8 – <i>Mangifera indica</i>	24
Figura 9 – <i>Murraya koenigii</i>	25
Figura 10 – Etapas de desenvolvimento do preparo dos extratos	29
Figura 11 – Preparo dos extratos: folhas higienizadas (A), folhas cortadas (B), embebidas em água fria (C) e em água quente (D)	29
Figura 12 – Extratos após processo de liofilização	29
Figura 13 – Espectros de absorção molecular entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm, <i>M. koenigii</i> (A) e <i>B. dracunculifolia</i> (B).....	38
Figura 14 – Teste de sensibilidade com disco de difusão com as leveduras Cat-1 (A) e Pe-2 (B) expostas ao extrato aquoso de <i>M. koenigii</i>	39
Figura 15 – Teste de sensibilidade com disco de difusão com as leveduras Cat-1 (A) e Pe-2 (B) expostas ao extrato aquoso de <i>B. dracunculifolia</i>	40
Figura 16 – Análise do crescimento celular das leveduras Pe-2 (A) e Cat-1 (B), em meio fermentativo com adição de diferentes concentrações de extrato de <i>M. koenigii</i>	42
Figura 17 – Avaliação do crescimento das leveduras Pe-2 (A) e Cat-1 (B), em meio fermentativo com adição de diferentes concentrações de extrato de <i>B. dracunculifolia</i>	43

RESUMO

O processo de fermentação etanólico é propenso a contaminações. O caldo ou mosto não passa por esterilização e podem ser encontradas uma variedade de microrganismos contaminantes necessitando da utilização de antibióticos e antissépticos químicos para fazer o controle. Todavia, o uso contínuo e doses elevadas destes produtos acarretam tanto problemas econômicos quanto ambientais. Assim, este estudo busca uma alternativa viável para o controle de contaminação das usinas utilizando as folhas como extratos vegetais. Inicialmente foram utilizados os extratos das folhas das plantas *Murraya koenigii*, *Mangifera indica*, *Baccharis dracunculifolia* e *Annona coriacea*, preparados por extração a frio e a quente. Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus* sp e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Catanduva-1 e Pedra-2. A avaliação de sensibilidade foi feita em placas de Petri com as bactérias inoculadas no meio ágar Mueller-Hinton e YPD 2% para leveduras, sendo dispostos discos de papel filtro impregnados com os extratos nas concentrações de (0,10; 0,25 e 0,50 mg x mL⁻¹) para ambos os tratamentos e mantidas em incubação a 37°C para as bactérias e 30°C para as leveduras. Foi realizada uma avaliação dos espectros de absorção molecular dos extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* em espectrofotômetro (UV-Vis) em comprimentos de onda de 200 a 800 nm. O teste de antibiose foi pelo método de halo de difusão com placas previamente preparadas e discos contendo os extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia*. O crescimento celular das leveduras foi realizado pelo método gota a gota utilizando um meio fermentativo com 50 mL de caldo de cana com concentração de 22° Brix, nos quais foram adicionadas as concentrações dos extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia*, as leveduras e o *Bacillus* sp, de 4 em 4 h foram coletadas alíquotas de 10 µL do fermentado com uma micropipeta e gotejados nas placas de Petri previamente preparadas que foram incubação a 30 °C por 24 h. As leveduras não apresentaram sensibilidade aos extratos. Os extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* apresentaram atividade antibacteriana principalmente nas concentrações mais elevadas e no tratamento com extração a quente. Os resultados sugerem que os extratos vegetais de *Murraya koenigii* e *Baccharis dracunculifolia* podem ser uma alternativa sustentável para ser usado como antibactericida.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Extrato de plantas, *Murraya koenigii*, *Baccharis dracunculifolia*, contaminação de dornas.

ABSTRACT

The ethanolic fermentation process is prone to contamination, since the juice or wort does not undergo sterilization, a variety of contaminating microorganisms are found, requiring the use of antibiotics and chemical antiseptics to make the control. However, the continued use and high doses of these products cause both economic and environmental problems. Thus, this study aims to seek a viable alternative for the control of contamination of plants using plant extracts. Initially, extracts from the plants *Murraya koenigii*, *Mangifera indica*, *Baccharis dracunculifolia* and *Annona coriacea* were used, prepared by cold and hot extraction. *Escherichia coli* bacteria (ATCC 25922) were used; *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus* sp and the commercial yeasts Cat-1 and Pe-2. The sensitivity evaluation was carried out in 20 cm Petri dishes, and the bacteria were inoculated in the Mueller-Hinton agar medium and 2% YPD for yeasts, with filter paper discs impregnated with the extracts in the concentrations of (0.10; 0,25 and 0.50 mg x mL⁻¹) for both treatments and kept in incubation at 37 °C for bacteria and 30 °C for yeasts. An evaluation of the molecular absorption spectra of *M. koenigii* and *B. dracunculifolia* extracts was carried out, both hot and cold, with a spectrophotometer (UV-Vis) and wavelengths from 200 to 800 nm. The antibiosis test was carried out using the diffusion halo method with previously prepared plates and the disks containing the extracts of *M. koenigii* and *B. dracunculifolia* were added. The viability of the yeasts was by the drop-by-drop method using a fermentative medium with 50 mL of sugarcane juice with a concentration of 22 °Brix, in which the concentrations of the extracts of *M. koenigii* and *B. dracunculifolia*, the yeasts and *Bacillus* sp, every 4 h, 10 µL aliquots of the fermented were collected with a micropipette and dripped onto previously prepared Petri dishes which were incubated at 30 °C for 24 h. Yeasts were not sensitive to extracts. The extracts of *M. koenigii* and *B. dracunculifolia* showed antibacterial activity mainly at the highest concentrations and in the treatment with hot extraction. The results suggest that the plant extracts of *Murraya koenigii* and *Baccharis dracunculifolia* may be a sustainable alternative to be used as an antibacterial.

Keywords: Antimicrobial activity, Plant extracts, *Murraya koenigii*, *Baccharis dracunculifolia*, vat contamination.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Produção de etanol no Brasil	12
2.2 Matéria-prima para produção de etanol.....	14
2.3. Processos fermentativos	15
2.3.1 Tipos de processo fermentativo	16
2.3.2 Fatores de atenção na fermentação.....	17
2.4 Métodos de controle bacteriano no processo industrial	20
2.4.1 Métodos de controle utilizados	20
2.4.2 Antissépticos e antibióticos	20
2.5 Plantas que apresentam perfil de moléculas bioativas com potencial para utilização como antibióticos.....	21
2.5.1 <i>Annona coriacea</i>	21
2.5.2 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	22
2.5.3 <i>Mangifera indica</i>	24
2.5.3 <i>Murraya koenigii</i>	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos.....	27
4 MATERIAL e METODOS	28
4.1 Local de desenvolvimento do estudo	28
4.2 Coleta do material biológico	28
4.3 Preparo dos extratos	28
4.3.1 Preparo das diluições dos extratos das plantas.....	30
4.4 Microrganismos utilizados	30
4.4.1 Manutenção dos microrganismos.....	30
4.4.1.1 Ativação das leveduras	30
4.4.1.2 Ativação das bactérias	30
4.5 Preparo dos discos de difusão	31
4.6 Avaliação da sensibilidade dos microrganismos frente aos extratos	31
4.7 Avaliação dos espectros de absorção molecular dos extratos a quente e a frio (UV-Vis) dos extratos de <i>Murraya koenigii</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i>	31
4.8 Teste do halo de inibição frente aos microrganismos	31
4.8.1 Teste do crescimento celular em meio fermentativo com adição dos extratos de <i>Murraya koenigii</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i> e com co-cultura de bactéria	32
4.8.2 Preparo do pré inóculo	32
4.8.2.1 Preparo do meio fermentativo	33

4.8.2.2 Teste de crescimento celular	33
4.9. Análise estatística	33
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	34
5.1 Avaliação do teste do halo de inibição dos extratos vegetais na presença de diferentes microrganismos	34
5.2 Espectros de absorção molecular dos extratos de <i>Murraya koenigii</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i> a quente e a frio (UV-Vis)	36
5.3 Teste do halo de inibição frente a amostras de extratos vegetal de <i>Murraya koenigii</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i> em diferentes microrganismos	38
5.4 Avaliação do crescimento celular de leveduras na presença de bactéria frente aos extratos <i>Murraya koenigii</i> e <i>Baccharis dracunculifolia</i>	42
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol no Brasil tem alguns pontos positivos e fundamentais que são capazes de fazer com que este biocombustível se torne um dos pilares do mercado nacional e internacional de combustíveis renováveis (BESSA, 2013). Dentre os benefícios da utilização deste biocombustível está a capacidade deste produto em reduzir os impactos ambientais como o aquecimento global, uma vez que produz menor quantidade de dióxido de carbono-CO₂ (DELLA-BIANCA *et al.*, 2013), além de promover o sequestro de parte do CO₂ disperso na atmosfera durante o processo de desenvolvimento da sua matéria-prima a cana-de-açúcar (MOITINHO *et al.*, 2013, ALMEIDA *et al.*, 2016).

O Brasil figura como o segundo maior produtor de etanol do mundo tendo como matéria-prima a cana-de-açúcar, uma gramínea C4 que possui alta eficiência de fotossíntese, rica em sacarose, adaptada as regiões tropicais e subtropicais. Esta cultura é responsável também por 70% da produção mundial de açúcar, sendo cultivada em vários países demonstrando assim a sua importância econômica (KNOEMA, 2020). Embora a produção de etanol brasileira se encontre consolidada, ainda necessita de novas tecnologias para garantir a rentabilidade e a eficiência do processo, principalmente em relação a fermentação (SANTOS *et al.*, 2020).

Alguns avanços já foram implementados pelo setor, tais como o desenvolvimento de variedades de cana mais responsivas com maior percentual de sacarose (CARMO JUNIOR *et al.*, 2020), a queima do bagaço para a cogeração de energia que tornou a usina autossuficiente (CANEPPELE *et al.*, 2020) e a seleção de novas linhagens de leveduras com capacidade de tolerar os fatores bióticos e abióticos do meio fermentativo industrial (AMORIM; LOPES, 2013).

O processo fermentativo é um processo biológico que utiliza as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, as quais metabolizam os açúcares presentes no substrato convertendo-os em energia celular e como resíduos são formados o etanol e o CO₂. As leveduras deste gênero são altamente adaptadas aos processos industriais, contudo pode ocorrer alterações na produção dos seus metabólitos dependendo das condições do meio (AMORIM; LOPES, 2013).

Os fatores de estresse mais frequentes são as altas temperaturas, a acidez do meio, a presença de sulfito, a alta concentração de sacarose (pressão osmótica), rápido aumento na concentração de etanol, variações bruscas de temperatura na dorna, baixo pH e a contaminação por bactérias (FERNANDES *et al.*, 2020; NASCIMENTO; FONSECA, 2019). A presença de leveduras selvagens (CECATTO-ANTONINI, 2018) podem causar perdas da produtividade e interferem no metabolismo do fermento, uma vez que substrato é rico em açúcares e nutrientes e, principalmente, as bactérias se proliferam de forma rápida afetando a produção de etanol (AMORIM *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016).

Segundo Amorim *et al.* (2011) uma concentração de 10^8 de bactérias mL⁻¹ pode levar a uma perda em torno de 10.000 - 30.000 L de etanol por dia em uma planta com produção de um milhão de litros diários, sendo requeridos a utilização de antibióticos de amplo espectro de ação, que eleva o custo tanto econômico como ambiental do processo, pois podem estar presentes nos resíduos gerados na fermentação, além do mais o surgimento de cepas resistente vem limitando o seu uso. Outro aspecto importante para o controle do uso de antibióticos está na possibilidade destes compostos ficarem retidos na massa de leveduras que, em algumas unidades industriais, é vendido para compor rações de gado e aves, podendo influenciar no surgimento de patógenos multirresistentes (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Neste sentido, o desenvolvimento de produtos naturais que apresentam características biodegradáveis e eficiência para o controle de microrganismos presentes no processo fermentativo se mostram como uma alternativa viável frente aos antibióticos já utilizados, uma vez que são podem ser produzidos a partir de plantas e resíduos de plantas. Esses produtos possuem atributos que podem auxiliar o setor a minimizar os impactos ambientais e com isso alcançar uma maior eficiência de processo com vistas a sustentabilidade ambiental.

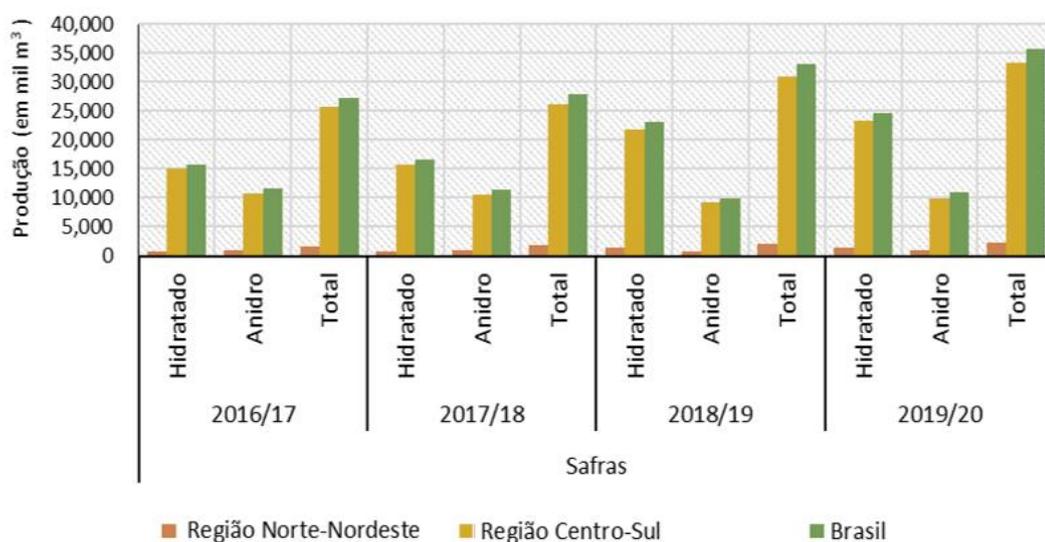
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de etanol no Brasil

O etanol brasileiro se destaca no cenário mundial de biocombustíveis por apresentar impactos ambientais mínimo e possuir tecnologias que garantem a produtividade para o atendimento da demanda (BESSA, 2013). A produção em larga escala deste biocombustível, no Brasil, começou em meados de 1970, em meio as inquietações em relação à economia e a segurança energética deste país (DE SOUZA; DE ANDRADE, 2013). Como motivação estava a alta nos preços do barril de petróleo e sua possível escassez levando o Brasil a investir no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol em grande escala promovendo também o agronegócio.

De acordo com os dados levantados pelo Observatório da Cana (2021), a região Centro-Sul vem se destacando na produção de etanol, visto que na safra nacional de 2016/2017 foram produzidos entre etanol hidratado e anidro um total de 25,66 bilhões de litros e na safra de 2019/2020 atingiu 33,26 bilhões de litros com um crescimento acumulado de 29,6%, como mostra a Figura 1.

Figura 1 – Panorama da produção brasileira de etanol nas safras de 2016/2017 a 2019/2020.



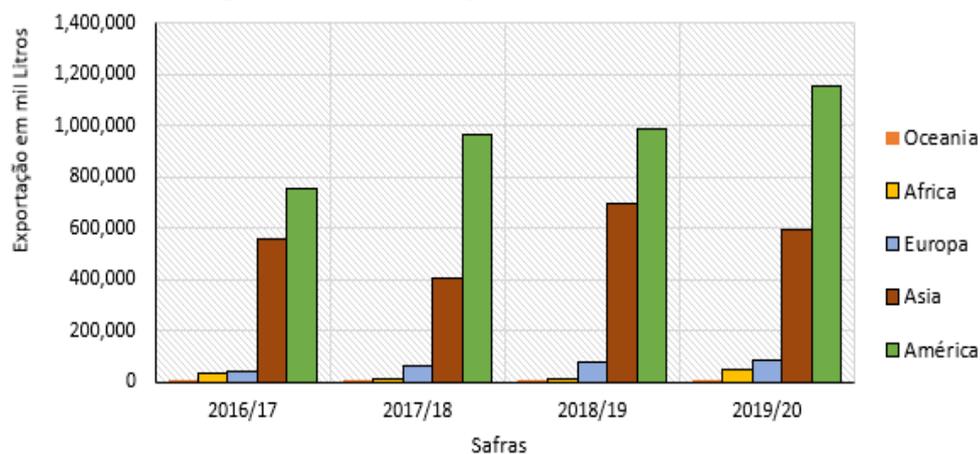
Fonte: Adaptada de IBGE (2021).

A produção de etanol no país tem como base a cana-de-açúcar utilizando um processo de produção conhecido como primeira geração, realizado com a fermentação direta necessitando apenas da extração do caldo de cana e do tratamento físico-químico para a sua clarificação (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). A produção do setor sucroenergético ocorre durante todo o ano e está segmentado em duas grandes regiões produtoras o Centro-Sul e Norte-Nordeste com safras em períodos diferentes, ocorrendo na região Centro-Sul nos meses de maio a dezembro e na região Norte-Nordeste de setembro a março (VIDAL; SANTOS, SANTOS, 2006).

A região Centro-Sul lidera a produção de cana-de-açúcar e, portanto, de etanol anidro e hidratado, com cerca de 87% da produção total nacional, tendo em vista as condições favoráveis desta região como topografia que permitiram a mecanização e com isso o aumento da produtividade (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Em contrapartida a participação da região Norte-Nordeste tem apresentado um decréscimo, visto que na década de 90 a produção desta região era de 23% da produção nacional e atualmente detém 13%, tal fato pode ser explicado pelas características edafoclimáticas da região que encarece o custo de produção desta cultura e por consequência de seus produtos o açúcar e o etanol (MASSRUHÁ; LEITE, 2017).

Nas últimas quatro safras, ocorreu um aumento gradativo da exportação de etanol, como pode ser observado na Figura 2. Os dados mostram que os principais destinos do bioetanol produzido no Brasil são a América e a Ásia.

Figura 2 – Exportação de etanol brasileiro.



Fonte: Adaptada de IBGE (2021).

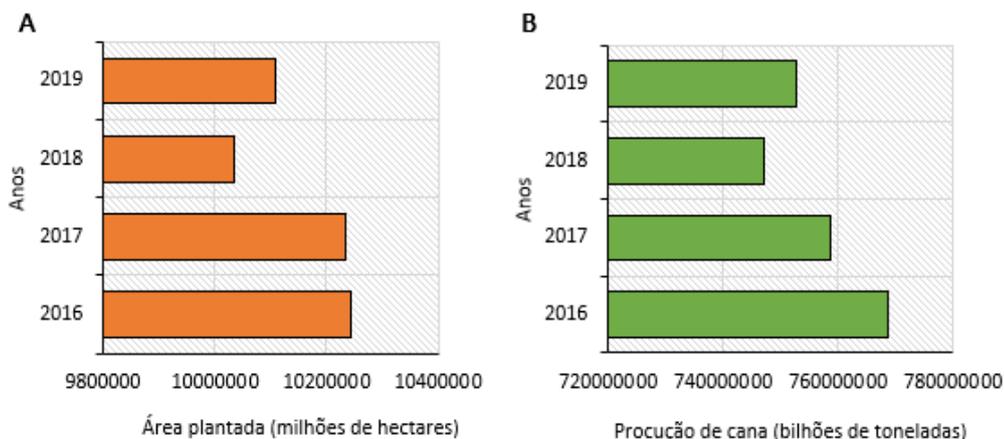
2.2 Matéria-prima para produção de etanol

O Brasil dispõe de recursos naturais, tecnologias, clima e solo para a cultura de uma variedade de culturas que propiciam os resultados positivos do agronegócio como a cana-de-açúcar, uma das mais antigas atividades agro econômicas deste país. Esta cultura é a matéria-prima principal para a produção de etanol em larga escala (SANTOS; COLODETTE; QUEIROZ, 2013).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) é uma planta composta por fibra, caldo e pequenos sólidos dissolvidos, em proporções variadas de água entre 65 a 75% e cerca de 70 a 90% de sacarose (LEMONS; STRADIOTTO, 2012). A formação da sacarose, presente no caldo e na fibra, ocorre pela maturação, ou seja, a síntese de açúcares e estocagem de sacarose ocorre de cima para baixo e ao longo do desenvolvimento da planta (BARBARA; DE MARCO FERRO, 2020).

Nas últimas duas décadas a produção canavieira brasileira apresentou crescimento em produção. Fato este observado nas últimas safras que mostra que o Brasil vem aumentando a produção de etanol, embora tenha ocorrido uma retração da área plantada e da produtividade da cana-de-açúcar nos anos de 2018 e 2019 (Figura 3A e B).

Figura 3 – Evolução da área plantada (A) e da produtividade de cana-de-açúcar (B) no período de 2015 a 2019 no Brasil.



Fonte: Adaptada de IBGE (2021)

Este ambiente de prosperidade foi impulsionado pelo forte avanço tanto da produção de açúcar como para garantir as metas que alguns países estabeleceram para substituir os combustíveis fósseis, com vistas a mitigação das mudanças climáticas (MANOCHIO *et al.*, 2017).

2.3. Processos fermentativos

A produção de etanol no Brasil ocorre por meio de fermentação do caldo da cana que pode ser de forma direta ou a partir da mistura de caldo e melaço, sendo este último proveniente da produção do açúcar, tendo em vista que a maioria das indústrias do setor produzem açúcar e etanol (BASSO; BASSO; ROCHA., 2011). A fermentação ocorre em dornas e segundo Marsit e Dequin (2015) é composta por três etapas como descrito a seguir:

- Pré-fermentação (5 a 6h): se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza pela multiplicação das células, ocorrendo elevação lenta e gradual da temperatura e apresentando pouca espuma;
- Fermentação principal (9 a 10h): ocorre uma elevação rápida da temperatura e queda da densidade do mosto com as leveduras em plena atividade metabólica, podendo ser verificada pela redução dos açúcares, pela formação de etanol e aumentando a acidez do meio. O término desta etapa se dá quando as espumas desaparecem;
- Pós-fermentação (6 a 8h): há uma diminuição do desprendimento de CO₂ com pouca formação de espumas. O tempo mais longo nesta etapa pode causar contaminação do vinho, mosto fermentado e do pé-de-cuba, pois as usinas realizam o reciclo das leveduras que retorna ao processo subsequente e o vinho já deslevedurado segue para a destilação para a recuperação do etanol hidratado ou anidro.

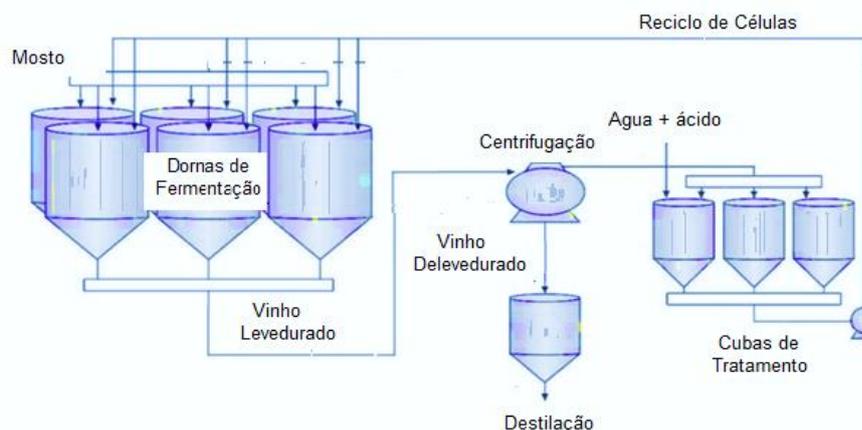
O processo fermentativo pode ser conduzido de diferentes formas operacionais, tais como: descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, podendo ser empregado a recirculação do fermento ou não. No Brasil, estima-se que cerca de 85% da produção de etanol ocorra em processos fermentativos de batelada alimentada e 15% com o processo contínuo (AMORIM *et al.*, 2011).

2.3.1 Tipos de processo fermentativo

O processo Descontínuo Alimentado conhecido como Melle-Boinot apresenta como vantagens a economia de açúcar devido a menor reprodução celular com elevado rendimento em etanol, a possibilidade de eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho e tratamento com ácido para eliminar outros contaminantes e não havendo a necessidade de utilizar uma cultura pura no preparo do pé-de-cuba, pois utiliza-se o reciclo de células (AMORIM *et al.*, 2011), diminuindo, deste modo a complexidade das operações da planta.

O reciclo de células é um benefício para o processo, pois o fermento que antes era enviado para a coluna de destilação junto com o vinho agora retorna para a fermentação subsequente (Figura 4) reduzindo custo com fermento além de aumentar a eficiência do processo fermentativo, pois uma pequena parcela do açúcar vai para a propagação de células (AMORIM *et al.*, 2011).

Figura 4 – Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação.



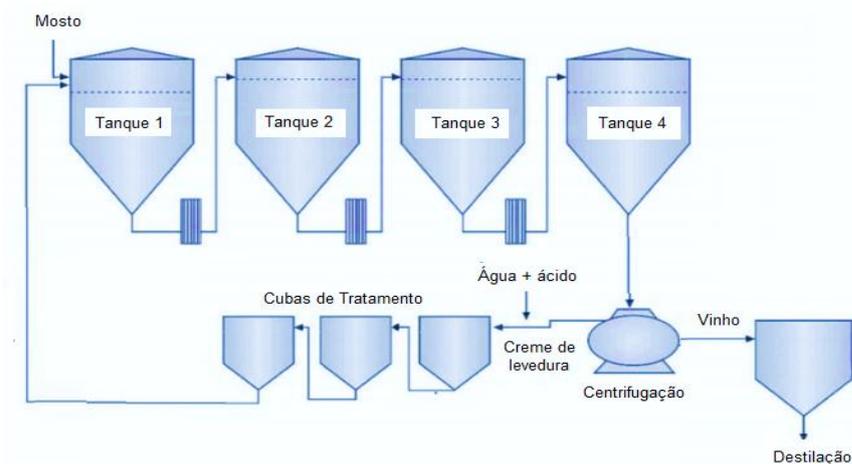
Fonte: Adaptado de Lopes *et al.* (2016).

O processo de fermentação contínuo possui como característica a alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão de forma constante e com o volume de reação também constante, sendo mantido através da retirada contínua de células e do caldo fermentado (Figura 5).

Este processo pode se apresentar mais vantajoso que a batelada ou batelada alimentada, uma vez que inclui uma otimização das condições do processo que pode resultar em maior produtividade, obtendo ganhos quantitativos com produto

uniforme além de redução de custos, 50 a 60% menor que o sistema descontínuo alimentado, principalmente em análises laboratoriais e sanitização das dornas facilitando o controle automático, todavia a desvantagem está na susceptibilidade de contaminação bacteriana por períodos de tempo mais longos de acordo com o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CECATTO-ANTONINI, 2018; CNPEM, 2017).

Figura 5 – Esquema do processo de fermentação contínua



Fonte: Adaptado de Lopes *et al.* (2016).

2.3.2 Fatores de atenção na fermentação

O meio fermentativo apresenta-se como um ambiente hostil e qualquer alteração pode afetar o metabolismo das leveduras. De fato, os parâmetros técnicos operacionais deste ambiente influenciam, de forma direta, no andamento do processo resultando em perdas tanto na viabilidade do fermento como na produção de etanol, mesmo sendo utilizadas leveduras selecionadas que possuem maior tolerância ao processo (MOREIRA *et al.*, 2015).

As leveduras utilizadas na produção de etanol são do gênero *Saccharomyces* que possuem alta tolerância a fatores de estresse além de uma fisiologia capaz de se adaptar as condições do processo industrial. Leveduras como a Pedra-2, a Catanduva-1, a Barra Grande e a FT-858, estão entre as mais utilizadas para a produção de etanol, pois possuem atributos como serem ótimas fermentadoras, alta resistência e permanência no processo, entre outras (AMORIM; LOPES, 2013). Estes fatores de estresse podem estar relacionados a fatores físicos, químicos e

biológicos e ser de origem tanto intrínseca como extrínsecas ao processo. Os fatores mais relevantes são:

- Temperatura: que embora colabore com a velocidade da fermentação ocasiona problemas como a formação e compostos secundários como glicerol, pois afeta a capacidade metabólica das leveduras e pode impulsionar a contaminação por organismos termotolerantes, assim a temperatura ideal é entre 26 a 35 °C (NAVES *et al.*, 2010; VASCONCELOS, 2015).
- pH: nos mostos industriais geralmente o pH está entre 4,5 a 5,5. Entretanto, no processo de fermentação com ciclos de células é realizado um tratamento com ácido sulfúrico para minimizar a contaminação, nesta etapa o pH permanece em torno de 2,0 a 3,2 por aproximadamente uma hora (FERNANDES *et al.*, 2020).
- Oxigênio: a presença de oxigênio pode interferir na performance da levedura, mesmo este microrganismo desenvolvendo suas rotas metabólicas tanto na presença como na ausência de oxigênio, contudo em grandes concentrações de oxigênio ocorre a inibição da fermentação (VASCONCELOS, 2015).
- Altas concentrações de açúcares: resulta em perdas da atividade de transporte de açúcar, induzido assim ao estresse pelo aumento da osmolaridade externa levando a redução do crescimento e a perda da viabilidade celular, as leveduras em geral apresentam osmotolerância limitada (SAINI *et al.*, 2018), ocorrendo também inibição das atividades de enzimáticas, o denominado Efeito Crabtree (FONSECA; CARVALHO, GOMBERT, 2013);
- Altas concentrações de fermento: tanto pode acelerar o processo fermentativo como aumentar a temperatura e resultar na restrição do crescimento da levedura, pois uma concentração elevada de leveduras exige mais energia para manutenção das células diminuindo a viabilidade do fermento (SAINI *et al.*, 2018).
- A escolha da levedura também pode influenciar na eficiência da fermentação gerando uma alta produção de etanol e baixa produção de metabólitos secundários indesejáveis como o glicerol e outros que por ventura venha a ser produzido frente as condições estressantes do meio (WALKER; STEWART, 2016).
- Altas concentração de etanol no meio pode causar várias consequências para as células, pois afeta a fluidez da membrana plasmática resultando na perda do

equilíbrio iônico desencadeando mudanças na composição da membrana celular, entre outros (HU *et al.*, 2007).

- A viabilidade das leveduras é um fator que impacta na fermentação, assim deve-se fazer um controle com avaliação periódica afim de identificar qualquer problema que venha a acontecer com o fermento. Dependendo da intensidade dos fatores de estresse as leveduras podem sofrer inibição como por exemplo ter alterações do transporte e captação da glicose, na permeabilidade da membrana plasmática, inibição de enzimas que ocasionará a redução da viabilidade (SILVA; BATISTOTE; CEREDA, 2013).
- A floculação ocorre como uma autoproteção ou devido as condições do meio externo, como a presença de bactérias que induzem a formação de flocos ou relacionada com leveduras contaminantes que possuem essa característica de formação de flocos (ALVES; PINTO, 2011), ocasionando perda de células afetando o rendimento alcoólico e também atrapalha a ação de antibacteriano aumentando os custos do processo (AMORIM *et al.*, 2011).
- A contaminação que pode ser tanto por leveduras selvagens como bactérias e que inibem o crescimento das leveduras competindo por nutrientes e propiciando a formação de ácidos orgânicos e dextranas, que afetam negativamente a viabilidade das leveduras (SAUNDERS *et al.*, 2019). As leveduras selvagens acabam dominando o processo ao longo da safra e acarretar problemas como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação (SILVA; BARBON; BRONZATTO, 2017).

Esses fatores podem estar associados no ambiente fermentativo e dado ao seu sinergismo pode interferir também nos mecanismos de adaptação das células de leveduras, causando por vezes, estresse ao microrganismo ou resultando na pressão seletiva (WENGER *et al.*, 2011). Assim, pode-se correlacionar que a presença de fatores de estresse associados afeta a eficiência fermentativa, outrossim um meio contendo nutrientes essenciais como fonte de carbono e de nitrogênio favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência das leveduras no meio fermentativo (MUELLER *et al.*, 2020).

2.4 Métodos de controle bacteriano no processo industrial

2.4.1 Métodos de controle utilizados

O processo de fermentação constitui-se como um processo propício a contaminações, isso porque o caldo ou mosto não passa por processo de esterilização, podendo conter uma variedade de contaminantes como leveduras não-*Saccharomyces* e várias espécies de bactérias. Para minimizar a contaminação as usinas fazem uso de um processo que utiliza o ácido sulfúrico diluído em água que é aplicado no creme de leveduras (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015).

As usinas fazem uso também de antibióticos, biocidas ou outros produtos químicos que são utilizados quando ocorre a redução do rendimento fermentativo devido a presença de bactérias (OLIVA-NETO *et al.*, 2012). Entretanto, para resolver os problemas de contaminação, ainda, são necessários estudos de alternativas para substituir os tratamentos tradicionais, pois a utilização de produtos químicos causam problemas ao meio ambiente, principalmente, pelos resíduos que são descartados e que podem conferir maior resistência as bactérias, uma vez que a maior parte delas são oriundas do próprio meio ambiente (CECATTO-ANTONINI, 2018; VARGAS *et al.*, 2004).

2.4.2 Antissépticos e antibióticos

A utilização de antissépticos e antibióticos estão relacionados aos efeitos sobre os diferentes grupos de microrganismos existentes na fermentação. Todavia, o uso destes compostos de forma continua pode resultar na alteração da resistência das bacteriana frente ao antibiótico (VARGAS *et al.*, 2004; NAVES *et al.*, 2010). Estes produtos têm deixado resíduos químicos que acabam sendo descartados junto aos resíduos do processo indo parar no meio ambiente, um bom exemplo são os antibióticos cloranfenicol e a tetraciclina amplamente utilizados nas dornas de fermentação (CECCATO-ANTONINI, 2018). Ultimamente muitas destilarias tem substituído o uso de antibióticos e cerca de 40% do tratamento ácido pelo uso do dióxido de cloro em concentração de 30 (mg x L⁻¹) procedimento este, patenteado em 2012 e denominado de “DuPont Fermassure” (CECATTO-ANTONINI, 2018).

Outra alternativa que tem sido estudada para o controle de contaminação é o uso de compostos naturais com atividade bactericida e que possuam eficiência, com custo acessível para substituir os antibióticos utilizados atualmente. Algumas usinas

tem utilizado o “Extrato de Lúpulo Beta Ácido 45%” como o extrato comercial “Betabio 45” da Wallerstein (representante da Hopsteiner, empresa norte-americana), ou ainda o BETA HOP 45 da marca DND Química, porém esses extratos são caros pois são utilizados na indústria da cerveja e são, na sua maioria importados (REVISTA ALCOOLBRAS, 2017).

Alguns estudos com extratos vegetais de plantas cultivadas ou nativas do Brasil já estão sendo desenvolvidos e vem apresentando bons resultados, contudo, a grande maioria desses estudos são conduzidos com espécies de microrganismos causadores de doenças ou contaminação em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; RATH; PADHY, 2014), *Streptococcus mutans* (PEREIRA *et al.*, 2016; CHIRAYATH *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Algumas plantas já são relatadas na literatura como portadoras de moléculas bioativas que podem ser empregadas como antissépticos e mesmo antibióticos.

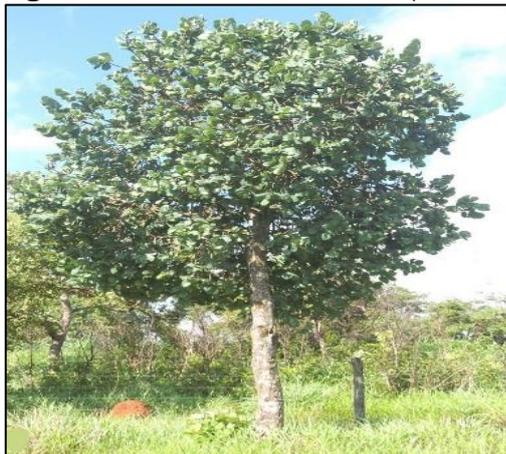
2.5 Plantas que apresentam perfil de moléculas bioativas com potencial para utilização como antibióticos

2.5.1 *Annona coriacea* Mart

O marolo (*Annona coriacea* Mart.), uma planta nativa dos cerrados brasileiros conhecido na região central do Brasil como: bruto, cabeça de negro, cascudo, araticum-do-cerrado, araticum-do-campo e pinha-do-cerrado (PIMENTA *et al.*, 2014) é utilizado na medicina popular na forma de infusão utilizando para isso as folhas da planta (Figura 6), que é empregado como agente antiparasitários, antitumorais (atribuídas às acetogeninas ACGs presentes em todas as anonáceas) (QUÍLEZ *et al.*, 2018), bem como no tratamento de distúrbios intestinais, picadas de cobra e doença de chagas (SANO *et al.*, 2010; FORMAGIO *et al.*, 2015).

O extrato das diferentes partes desta planta como folhas, sementes, casca da fruta e polpa, apresentaram propriedades antimicrobiana (De TOLEDO *et al.*, 2011; LAGE *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2015) com destaque para a antifúngica, especificamente contra a levedura *Candida albicans* (De TOLEDO *et al.*, 2011; QUÍLEZ *et al.*, 2018), antiparasitária (LAGE *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2015), antimalárica (PIMENTA *et al.*, 2014) entre outras

Figura 6 – *Annona coriácea* (marolo)



Fonte: Árvores do Bioma Cerrado (2017).

De acordo com Ribeiro *et al.* (2018), o extrato etanólico de *A. crassiflora*, da mesma família, apresenta ação frente as bactérias multirresistentes, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus spp*, que causam diarreia em ovinos e mastite em bovinos. Demonstrando, que esta planta possui fitoquímicos com atividades específicas.

A casca da fruta desta planta apresentou 142 fitoquímicos (ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2018). Outros compostos como fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados, catequinas, epicatequinas, entre outras substâncias com atividade antioxidante estão presentes em outras partes da planta (ARRUDA; PEREIRA, PASTORE, 2017). Outros compostos bioativos como como ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, xantoxilina e rutina, sendo que para alguns foram atribuídas atividades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória foram encontrados nos extratos etanólico da casca e das sementes do araticum e foram descritos por Roesler *et al.* (2006 e 2007) e Li *et al.* (2012).

2.5.2 *Baccharis dracunculifolia* DC

A *Baccharis dracunculifolia* DC ou Alecrim-do-Campo (Figura 7) é uma planta que tem amplo potencial, pertencente à família Asteraceae, compreende cerca de 1.200 gêneros, dentro dos quais estão 25.000 espécies (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATI, 2005). Conhecida também como própolis verde, como salienta Figueiredo-Rinhel (2013).

Esta planta possui vários compostos químicos como flavonoides e ácidos fenólicos (ALENCAR *et al.*, 2005). No extrato metanólico das diferentes fases de desenvolvimento das folhas da *B. dracunculifolia* foram encontrados o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido fenólico (PARK *et al.*, 2004), terpenos, sesquiterpeno, espatulenol, nerolidol (PAULINELLI *et al.*, 2004).

Figura 7 – *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: Agrolink (2018).

Dessa planta é retirado um óleo essencial de grande interesse para a indústria de fragrâncias, possui também atividades promissoras pois possui propriedades farmacológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, anti-*Trypanosoma cruzi*, antiviral, anticarcinogênica (MONTPIED *et al.*, 2003; SILVA LEITÃO *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2003; ISHIKAWA *et al.*, 2004) e ainda servir como alimento (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Outras aplicações foram descritas por Canton e Onofre (2010), utilizando o extrato hidroalcoólico. Estes autores notaram que o extrato apresentou sinergismo junto a antibióticos potencializando sua ação contra a *Escherichia coli* bactéria gram-negativa. De acordo com Ferronato *et al.* (2007), o óleo essencial de *B. dracunculifolia* possui atividade antibacteriana com capacidade de inibição de microrganismos cariogênicos como *Streptococcus mutans* (ATCC 2575); *S. sobrinus* (ATCC 27607); *S. sanguis* (ATCC 10557) e *Lactobacillus casei* (ATCC 4646).

Esta planta é relatada em vários estudos por apresentar capacidade de inibição frente a atividade microbiana sendo esta atividade, relevante para diversas áreas, pois os extratos de plantas como esta são tidos como fontes propícias de

compostos com propriedades antimicrobianas, todavia, a resistência das bactérias está relacionada, geralmente, a da pressão seletiva dos antibióticos (OGBOLE; SEGUN; FASINU, 2018; YUAN; LEE; YUK, 2017).

Vale ressaltar também que há uma forte relação desta planta com a própolis verde (FIGUEIREDO-RINHEL, 2013) e extratos de própolis demonstraram forte ação antibacteriana e seletividade na inibição de leveduras com alguma ação contra *S. cerevisiae*, mas com maior atividade contra *Dekkera bruxelensis* (CECATTO-ANTONINI, 2021).

2.5.3 *Mangifera indica* Linn

A *Mangifera indica* Linn. é uma planta da família Anacardiaceae, que produz frutos conhecido como manga (Figura 8). Na medicina popular esta planta é utilizada como coadjuvantes no tratamento de doenças respiratórias a crônicas a diurético e estimulante da função láctea, possuindo nas suas folhas propriedades adstringentes e nas sementes anti-helmínticas (GARCIA; ORLANDA, 2014), sendo uma fonte importante de fitoquímicos presentes nas diferentes partes da planta destacando-se os polifenóis, os carotenoides e a vitamina C (MELO; ARAÚJO, 2011).

Alguns estudos indicam que essa planta possui ação antibacteriana frente a microrganismos como *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* e contra várias outras espécies de enterobactérias como *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae* e muitas outras espécies incluindo bactérias lácticas (KABUKI et al., 2000; RAJAN; THIRUNALASUNDARI; JEEVA, 2011; SINGH et al., 2015; CAJADO; ARAGÃO; OLIVEIRA, 2016).

Figura 8 – *Mangifera indica*



Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2021).

De acordo com Gonçalves; Alves Filho e Menezes (2005), os princípios ativos estão relacionados com a composição química da planta e com a concentração de metabólitos secundários que compõem os mecanismos de defesa natural contra microrganismos e contra predação por insetos e herbívoros. Singh et al. (2015) atribuem a atividade antimicrobiana de extratos de casca de caule de manga à presença de fitoconstituintes, como triterpenóides, flavonóides e taninos.

2.5.3 *Murraya koenigii* (L.)

A planta *Murraya koenigii* L. é um membro da família Rutaceae, também conhecida como árvore de Caril ou Árvore de Curry (Figura 9) suas folhas são usadas como ervas, especiarias ou condimentos e como antibióticos para muitos males, embora outras partes desta planta também possuem atividades antioxidantes (MA et al., 2016; YOGESH, JHA, YADAV, 2012). As folhas de *M. koenigii* são usadas como erva na medicina ayurvédica e Siddha, pois possuem compostos como cinamaldeído, e numerosos carbazol alcalóides, incluindo mahanimbine, girinimbine e mahanine (GAHLAWAT; JAKHAR; DAHIYA, 2014; YESASWINI et al., 2014).

Figura 9 – *Murraya koenigii*



Fonte: Sitio da Mata (2021).

As diferentes partes da planta como folhas, raiz, casca e frutos, são conhecidos por promover várias atividades biológicas (BALAKRISHNAN et al., 2020). Os constituintes aromáticos bioativos presentes nas folhas retêm seu sabor e outras qualidades, mesmo após a secagem e conservam seus bioativos. Esta planta possui uma grande quantidade de polifenólicos, flavonóides, alcalóides carbazol,

cumarinas, flavonóides, ácido gálico e ácido vanílico (NOOLU *et al.*, 2013). Estes mesmos autores relatam que os polifenólicos e flavonóides antioxidantes contribuem para os efeitos anti-inflamatórios, quelantes de metais, inibidores de proteassoma e possui efeito apoptóticos quando utilizado em células do câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O estudo visa o controle da contaminação microbiana no processo fermentativo das usinas utilizando extratos vegetais.

3.2 Específicos

- Realizar uma triagem para identificar quais os extratos são promissores frente aos microrganismos contaminantes;
- Analisar o perfil dos extratos vegetais por absorção molecular;
- Testar o potencial do uso de diferentes extratos vegetais contra as bactérias contaminantes determinando, quando houver uma concentração mínima inibitória;
- Estabelecer o potencial de inibição dos extratos vegetais frente aos microrganismos contaminantes;
- Avaliar em condições simuladas a eficiência desse(s) extrato(s) em meio fermentativo.

4 MATERIAL e METODOS

4.1 Local de desenvolvimento do estudo

Os extratos foram preparados no Laboratório Multidisciplinar da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul.

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Biotecnologia, Bioquímica e Biotransformação do Centro de Estudos em Recursos Naturais-CERNA da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul-UEMS/Unidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul.

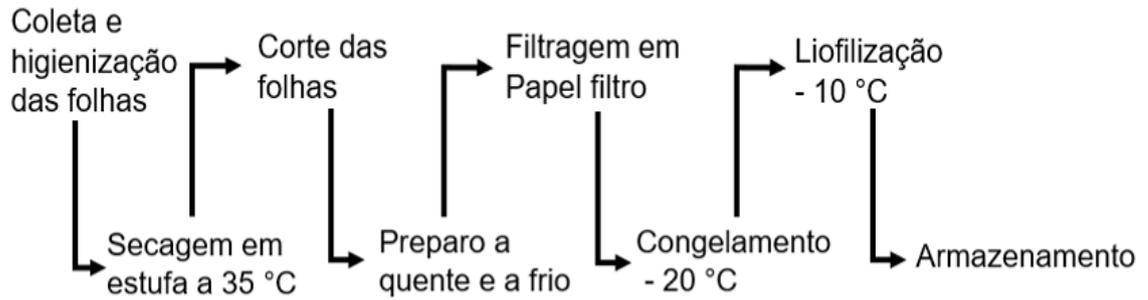
4.2 Coleta do material biológico

Foram utilizadas folhas novas das plantas *Annona coriacea* (Voucher MuBio 5816), *Baccharis dracunculifolia* (Voucher MuBio 5557) que foram coletadas as margens da Avenida Guaicurus respectivamente nas coordenadas 22°19'2624"W 54°90'9611"S e 22°19'6321"W 54°89'2784"S, e as espécies *Murraya koenigii* (Voucher MuBio 6502) e *Mangifera indica* (Voucher MuBio 3822) no município de Dourados respectivamente nas coordenadas 22°20'4041"W 54°80'7765"S e 22°20'6012"W 54°80'9227"S.

4.3 Preparo dos extratos

Para o preparo dos extratos o material coletado foi higienizado e cortado com o auxílio de uma tesoura, sendo preparados de formas distintas. Para o extrato a quente foi adicionado água destilada em ebulição até a concentração inicial de 300 g \times L⁻¹ (peso material vegetal / volume de água). Essa suspensão foi mantida em chapa de aquecimento por 5 min para extração. Para o extrato a frio, o material foi embebido em água e deixado em repouso na geladeira por 12 h. Como apresentado abaixo (Figura 10 e 11). Sendo denominados de Tratamento 1 (T1) para o preparo a frio e Tratamento 2 (T2) o preparo a quente.

Figura 10 – Etapas de desenvolvimento do preparo dos extratos



Fonte: Elaborada pelo autor.

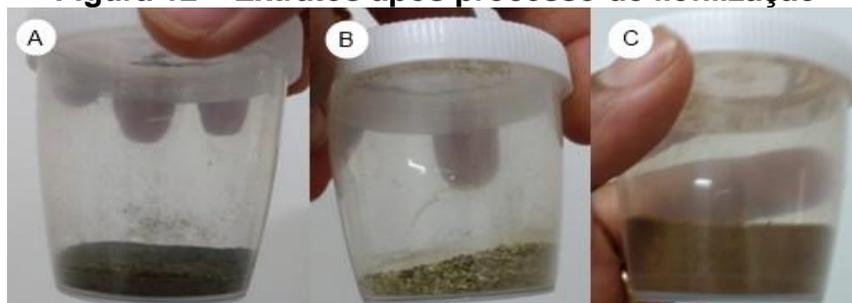
Figura 11 – Preparo dos extratos: folhas higienizadas (A), folhas cortadas (B), embebidas em água fria (C) e em água quente (D)



Fonte: Acervo do autor.

Os extratos foram filtrados e liofilizados, ou seja, evaporados sob pressão reduzida até que toda a água fosse evaporada, resultando em um resíduo viscoso ou em pó segundo a metodologia (PURICELLI *et al.*, 2003), como apresentado na Figura 12, sendo, e armazenados sob refrigeração.

Figura 12 – Extratos após processo de liofilização



Legenda: *Annona coriacea* (A); *Murraya koenigii* (B) e *Baccharis dracunculifolia* (C).

Fonte: Acervo do autor.

4.3.1 Preparo das diluições dos extratos das plantas

A partir dos extratos liofilizados foram feitas soluções com concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5 mg x mL⁻¹ que foram pesadas com o auxílio de balança analítica e dispostas em eppendorfs, sendo utilizada água destilada esterilizada para preparar as soluções que foram utilizadas nos testes de disco de difusão e nas demais análises.

4.4 Microrganismos utilizados

As bactérias utilizadas foram as Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922); Gram-positivas: *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus* sp. que foi anteriormente isolado do processo fermentativo de uma usina da Região da Grande Dourados. As leveduras foram as *Saccharomyces cerevisiae* Catanduva -1 (Cat-1) e Pedra-2 (Pe-2).

4.4.1 Manutenção dos microrganismos

As leveduras e as bactérias utilizadas nos testes de antibiose foram mantidas em banco estoque congeladas (-80 °C).

Para os testes de antibiose as bactérias foram crescidas em meios diferentes a *Bacillus* sp. em caldo MRS e as demais em caldo Macconkey. As leveduras foram cultivadas em YPD (Yeast Extract Pepton Dextrose) contendo 1% de peptona e extrato de levedo e 2% de glicose.

4.4.1.1 Ativação das leveduras

As leveduras (0,10 g) foram previamente crescidas em meio líquido YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) 2% contendo (1% de peptona e extrato de levedo e 2% de glicose) estéril e incubadas em shaker a 30 °C por 10 horas, após este período foram utilizadas nos ensaios.

4.4.1.2 Ativação das bactérias

Foi feito um inóculo bacteriano, utilizando o caldo infusão cérebro coração (BHI) líquido, no qual foram adicionadas as bactérias que permaneceram incubadas por 24 horas ou até que se obtivesse turbidez correspondente à escala de 0,5 MacFarland (aproximadamente 1x10⁸ UFC x mL⁻¹). Os inóculos ativos foram utilizados nos testes.

4.5 Preparo dos discos de difusão

Os discos de difusão utilizados, foram de papel filtro perfurados com um furador de papel obtendo discos com 6 mm de diâmetro, os quais foram impregnados com 20 µL, com o auxílio de uma micro pipeta, das respectivas concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5 (mg x mL⁻¹), previamente preparadas conforme descrito no item 4.3.1, das plantas *M. koenigii*, *M. indica*, *B. dracunculifolia* e *A. coriacea*. Para o controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada.

4.6 Avaliação da sensibilidade dos microrganismos frente aos extratos

A avaliação de sensibilidade, foi realizada utilizando placas de Petri de 20 cm de diâmetro, contendo o meio sólido Mueller-Hinton (DIFCO®), nas quais foram inoculados os microrganismos e espalhados com o auxílio de uma swab e dispostos os discos impregnados com o extrato, após este procedimento as placas foram incubadas em estufa na temperatura de a 37 °C para as bactérias. Para as leveduras o mesmo procedimento foi utilizado sendo utilizado o meio YPD 2% sólido nas placas que foram incubadas a 30 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A avaliação da sensibilidade foi realizada de forma qualitativa a partir da presença e ausência de halo de inibição. A partir desta análise preliminar, foi possível averiguar os resultados mais promissores para escolher os extratos mais eficientes.

4.7 Avaliação dos espectros de absorção molecular dos extratos a quente e a frio (UV-Vis) dos extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia*

Os extratos foram preparados individualmente utilizando a solução de partida e submetidos a varredura com a absorbância medida entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm com intervalos de 5 nm. Foi utilizada cubetas de quartzo para a realização das varreduras. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro (FENTO 700 PLUS). Foi utilizado água como branco. Análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Teste do halo de inibição frente aos microrganismos

O teste de antibiose foi realizado utilizando placas de Petri de 20 cm de diâmetro contendo os meios de cultura para bactérias e leveduras respectivamente. As placas foram devidamente identificadas, nas quais foram inoculados os

microrganismos e espalhados com o auxílio de uma swab. Os discos foram impregnados com os extratos conforme descrito no item 4.5 e, prontamente dispostos nas placas de forma equidistantes. Nas placas foram dispostos os extratos com os dois tratamentos (T1 e T2) e as três concentrações. As placas foram mantidas em incubação na temperatura de a 37 °C para as bactérias. Para as leveduras o mesmo procedimento foi utilizado sendo estas incubadas a 30 °C. Todos os testes foram realizados em triplicata e a análise foi realizada de forma quantitativa com os halos medidos utilizando um paquímetro. Os critérios adotados para a avaliação foram em relação ao diâmetro do halo, sendo sensível quando ≥ 14 (mm), intermediária 9 a 14 (mm) e resistentes ≤ 8 (mm) de acordo com Santos *et al.* (2011).

4.8.1 Teste do crescimento celular em meio fermentativo com adição dos extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* e com co-cultura de bactéria

Este experimento foi realizado em meio líquido semelhante às condições de usinas com o objetivo de testar a viabilidade de linhagens de levedura industriais Pe-2 e Cat-1 e com a bactéria contaminante *Bacillus* sp. Foram utilizados os extratos das plantas que, de acordo com os testes de inibição, apresentaram eficiência frente as bactérias.

As concentrações dos extratos foram preparadas proporcionalmente ao volume do meio fermentativo considerando um volume de 50 mL, no qual foi adicionado as concentrações do extrato nas proporções descritas (0,1; 0,25 e 0,5 mg x mL⁻¹) no item 4.3.1. Para controle foi utilizado o antibiótico sintético cloranfenicol uma concentração de 0,3 (mg x mL⁻¹).

4.8.2 Preparo do pré inóculo

Para o pré-inóculo as leveduras foram ativadas como descrito no item 4.5, sendo as células coletadas por centrifugação (800 g, 20 min), ressuspendidas e lavadas em solução salina (0,85 %) esterilizada, resultando em uma concentração final de 10 mg x mL⁻¹ de massa úmida que foi prontamente utilizada nos experimentos fermentativos.

As bactérias foram ativadas utilizando o caldo infusão cérebro coração (BHI) líquido, que permaneceram incubadas por 24 horas ou até que se obtivesse turbidez

correspondente à escala de 0,5 MacFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC x mL⁻¹), passando posteriormente por uma centrifugação para concentrar a biomassa celular, que foi utilizada nos ensaios fermentativos.

4.8.2.1 Preparo do meio fermentativo

A fermentação foi realizada com caldo de cana na concentração de 22 °Brix e pH 4.0. Para tanto, foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL dos caldos esterilizados, nos quais foram adicionadas as concentrações dos extratos (0,1; 0,25 e 0,5 mg x mL⁻¹) preparadas como descrito no item 4.3.1. Ao meio fermentativo foram adicionados também as leveduras e a bactéria. Os frascos permaneceram sob agitação a 30 °C com 250 rpm. Em tempos pré-definidos (4 em 4 horas) foram realizadas as coletas para o teste de viabilidade.

4.8.2.2 Teste de crescimento celular

Foram preparadas placas de Petri contendo o meio YPD 2% sólido (1% de peptona, extrato de levedo, 2% de glicose, 2% de Agar e 3 mg de antibiótico cloranfenicol), as quais foram marcadas e reservadas. Nos tempos pré-definidos alíquotas de 10 µL do fermentado foram colhidas com o auxílio de uma micropipeta automática e gotejadas nas placas que foram mantidas por 20 min. no interior da capela de fluxo laminar para a aderência da gota ao meio de cultura. Após este período as placas foram dispostas na estufa a 30 °C por 24 horas ou até o desenvolvimento da colônia. Os testes foram conduzidos em triplicatas independentes para cada concentração do extrato.

4.9. Análise dos dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey com grau de significância de 5% utilizando-se o software Assistat.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do teste do halo de inibição dos extratos vegetais na presença de diferentes microrganismos

Os resultados mostraram que os microrganismos não apresentaram sensibilidade aos extratos das espécies *M. indica* e *A. coriacea* nas concentrações estudadas (Tabela 1), somente, foram verificadas a ação dos extratos das plantas *B. dracunculifolia* e *M. koenigii* frente as bactérias, pois apresentaram sensibilidade, contudo não houve diferença quanto aos processos de extração mais sim em relação às concentrações do extrato.

Apesar das espécies de *Annona* terem relatos na literatura para atividade antibacteriana (De TOLEDO et al., 2011; BATISTA et al., 2021), as concentrações para bactérias são muito elevadas. De Toledo et al. (2011) encontraram atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apenas acima de 1.000 g x mL⁻¹, concentração muito acima da utilizada nesse estudo, cuja maior concentração estudada foi a de 0,5 mg x mL⁻¹. Batista et al. (2021) encontraram atividade de extrato de frutos de *Annona muricata* L. contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, porém não houve atividade com extratos da folha da planta.

Souza et al. (2021) trabalharam com óleo fixo de *A. coriacea* em concentrações de até 10 mg x mL⁻¹, mas também não constataram atividade antimicrobiana contra as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram obtidos por Afroz et al. (2020), com o extrato metanólico da fruta da graviola (*Annona muricata*) frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Apesar da *Annona coriacea* não ter apresentado atividade antibacteriana em concentrações viáveis, esta planta pode vir a ser útil para o controle de leveduras contaminantes de processos fermentativos, já que outros estudos relatam atividade contra *C. albicans* (De TOLEDO et al., 2011; SOUZA et al., 2021) e o presente trabalho não mostrou atividade contra as duas leveduras industriais testadas.

Tabela 1 – Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos frente a amostras de diferentes extratos vegetais

Extratos	Concentração (mg x mL ⁻¹)	Leveduras				Bactérias					
		Pe-2		Cat-1		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Bacillus sp.</i>	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
<i>A. coriacea</i>	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dracunculifolia</i>	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	0,50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>M. indica</i>	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. koenigii</i>	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,50	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Fonte: Dados da pesquisa. (+) Apresentou sensibilidade; (-) Não apresentou sensibilidade; (T1) Extração pelo Método à Frio; (T2) Extração pelo Método à Quente;

O extrato de folhas e do fruto de outras espécies relacionadas como *A. muricata* apresentaram atividade contra *C. albicans* e *C. krusei* (CESAR et al., 2021) e, como leveduras do gênero *Candida* são contaminantes comuns de fermentação alcoólica, junto de outras espécies dos gêneros *Saccharomces*, *Schizosaccharomces* e *Delkкера* (CECATTO-ANTONINI, 2021) estes resultados se tornam bastante promissores, assim sugerem-se estudos futuros com espécies de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica.

Os extratos de *M. indica* também não apresentaram atividade antimicrobiana, o que não era esperado já que alguns autores relatam atividade para diferentes partes da planta, tais como extratos da casca (SINGH et al., 2015), folha (CAJADO; ARAGÃO; OLIVEIRA, 2016) e semente (KABUKI et al., 2000; RAJAN; THIRUNALASUNDARI; JEEVA, 2011). Entretanto, Rani et al. (2020), utilizando extrato de folhas de manga, relataram que só obtiveram respostas em relação ao controle de biofilme quando o extrato foi associado a nanopartículas de cobre e que o controle utilizado que continha somente o extrato das folhas não apresentou atividade de inibição. O resultado do controle descrito por Rani et al. (2020) está em consonância com os resultados obtidos neste trabalho.

Handral, Hoti, Shruthi (2012) utilizando extrato aquosos de folhas de *M. koenigii* inferiram que o extrato aquoso mostrou uma baixa atividade antibacteriana quando comparado a antibióticos controle. Essa sensibilidade foi observada para as bactérias *P. aeuriginosa*, *E. coli* e *S.aureus*. Estes dados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que para a avaliação da ação dos extratos também foram utilizadas as bactérias *E. coli* e *S.aureus*.

A *B. dracunculifolia* apresentou ótimos resultados no controle de contaminantes apresentado atividade antibacteriana para as três espécies testadas na concentração de 0,5 mg x mL⁻¹ (Tabela 1). Alguns estudos como os desenvolvidos por Bonin et al. (2020), utilizando o extrato aquoso de *B. dracunculifolia* demonstraram atividade de inibição frente a bactérias como *S. aureus* e *B. subtilis* e *Salmonella*, contudo foram utilizadas doses mais elevadas do que as utilizadas no presente estudo, sendo 1002 mg x mL⁻¹ já no presente estudo obteve-se resposta a partir de 0,25 mg x mL⁻¹ para *E. coli* e 0,50 mg x mL⁻¹ para as demais

bactérias. Possivelmente as condições da planta em relação ao desenvolvimento e a concentração de metabólitos bioativos tenha influenciado nas respostas de inibição.

De acordo com Rashmi e Naveen (2016), os extratos aquosos possuem uma melhor solubilidade o que resulta em uma maior disponibilidade de fitoquímicos nas amostras. Assim, estes extratos podem apresentar atividades antibacteriano, dependendo apenas da concentração na amostra.

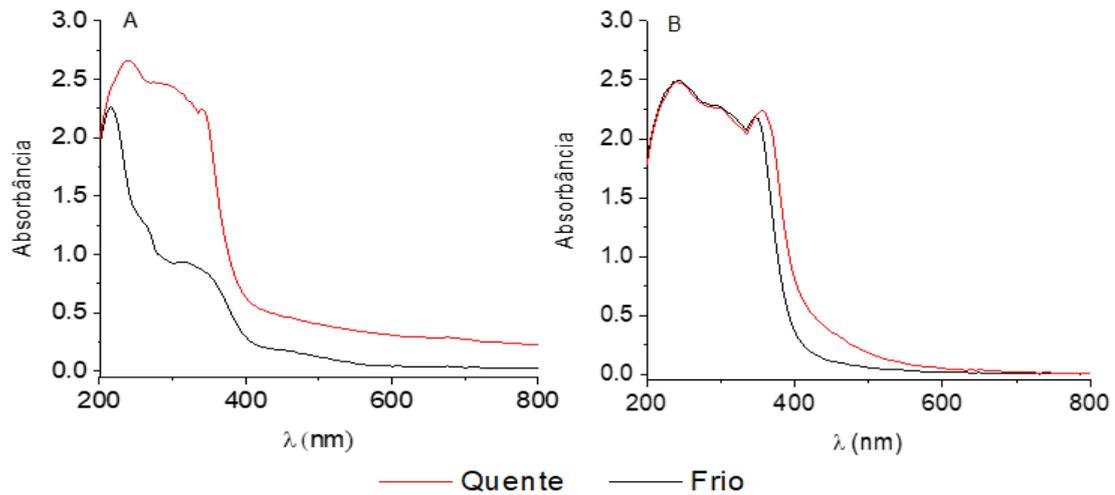
As plantas que possuem substâncias bioativas podem ser empregadas em diferentes segmentos, assim são tanto de interesse para a composição de fármacos como para a utilização em processos industriais, contudo, são necessários estudos a respeito da composição destas plantas, principalmente em relação aos extratos e da sua ação (DO NASCIMENTO NUNES *et al.*, 2020). Assim, para realizar estudos com plantas ou parte delas é importante observar o método de extração que será utilizado para o preparo do extrato ou óleo essencial, uma vez que pode ocorrer perda de compostos ativos durante a manipulação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA, 2010);

Diante dos resultados obtidos quanto a atividade antibacteriana dos extratos estudados, optou-se em realizar as demais análises utilizando apenas os extratos das plantas *B. dracunculifolia* e *M. koenigii*.

5.2 Espectros de absorção molecular dos extratos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* a quente e a frio (UV-Vis)

A análise dos espectros de absorção molecular permitiu observar o comportamento dos métodos de extração a quente e a frio utilizados para o preparo dos extratos. A figura 13 apresenta o perfil dos extratos aquosos obtidos tanto por extração a quente e a frio de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* bem como da definição das regiões de absorção máxima, as quais estão diretamente relacionadas com a sua composição. Os espectros de absorção da *M. koenigii* mostraram diferença entre os tratamentos de extração (Figura 13 A), tendo em vista que, embora as bandas sejam semelhantes a intensidade de absorbância foi mais expressiva para a extração a quente. O extrato de *B. dracunculifolia* apresentou um perfil semelhante nos espectros, tanto para a extração a quente como a frio (Figura 13B).

Figura 13 – Espectros de absorção molecular entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm, *M. koenigii* (A) e *B. dracunculifolia* (B).



Fonte: Acervo do autor

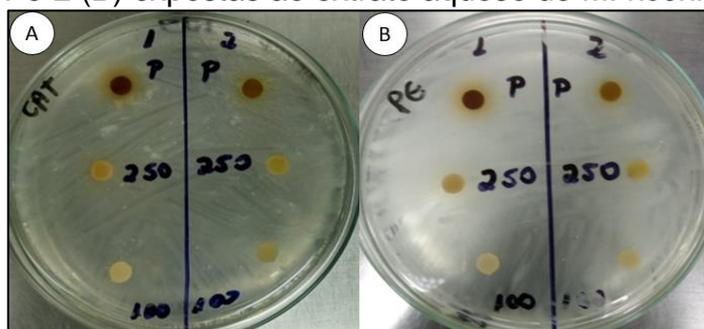
A varredura realizada por espectroscopia no UV-Vis possibilita presumir a presença de classes fitoquímicas em extratos vegetais. Os espectros mostram a presença destes compostos através de picos em determinadas bandas como exemplo, nas bandas 289, 376, 396 e 423 nm, podem estar presentes compostos como alcaloides, fenólicos, flavonoides e carotenoides (MENEZES FILHO; SANTOS; SOUZA CASTRO, 2020; SOUSA *et al.*, 2018).

5.3 Teste do halo de inibição frente a amostras de extratos vegetal de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* em diferentes microrganismos

Na avaliação do teste de halo de inibição utilizando diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas de *M. koenigii* em leveduras industriais, pode-se observar que tanto o Tratamento 1 como o Tratamento 2 nas concentrações estudadas não causaram ação de inibição frente as leveduras Cat-1 e Pe-2, uma vez que não houve a formação de halo de inibição como mostra a Figura 14.

De acordo com Basso *et al.* (2008), as linhagens Pe-2 e Cat-1 são as mais utilizadas pelas usinas brasileiras por apresentar alta taxa de sobrevivência e capacidade de dominância durante o processo fermentativo no decorrer da safra. As leveduras utilizadas no processo fermentativo, *S. cerevisiae*, possuem características requeridas para o processo como serem tolerantes ao estresse do meio fermentativo (MOREIRA *et al.*, 2015).

Figura 14 – Teste de sensibilidade com disco de difusão com as leveduras Cat-1 (A) e Pe-2 (B) expostas ao extrato aquoso de *M. koenigii*.



Fonte: Acervo do autor

Na avaliação do halo de inibição, em relação aos tratamentos e as concentrações do extrato aquoso das folhas de *M. koenigii* na presença das bactérias, pode-se observar que ocorreu inibição do crescimento das bactérias analisadas na maior concentração do extrato em ambos os tratamentos. O halo de inibição formado no *Bacillus* sp. foi de 9,5 mm para o tratamento T2 na concentração de 0,50 ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$), sugerindo que esta bactéria apresenta uma sensibilidade intermediária frente ao tratamento e a concentração do extrato utilizada (Tabela 2). Desta, forma pode-se salientar que possivelmente os compostos bioativos presentes neste extrato podem apresentar potencial antimicrobiano. Com isso pode-se inferir, mesmo que ainda de forma muito tímida, que estes dados possam contribuir para estudos futuros, com vistas, ainda, a possibilidade de purificação de moléculas bioativas a serem utilizadas nos processos fermentativos de forma sustentável. As demais bactérias apresentaram halos de inibição de 8,0 mm mostrando certa resistência a este extrato conforme a classificação utilizada neste estudo.

Embora a *M. koenigii*, seja amplamente estudada devido as suas potencialidades e indicações fitoterápicas, apresentando estudos das diferentes partes da planta, o extrato aquoso das folhas desta espécie é pouco relatado na literatura para atividade antimicrobiana. Alguns estudos relatam a eficiência da ação de inibição desta planta, principalmente, das folhas na forma de extrato etanólico e metanólico frente a microrganismos como *Bacillus*, *E. coli* e *S. aureus* (DAS; BISWAS, 2012; AL HARBI; IRFAN; ALI, 2016; ABUGA *et al.*, 2020).

Tabela 2 – Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos frente a amostras de extrato vegetal de *M. koenigii* em diferentes concentrações

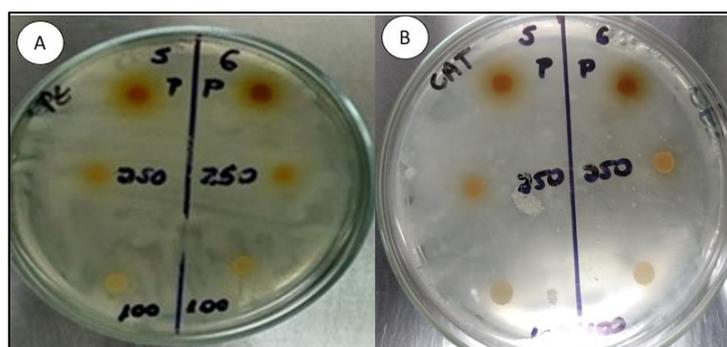
Concentração (mg x mL ⁻¹)	Tratamentos	Diâmetro do halo (mm)		
		<i>S. aureus</i>	Bactérias <i>E. coli</i> <i>Bacillus sp.</i>	
0,10	T1	–	–	–
	T2	–	–	–
0,25	T1	–	–	–
	T2	–	–	–
0,50	T1	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,3	8,0 ± 0,1
	T2	8,0 ± 0,1	8,2 ± 0,2	9,5 ± 0,3
0,30	Cloranfenicol	19,5 ± 0,2	19,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1

Fonte: Dados da pesquisa. (–) Não apresentou halo; (T1) Extração pelo Método à Frio; (T2) Extração pelo Método à Quente;

A figura 15 apresenta a ação do extrato aquoso da *B. dracunculifolia* com os tratamentos tanto a quente como a frio, sendo notório que as leveduras não apresentam sensibilidade frente a este extrato.

As leveduras utilizadas no processo de fermentação para a produção de etanol devem possuir características como ter alta resistência as condições do meio fermentativo e se sobressair aos demais microrganismos presentes no meio, permanecendo, neste sentido, por mais tempo no processo (AMORIM *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2020).

Figura 15 – Teste de sensibilidade com disco de difusão com as leveduras Cat-1 (A) e Pe-2 (B) expostas ao extrato aquoso de *B. dracunculifolia*.



Fonte: Acervo do autor

Quanto a ação direta do extrato de *B. dracunculifolia* sobre as bactérias (Tabela 3). Os resultados mostraram que os dois métodos de extração promoveram inibição. Com diferença significativa entre os extratos a quente e a frio nas concentrações de 0,10; 0,25 e 0,50 mg x mL⁻¹. Os dados mostram que o tamanho do halo de inibição do extrato de *B. dracunculifolia* está relacionado com a concentração do extrato e com o tratamento utilizado para a extração, uma vez que os halos mais efetivos foram observados na concentração de 0,50 mg x mL⁻¹ para o tratamento (T2) correspondendo a extração a quente.

Tabela 3 – Ação de inibição do crescimento bacteriano pelo método de disco de difusão utilizando extrato de *B. dracunculifolia* em diferentes concentrações

Concentração (mg x mL ⁻¹)	Tratamentos	Diâmetro do halo (mm)		
		Bactérias		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>
0,10	T1	–	–	–
	T2	–	–	–
0,25	T1	–	10,0 ± 0,1	–
	T2	–	14,0 ± 0,2	–
0,50	T1	10,0 ± 0,1	17,0 ± 0,3	18,0 ± 0,1
	T2	12,0 ± 0,3	18,0 ± 0,2	20,0 ± 0,2
0,30	Cloranfenicol	19,5 ± 0,2	19,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1

Fonte: Dados da pesquisa. (–) Não apresentou halo; (T1) Extração pelo Método à Frio; (T2) Extração pelo Método à Quente;

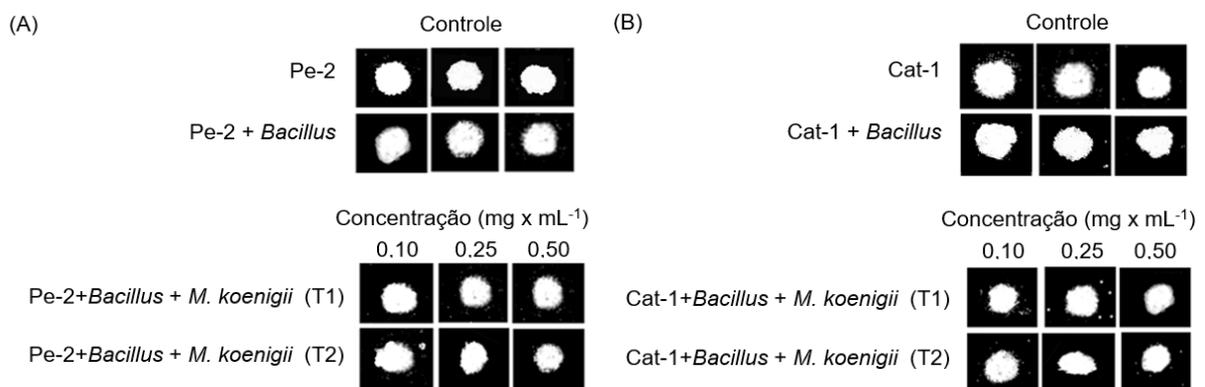
O método de extração constitui uma das etapas mais importantes para a obtenção de um extrato rico em metabólitos bioativos. A extração a frio pode preservar alguns bioativos como os antioxidantes enquanto a extração a quente/infusão pode resultar em uma eficiência de extração de alguns ácidos que possuem a ação de proteção da planta (RASHEED *et al.*, 2018). Para Casagrande *et al.* (2018), além do solvente e do método de extração as variáveis que são importantes também são o tempo e a temperatura, estes dois últimos estão relacionados com a integridade dos bioativos e a abundância deles no extrato e determinado, assim, a sua eficiência.

5.4 Avaliação do crescimento celular de leveduras na presença de bactéria frente aos extratos *M. koenigii* e *B. dracunculifolia*

A figura 16 mostra o resultado do teste de crescimento celular pelo método de gota para as leveduras em co-cultura com *Bacillus* sp. cultivados em meio fermentativo com adição dos extratos de *M. koenigii* com os dois tratamentos, notou-se que o tratamento 1 não afetou o crescimento celular similar ao controle e que este comportamento foi observado para ambas as leveduras. Entretanto, para o tratamento 2 houve uma pequena alteração no perfil de crescimento da levedura, possivelmente, a concentração mais elevada do extrato atuando no meio fermentativo tenha afetado o crescimento da levedura. Sugerindo que talvez o sinergismo dos bioativos presentes no extrato tenha causado essa inibição.

Este ensaio tem como objetivo apresentar de forma qualitativa o crescimento celular na presença de um agente estressor qualquer, sendo mensurada pelo desenvolvimento da colônia da levedura. Mueller *et al.* (2020), em seus estudos com processo fermentativo acrescentando diferentes concentrações de etanol ao meio fermentativo e leveduras industriais utilizou esta técnica para avaliar a ação do etanol no crescimento das leveduras. Os autores observaram que quando o percentual de etanol acrescentado ao meio era maior as colônias apresentavam-se menores, deformadas ou fragmentadas, demonstrando, assim, a toxicidade que elevados teores de etanol causam as células de leveduras.

Figura 16 – Análise do crescimento celular das leveduras Pe-2 (A) e Cat-1 (B), em meio fermentativo com adição de diferentes concentrações de extrato de *M. koenigii*

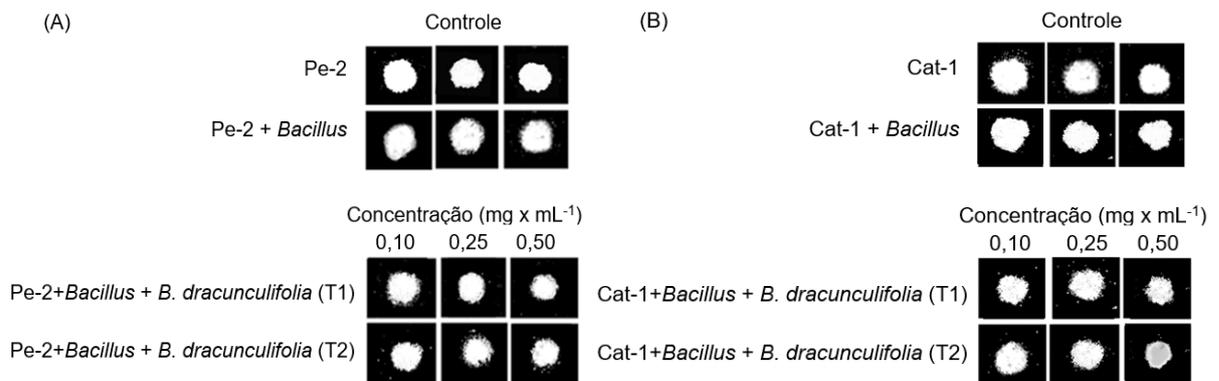


Fonte: Elaborada pelo autor

A figura 17 apresenta a análise do crescimento celular das leveduras em meio fermentativo com a adição de extrato de *B. dracunculifolia*. Embora as leveduras

apresentaram crescimento, ocorreu nas concentrações mais elevadas do extrato uma inibição do crescimento da colônia, ou seja, houve alteração do tamanho das colônias, que foi observado tanto na figura 17(A) como na 17(B). O resultado sugere que a presença de bioativos desta planta tenha causado a inibição.

Figura 17 – Avaliação do crescimento das leveduras Pe-2 (A) e Cat-1 (B), em meio fermentativo com adição de diferentes concentrações de extrato de *B. dracunculifolia*



Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com Casagrande *et al.* (2018), esta planta possui propriedades tanto antioxidantes como biológicas. Ademais, Bonin *et al.* (2020), estudando a composição desta planta encontraram a artepilina C como principal componente fenólico que possui alta atividade antimicrobianas.

6 CONCLUSÃO

As leveduras utilizadas neste estudo não apresentaram sensibilidade frente aos extratos das espécies vegetais avaliadas. O teste de halo de inibição mostrou que os extratos aquosos de *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* apresentam atividade antibacteriana frente as cepas de *Bacillus* sp., *E. coli* e *S. aureus* na concentração mais elevada e com o extrato preparado por processo de extração a quente.

Diante dos resultados pode-se sugerir que os extratos vegetais das espécies *M. koenigii* e *B. dracunculifolia* podem ser uma alternativa sustentável, pois são de origem natural e podem ser empregado em processos industriais susceptíveis a contaminação bacteriana, contudo são necessários mais estudos para comprovar a eficiência em escala industrial.

7 REFERÊNCIAS

- ABUGA, I.; SULAIMAN, S. F.; WAHAB, R. A.; OOI, K. L.; RASAD, M. S. B. A. In vitro antibacterial effect of the leaf extract of *Murraya koenigii* on cell membrane destruction against pathogenic bacteria and phenolic compounds identification. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 33, p. 101010, 2020.
- AFROZ, N.; HOQ, M. A.; JAHAN, S.; ISLAM, M. M.; AHMED, F.; SHAHID-UD-DAULA, A. F. M.; HASANUZZAMAN, M. Methanol soluble fraction of fruits of *Annona muricata* possesses significant antidiarrheal activities. **Heliyon**, v.6, n.1, e03112, 2020.
- AGROLINK – Vassoura -Alecrim de vassoura, vassoureira (*Baccharis dracunculifolia*). 2018. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura_596.html. Acesso em: 02 de mar. 2021.
- AL HARBI, H.; IRFAN, U. M.; ALI, S. The antibacterial effect of curry leaves (*Murraya Koenigii*). **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, p. 382-387, 2016.
- ALENCAR, S. M. D.; AGUIAR, C. L. D.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the States of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- ALMEIDA, E. T. D.; JUSTO, W. R.; OLIVEIRA, M. F. D.; SILVA, C. C. D. Uma análise da demanda por combustíveis através do modelo almost ideal demand system para Pernambuco. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, n. 4, p. 691-708, 2016.
- ALVES, P. C. O.; PINTO, S. S. Comportamento de leveduras selvagens em fermentação no setor sucroalcooleiro. **Revista Cognitio**, v. 2, 2011.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. **Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos. Embrapa Agroenergia**, v. 1, p. 42-59, 2013
- AMORIM, H. V.; LOPES, ML, DE CASTRO OLIVEIRA, JV, BUCKERIDGE, MS, GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona coriacea* Mart.) as a potential source of natural antioxidant compounds. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 5, p. 2005–2012, 2018.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Optimization of extraction Parameters of total phenolics from *Annona coriacea* Mart. (Araticum) fruits using response surface methodology. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 100–110. 2017.

ÁRVORES DO BIOMA CERRADO. 2017 Disponível em: <www.arvoresdobiotoma cerrado.com.br/site/2017/04/10/annona-crassiflora-mart-2/>. Acesso em: 03, out., 2019.

BALAKRISHNAN, R.; VIJAYRAJA, D.; JO, S. H.; GANESAN, P.; SU-KIM, I.; CHOI, D. K. Medicinal profile, phytochemistry, and pharmacological activities of *Murraya koenigii* and its primary bioactive compounds. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 101. 2020.

BARBARA, G.; DE MARCO FERRO, D. A. Maturadores em cana de açúcar: comparação entre os princípios ativos dos produtos trinexapaque-etílico (MODDUS) e glifosato (ROUNDUP). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48571-48578, 2020

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v.8, p. 1155-63, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production-recent developments and prospects**, v. 1530, p. 85-100, 2011.

BATISTA, A. K. R., CESAR, K. K. F. A., PAULA, L. R., DA SILVA, F. L., & RAPOSO, H. L. O. Potencial antibacteriano (*in vitro*) do extrato metanólico da *Annona muricata* L. **Research, Society and Development**, v.10, n.5, e33510514950-e33510514950, 2021.

BESSA, D. J. P. O mercado internacional do etanol. **Revista Geonorte**, v. 4, n. 12, p. 520-536, 2013.

BONIN, E.; CARVALHO, V. M.; AVILA, V. D.; APARECIDA DOS SANTOS, N. C.; BENASSI-ZANQUETA, É.; CONTRERAS LANCHEROS, C. A.; SANTOS PREVIDELLI, I. T.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALVES DE ABREU FILHO, B.; NUNES DO PRADO, I. *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **LWT**, v. 120, p. 108920, 2020.

CAJADO, A.G.; ARAGÃO, P. T. T. D.; OLIVEIRA, M. A. S. Efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 3, p. 177-82, 2016.

CANEPPELE, F. D. L.; GODINHO, E. Z.; DALTIM, R. S.; GASPAROTTO, H. V.; ZUIN, L. F. S. Cogeração de energia em usina sucroalcooleira almejando sustentabilidade. **Expressa Extensão**, v. 25, n. 3, p. 45-59, 2020.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interference from extracts of *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, on the activity of antibiotics used in the clinic. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

CARMO JUNIOR, J. C.; BARROS, R. N.; MASCARENHAS SANTOS, M. S.; BATISTOTE, M. Levantamento das principais variedades de cana plantadas na região da Grande Dourados. In: **Anais do I Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia**. Anais...Diamantina (MG) Online, 2020. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/icobicet2020/262863>. Acesso em: 15/01/2021.

CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; MOFATTO, L. S. ; TEIXEIRA, P. J. P. L.; NORONHA, M. F.; CALDERÓN, ; MIECZKOWSKI, P. A .; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2015.

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J. WAGNER JÚNIOR, A.; BUSSO, C.; WOUK, J.; IURCKEVICZ, G.; MONTANHER, P. F.; YAMASHITA, F.; MANECKMALFATTI, C. R. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 207-219, 2018.

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. 1-11, 2018.

CESAR, K. K. F. A., BATISTA, A. K. R., PAULA, L. R., DA SILVA, R. T., & DA SILVA, F. L. Ação antifúngica de extratos e frações de *Annona muricata* L. sobre *Candida* spp. **Research, Society and Development**, v.10, n.5, e28010514938-e28010514938, 2021.

CHIRAYATH, R. B.; VISWANATHAN, A.; JAYAKUMAR, R.; BISWAS, R.; VIJAYACHANDRAN, L. S. Development of *Mangifera indica* leaf extract incorporated carbopol hydrogel and its antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 178, p. 377-384, 2019.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais **Fermentação: contínua ou em batelada?** 2017. Disponível em: <https://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>. Acesso em: 02 de mar. 2021.

DAS, B. N.; BISWAS, B. K. Antibacterial and cytotoxic activities of the leaf extract of *Murraya koenigii*. **International Journal of Life Science, Biotechnology and Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 59-62, 2012.

DE SOUZA, S.; DE ANDRADE, T. H. N. Efeitos do etanol para além da economia: um estudo de caso em Piracicaba (SP). **Brazilian Journal of Environmental Sciences** (Online), n. 29, p. 33-48, 2013.

DE TOLEDO, C. E. M., BRITTA, E. A., CEOLE, L. F., SILVA, E. R., DE MELLO, J. C. P., DIAS FILHO, B. P., UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p. 420–425, 2011.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 979-991, 2013.

DO NASCIMENTO NUNES, J. V.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, R.; MACIEL, L. H.; DA SILVA, R. E.; DA SILVA LIMA, V.; RAMOS, M. L. H.; DA SILVA, G. C. Aspectos biológicos e terapêuticos do gênero *Microgramma*, família Polypodiaceae. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50403-50416, 2020.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biology Pharmaceutical Bulletin**., v. 26, n. 4, p. 527 –531, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/manga>. Acesso em: 02 de mar. 2021.

FERNANDES, A. M. O.; GARCIA, N. F. L.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R.; PAZ, M. F. Evaluation of the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and BB9 strains and *Pichia kudriavzevii* BB2 at simulated industrial conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 494-504, 2020.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S.; KABEYA, L. M.; BUENO, P. C.; JORGE-TIOSSI, R. F.; AZZOLINI, A. E. C.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FONSECA, G. G.; CARVALHO, N. M. B.; GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.11, p. 5055-5067, 2013.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to *Annonaceae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

GAHLAWAT, D. J. K.; JAKHAR, S.; DAHIYA, P. *Murraya koenigii* (L.) Spreng: An ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 3, p. 109-119, 2014.

GARCIA, A. P. M.; ORLANDA, J. F. F. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato bruto hidroalcoólico de *Mangifera indica* Linneau. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.19, n.3, p. 189-198, 2014.

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

HANDRAL, H. K.; HOTI S. L.; SHRUTHI, D. S. In vitro evaluation of antimicrobial activities of crude extracts from *Murraya koenigii* against pathogenic bacteria. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 4, p. 74-6, 2012.

HU, X. H.; WANG, M. H.; TAN, T.; LI, J. R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R. M.; LUO, Z. W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, p. 1479–1487, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/SIDRA-Banco de Tabelas Estatísticas. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612>. Acesso em 17 de fev. 2021.

ISHIKAWA, M.; KANNO, S.; ASOU, K.; OGINO, M.; TADANO, T. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. s/, p. 129-129, 2004.

KABUKI, T.; NAKAJIMA, H.; ARAI, M.; UEDA, S.; KUWABARA, Y.; DOSAKO, S. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. **Food Chemistry**, v.71, n.1, p. 61–66, 2000.

KNOEMA - Sugarcane area harvested 2020. Disponível em: <https://knoema.com/atlas/topics/Agriculture/Crops-Production-Area-Harvested/Sugar-cane-area-harvested>. Acesso em 03 de fevereiro de 2021

LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. D. S.; FURTADO, W. D. L.; TAKAHASHI, J. A.; FILHO, J. D. D. S.; PIMENTA, L. P. S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural product research**, v. 28, n. 11, p. 808-811, 2014.

LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. Bioenergia: Desenvolvimento, Pesquisa e Inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, p. 1072, 2012.

LI, W.; LI, N.; TANG, Y.; LI, B.; LIU, L.; ZHANG, X.; HAIAN, F.; DUAN, J. Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085-6088, 2012.

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

MA, Q. G.; XU, K.; SANG, Z. P.; WEI, R. R.; LIU, W. M.; SU, Y. L.; YANG, J. B.; WANG, A. G.; JI, T. F.; LI, L. J. Alkenes with antioxidative activities from *Murraya koenigii* (L.) Spreng. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 3, p. 799-803, 2016.

MANOCHIO, C., ANDRADE, B. R., RODRIGUEZ, R. P., & MORAES, B. S. Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 80, p. 743-755, 2017.

MARSIT, S.; DEQUIN, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 7, p. fov067, 2015.

MASSRUHÁ, S. M. F. S.; LEITE, M. A. A. Agro 4.0 – Rumo à Agricultura Digital. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/166203/1/PL-Agro4.0-JC-na-Escola.pdf>. Acesso em: 19 de fev. 2021.

MELO, E. A. DE; ARAÚJO, C. R. DE. Mangas das variedades espada, rosa e Tommy atkins: compostos bioativos e potencial antioxidante. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, 2011.

MENEZES FILHO, A. C. P.; SANTOS, M. C.; SOUZA CASTRO, C. F. Estudo fitoquímico, bioativo, fotoprotetor e físico-químico do extrato floral de *Cochlospermum regium* (Schrank.) Pilg.–*Bixaceae* (algodãozinho do cerrado). **Revista Arquivos Científicos (IMMES)**, v. 3, n. 2, p. 1-13, 2020.

MOITINHO, M. R.; PADOVAN, M. P.; PANOSSO, A. R.; LA SCALA, N. Efeito do preparo do solo e resíduo da colheita de cana-de-açúcar sobre a emissão de CO₂. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 1720-1728, 2013.

MONTPIED, P.; BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, v. 115, n. 2, p. 111-120, 2003.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015.

MOREIRA, C. S.; SANTOS, M. D. S. M.; BARRO, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 55-63, 2015.

MUELLER, L. P.; SANTOS, M. D. S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. The effects of thermal and ethanolic stress in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Research, Society and Development**, n. 9, v. 10, e6819109091, 2020.

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

NASCIMENTO, M.; FONSECA, G. G. Effects of the carbon source and the interaction between carbon sources on the physiology of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. **Preparative Biochemistry Biotechnology**, v.11, p. 1-8, 2019.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F.; Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p.16. 2010.

NOOLU, B.; AJUMEERA, R.; CHAUHAN, A.; NAGALLA, B.; MANCHALA, R.; ISMAIL, A. *Murraya koenigii* leaf extract inhibits proteasome activity and induces cell death in breast cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v.13, n.1, p. 1-17. 2013.

OBSERVATÓRIO DA CANA. Histórico de produção e moagem. Disponível em: <http://observatoriodacana.com.br/historico-de-producao-emoagem.php?idMn=31&tip oHistórico=2>. Acesso em: 16 de fev. 2021.

OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; FASINU, P. S. Antimicrobial and antiprotozoal activities of twenty-four Nigerian medicinal plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 240-246, 2018.

OLIVA-NETO, P.; LUDIWIG, K. M.; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, D. F.; LIMA, V. M. G. Contaminação na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante. In: LEMOS, E. G. M.; STRADIOTTO, N. R. (Org.). **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica. 2012. Cap. 14, p. 447-488.

OLIVEIRA, D. F.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S.; CARVALHO, H. W. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v.78, p. 142–145, 2007.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PAULINELLI, T.; FÁVERO, O. C.; ROMOFF, P.; LAGO, J. H. G. Análise do óleo volátil de dois espécimes de *Baccharis dracunculifolia*. *Anais...* São Paulo: SBQ, 2004.

PEREIRA, C. A.; COSTA, A. C. B. P.; LIPORONI, P. C. S.; REGO, M. A.; JORGE, A. O. C. Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Staphylococcus mutans*. **Journal of Infection and Public Health**, v.9, p. 324-330, 2016.

PIMENTA, A. C.; SILVA, P. S. D. R.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; KOEHLER, H. S. Caracterização de plantas e de frutos de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) nativos no Cerrado Matogrossense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 892-899, 2014.

PURICELLI, L.; DELL'AICA, I.; SARTOR L.; GARBISA S.; CANIATO R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 302-304, 2003.

QUÍLEZ, A. M., FERNÁNDEZ-ARCHE, M. A., GARCÍA-GIMÉNEZ, M. D., & DE LA PUERTA, R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 225, p.244–270, 2018.

RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Anti-enteric bacterial activity and phytochemical analysis of the seed kernel extract of *Mangifera indica* Linnaeus against *Shigella dysenteriae* (Shiga, corrig.) Castellani and Chalmers. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.4, p.294–300, 2011.

RANI, H.; SINGH, S. P.; YADAV, T. P.; KHAN, M. S.; ANSARI, M. I.; SINGH, A. K. In-vitro catalytic, antimicrobial and antioxidant activities of bioengineered copper quantum dots using *Mangifera indica* (L.) leaf extract. **Materials Chemistry and Physics**, v.239, 122052, 2020.

RASHEED, D. M.; PORZEL, A.; FROLOV, A.; EL SEEDI, H. R.; WESSJOHANN, L. A.; FARAG, M. A. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -glucosidase inhibition. **Food chemistry**, v. 250, p. 236-244, 2018.

RASHMI, J. B.; NAVEEN, G. Phytochemical analysis and antibacterial activity of different leaf extracts of *Murraya koenigii*. **International Journal of Biochemistry and Biomolecules**, v. 1, p. 5, 2016.

RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring in vitro antibacterial efficacy of 26 indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, p. 133-141, 2014.

REVISTA ALCOOLBRAS. Inimigo natural. **Revista Alcoolbras**, ed.117, Ed. Valete. 2007. Disponível em: http://www.revistaalcoolbras.com.br/edicoes/ed_110/mc_2.html. Acesso: 09, jun. 2021.

RIBEIRO, I. C. O.; MARIANO, E. G. A.; CARELI, R. T.; MORAIS-COSTA, F.; SANT'ANNA, F. M.; PINTO, M. S.; SOUZA, M. R.; DUARTE, E. R. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus spp.* and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 2018.

ROCHA, R. S.; KASSUYA C. A. L.; FORMAGIO, A. S. N.; MAURO, M. O.; ANDRADE-SILVA, M.; MONREAL, A. C. D.; CUNHA-LAURA, A. L.; VIEIRA, M. C.; OLIVEIRA, R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 35-47, 2015.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. L. Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, v. 71, n. 2, p. 102-107, 2006.

SAINI, P.; BENIWAL, A.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 1-12, 2018.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L.; FERREIRA, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 166, n 1-4, p. 113-124, 2010.

SANTOS, F., COLODETTE, J., & QUEIROZ, J. Bioenergia e biorrefinaria: cana-de-açúcar e espécies florestais. Viçosa - MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2013.

SANTOS, M. D. S. M.; CASTRO, T. L. A.; BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação da composição química e do potencial de inibição do óleo fúsel frente a diferentes microrganismos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e733986250-e733986250, 2020.

SANTOS, M. S. M.; MUELLER, L. P.; SILVA, C. J.; KURIHARA, C. H.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. M. Glycerol and ethanol accumulation profile of the yeast FT-858 on saccharine substrates. Embrapa Agropecuária Oeste-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2020.

SANTOS, V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; SILVA, B. A.; LIMA, M. S.; SOUZA, A. M. F.; BARBOSA, F. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 68-72, 2011.

SAUNDERS, L. P.; BISCHOFF, K. M.; BOWMAN, M. J.; LEATHERS, T. D. Inhibition of *Lactobacillus* biofilm growth in fuel ethanol fermentations by *Bacillus*. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 156-161, 2019.

SILVA LEITÃO, D. P.; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p.1834-1839, 2004.

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

SILVA, R. O.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 161-169, 2013.

SINGH, R.; SINGH, S. K.; MAHARIA, R. S.; GARG, A. N. Identification of new phytoconstituents and antimicrobial activity in stem bark of *Mangifera indica* (L.). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 105, p.150–155, 2015.

SIQUEIRA, G. M.; SILVA, J. S.; BEZERRA, J. M.; SILVA, E. F. F.; MONTENEGRO, A. A. A. Distribuição espacial da produtividade de cana-de-açúcar e da condutividade elétrica do solo medida por indução eletromagnética. In: **Estudios en la Zona No Saturada del Suelo**, v. XI ZNS'13, p. 127-132, 2013.

SITIO DA MATA – Disponível em: <https://www.sitiodamata.com.br/condimento-curry-murraya-koenigii>. Acesso em 02 de mar. de 2021.

SOUSA, I. J. O.; SILVA, M. C. P.; LEOPOLDINO, G. L.; AGOSTINHO, L. S. Estudo fitoquímico, avaliação da capacidade hemolítica e antimicrobiana de um extrato bruto da casca do caule de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 4, p. 208-225, 2018.

TEIXEIRA, N.; MELO, J. C. S.; BATISTA, L. F.; PAULA-SOUZA, J.; FRONZA, P.; BRANDÃO, M. G. L. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tools to select research. **Food Research International**, v.119, p. 325-348, 2019.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M. D.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Alcoholic própolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VASCONCELOS, J. N. Ethanol Fermentation. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Ed.). **Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol**. Elsevier, p. 311-329, 2015.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIDAL, M. F.; SANTOS, J. A. N; SANTOS, M. A.; Setor sucroalcooleiro no Nordeste brasileiro: estruturação da cadeia produtiva, produção e mercado. Anais do **XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural – SOBER**. Fortaleza, 2006.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 30, 2016.

WENGER, J. W.; PIOTROWSKI J.; NAGARAJAN, S.; CHIOTTI, K.; SHERLOCK, G.; ROSENZWEIG, F. Hunger artists: yeast adapted to carbon limitation show trade-offs under carbon sufficiency. **PLoS Genetics**, v. 7, p. 1-16, 2011.

YESASWINI, K. V. S. R. R.; SNEHA, R.; SUDHARSHAN, J.; SHEIK, A. Evaluation of the antibacterial activity of *Aegle Marmelos* at different concentrations and temperatures. *Helix*, v. 5, p. 594-599, 2014.

YOGESH, K.; JHA, S. N.; YADAV, D. N. Antioxidant activities of *Murraya koenigii* (L.) spreng berry extract: Application in refrigerated (4±1 c) stored meat homogenates. **Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 183-189, 2012.

YUAN, W.; LEE, H. W.; YUK, H.G. Antimicrobial efficacy of *Cinnamomum javanicum* plant extract against *Listeria monocytogenes* and its application potential with smoked salmon. **International journal of food microbiology**, v. 260, p. 42-50, 2017.