

CONTROLE NATURAL DE CONTAMINANTES NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Carlos Albano de Oliveira de Melo¹;
Michele Célico da Silva²;
Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno³;
Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri Salaro⁴

¹Aluno do CST em Biocombustíveis; email: carlosmelo1238@gmail.com

²Aluna do CST em Biocombustíveis; email: michelecelico2015@gmail.com

³Professor da FATEC Nilo De Stéfani - Jaboticabal; leonardomadaleno@fatecjaboticabal.edu.br

⁴Professora da FATEC Nilo De Stéfani - Jaboticabal; email:
marifrigieri@fatecjaboticabal.edu.br

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas. Microbiologia Industrial e de Fermentação

INTRODUÇÃO

A produção de etanol pode sofrer alterações significativas devido à presença de microorganismos contaminantes, os quais podem consumir a matéria prima, produzir substâncias inibitórias, alterar as condições ótimas do processo, metabolizar o etanol produzido entre outras ações. Os contaminantes podem ser inseridos no processo desde o cultivo da cana-de-açúcar no campo até o preparo do mosto e a fermentação propriamente dita. Grande parte da eficiência fermentativa está associada ao controle dos contaminantes. Assim, procurando contribuir com esse problema significativo do setor sucroenergético foi dada continuidade nos estudos com as plantas do cerrado que revelaram resultados promissores, sendo os extratos aquoso e hidroalcoólico de *Byrsonima intermedia* avaliados quanto à concentração mínima inibitória e a padronização dos métodos para controle de micro-organismos diretamente no processo, verificando parâmetros tecnológicos da fermentação. Foi possível verificar que ambos extratos mostraram ser efetivos em baixas dosagens para amostras bacterianas isoladas de processos fermentativos diferentes, apresentando CIM entre 2,5 mg.mL⁻¹ a 0,156 mg.mL⁻¹. Na padronização dos métodos de controle no processo fermentativo foi possível definir a amostra de levedura isolada da Usina C para a continuidade dos estudos, a qual dentre as amostras industriais resultou em obtenção de maior teor alcóolico (3,94%). Os resultados foram animadores, porém ainda necessitam de estudos para viabilizar a obtenção de um antibacteriano natural para uso no setor sucroenergético.

OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi verificar a possibilidade de controle de micro-organismos contaminantes durante o processo fermentativo, empregando métodos naturais. Para isso, foram realizadas a avaliação do controle dos contaminantes de processos fermentativos realizados na FATEC e em três unidades produtoras de etanol pelos extratos vegetais obtidos.

METODOLOGIA

Os extratos vegetais foram obtidos pela maceração na proporção 1:10 em etanol 70% por 5 dias ou em água por 3 dias. Após a filtração, foram realizados os procedimentos de concentração em rota-evaporador e liofilização para eliminação do etanol e da água, respectivamente. O extrato obtido no final do processo foram armazenados em refrigeração em frasco âmbar. Para as análises, os extratos vegetais foram solubilizados em água.

Os contaminantes microbianos foram isolados a partir do material da cuba de tratamento do fermento de três usinas diferentes da região de Jaboticabal. Os micro-organismos foram crescidos a 32°C em caldo nutriente (extrato de carne 3g/L e peptona 5g/L) para isolamento das bactérias. Quando atingiu

absorbância 600nm = 0,3 as amostras foram centrifugadas a 1.600xg por 5 minutos. O precipitado foi suspenso em glicerol 20% estéril e distribuído em tubos de microcentrífugas resistentes a baixas temperaturas (criotubos).

Os micro-organismos foram estocados em *ultrafreezer* até o momento de utilização.

A determinação da CIM foi realizada de acordo com CLSI, 2016.

Para a fermentação foi necessário o preparo do mosto de melão. Após a preparação, o mosto foi contaminado com 1% de cultura bacteriana (DO_{600nm}=1,0). Para o processo de fermentação foram utilizadas as amostras de leveduras (Fatec, Usinas A, B e C) na quantidade de 30g/L de mosto. As leveduras foram dispostas em erlenmeyers, os quais foram colocados em incubadora shaker à 30°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Decorrido o tempo de fermentação (6h) foi realizada análise tecnológica do vinho (teor etanólico) conforme CTC (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios da avaliação da CIM foi possível verificar que ambos os extratos mostraram ser efetivos em baixas dosagens para amostras bacterianas isoladas de processos fermentativos diferentes. A placa resultante na avaliação da CIM pode ser verificada na Figura 1 para o extrato hidroalcoólico e na Figura 2 para o extrato aquoso. Na Tabela 1 constam os valores obtidos para cada extrato.

Figura 1 - Avaliação da CIM para o extrato hidroalcoólico de *Byrsonima intermedia*.

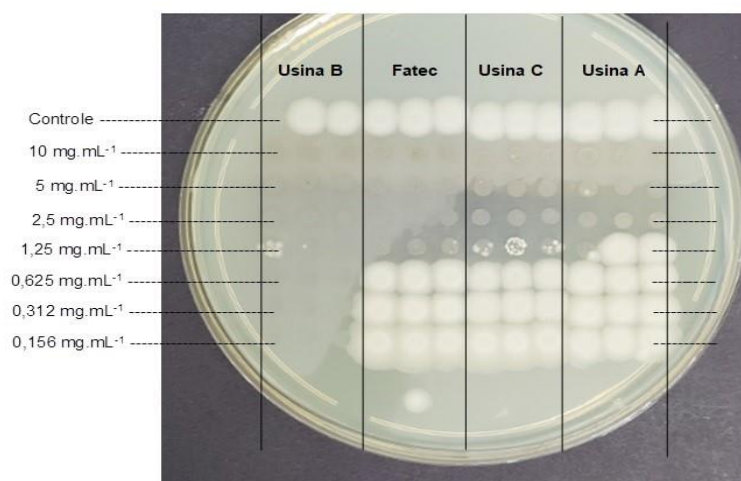


Figura 2 – Avaliação da CIM para o extrato aquoso de *Byrsonima intermedia*.

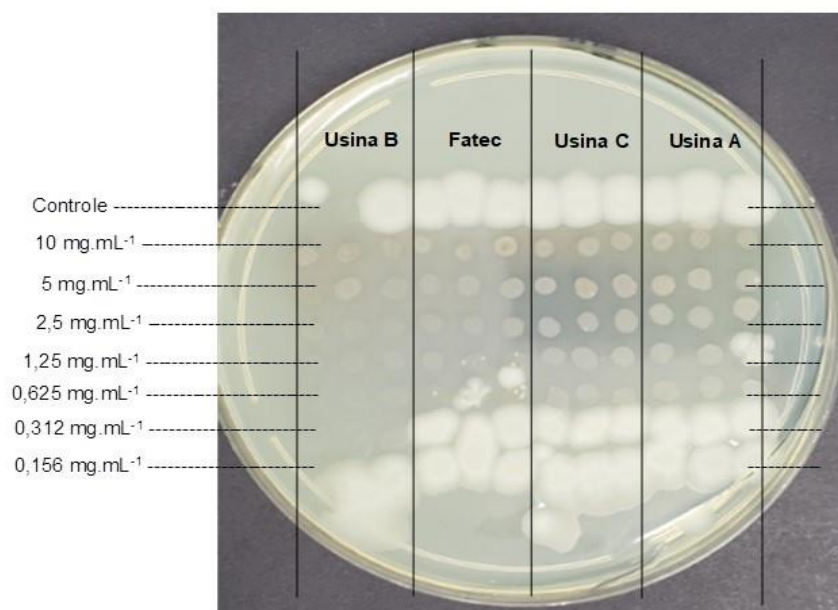


Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima dos extratos.

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

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

Santos et al., 2019, utilizando extrato metanólico deste vegetal também observou a presença de ação antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (0,250 mg.mL⁻¹) e

Escherichia coli (0,500 mg.mL⁻¹), além da bactéria *Helicobacter pylori* (0,125 mg.mL⁻¹). Porém, quando o extrato bruto metanólico foi separado em frações com o uso de acetato de etila e água, o efeito sobre a *H. pylori* foi perdido passando a apresentar CIM > 0,1000 mg.mL⁻¹ e 0,500 mg.mL⁻¹, respectivamente. O autor conclui que os resultados sugerem que a atividade da *B. intermedia* se deve a mais de um constituinte e que ocorre uma ação sinérgica entre os bioativos presentes no extrato bruto. Esses dados reforçam o interesse no uso do extrato bruto no controle de bactérias contaminantes no processo fermentativo.

O mosto de melaço foi submetido às fermentações utilizando diferentes leveduras isoladas. Após a fermentação, foi obtido o vinho e neste foram realizadas análises para avaliar o teor alcoólico. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos. Verificou-se que a levedura isolada da fermentação na Fatec apresentou a melhor produção de etanol, no entanto o interesse deste trabalho é verificar a ação dos extratos vegetais nas amostras isoladas das unidades produtoras, assim foi definida a amostra de levedura da Usina C para a continuidade dos estudos, a qual dentre as amostras industriais resultou em obtenção de maior teor alcóolico.

Tabela 2 – Parâmetros tecnológicos do vinho

Levedura	Teor alcoólico (%)
Sem levedura	0,0
Fatec	4,54
Usina A	3,04
Usina B	2,62
Usina C	3,94

CONCLUSÕES

Foi possível verificar que ambos extratos mostraram ser efetivos em baixas dosagens para amostras bacterianas isoladas de processos fermentativos diferentes, apresentando CIM entre 2,5 mg.mL⁻¹ a 0,156 mg.mL⁻¹. Na padronização dos métodos de controle no processo fermentativo foi possível definir a amostra de levedura isolada da Usina C para a continuidade dos estudos, a qual dentre as amostras industriais resultou em obtenção de maior teor alcóolico (3,94%). Os resultados foram animadores, porém ainda necessitam de estudos para viabilizar a obtenção de um antibacteriano natural para uso no setor sucroenergético.

REFERENCIAS

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

CTC. **Manual de métodos de análises para açúcar**. 1th ed., CTC: Piracicaba, 2005.

SANTOS, R. D. C.; BONAMIN, F.; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; ZANATTA, A. C.; RODRIGUES, C. M.; TAMASHIRO, J. Byrsonima intermedia A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 11121123, 2019.