

ALTERNATIVA NATURAL PARA O CONTROLE CONTAMINANTES NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Michele Célico da Silva¹;
Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno²;
Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri Salaro³

Aluna do CST em Biocombustíveis; email: michelecelico2015@gmail.com¹
Professor da FATEC Nilo De Stéfani - Jaboticabal; leonardomadaleno@fatecjaboticabal.edu.br²
Professora da FATEC Nilo De Stéfani - Jaboticabal; email: marifrigieri@fatecjaboticabal.edu.br³

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 elaborado o presente projeto, o qual busca a redução da população microbiana sem, no entanto, alterar o rendimento do processo fermentativo e, ainda promovendo fermentações mais puras com a redução do uso de antibióticos, os quais acarretam gastos excessivos e sérios problemas ambientais. Alguns extratos vegetais apresentando anteriormente atividade antibacteriana com bactérias padrões e com microorganismos isolados do processo fermentativo no laboratório da Fatec, foram testados quanto à atividade antimicrobiana em micro-organismos isolados de três unidades sucroenergéticas parceiras, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade dos resultados verificados. Os ensaios foram realizados com as plantas do cerrado *Astronium fraxinifolium*, *Byrsonima intermedia* e *Myrcia bella*. Além do extrato hidroalcólico também foi verificada a possibilidade do uso do extrato aquoso e a utilização de água como solvente, com a finalidade de aliar o baixo custo à facilidade de solubilização, tornando o uso mais atrativo para o setor sucroenergético. Foi possível observar que tanto os extratos aquosos quanto os hidroalcolicos apresentam solubilidade em água e foram capazes de inibir as amostras bacterianas testadas. A continuidade do estudo será importante para a avaliação dos extratos vegetais nas etapas do processo industrial.

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. 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 será armazenado em refrigeração em frasco âmbar. Para as análises, os extratos vegetais serão solubilizados em água. A determinação da solubilidade em água foi realizada transferindo determinada quantidade dos extratos para tubo de ensaio ou erlenmeyer onde foram adicionados volumes sucessivos de solvente, exatamente medidos, utilizando o agitador mecânico (vórtex) para completa homogeneização e solubilização das amostras. Em seguida, foi centrifugada uma alíquota por 5 minutos a 100 rpm para confirmação da

ausência de material suspenso. A solubilidade foi expressa conforme os termos descritivos da Farmacopéia Brasileira 5ª edição.

Os contaminantes microbianos foram isolados à 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 absorvância 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 microcentrifugas resistentes a baixas temperaturas (criotubos). Os micro-organismos foram estocados em *ultrafreezer* até o momento de utilização. A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos foi avaliada método *hole plate* de difusão em ágar. Para os ensaios os micro-organismos foram crescidos em caldo *Mueller-Hinton* (extrato bovino 2g/L, cidrolizado ácido de caseína 17,5g/L e amido 1,5g/L) até que a cultura atingir a fase exponencial, e posteriormente diluídos até densidade ótica correspondente ao padrão 0,5 da escala de *Mac-Farland* (OD620=0,10). Após isso, 100 µL da suspensão microbiana foram espalhados com alça de *Drigalsky* em placas de ágar *Mueller Hinton* (Caldo anteriormente descrito adicionado de 2% de ágar). Em seguida furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura foram feitos no ágar e 30 µL dos extratos (150mg/mL) foram adicionados. Como controles foram utilizados água e Amoxicilina (1µg/µL). Todos os testes foram realizados em triplicata. A sensibilidade ao extrato foi verificada pela formação de zonas (circunferências) sem crescimento, denominadas halos de inibição do crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a preparação dos extratos vegetais e verificação da solubilidade em água (Tabela 1) foi realizado o teste de atividade antimicrobiana para os micro-organismos padrões (Tabela 2) e para os isolados do processo fermentativo (Tabela 3).

Tabela 1 - Solubilidade dos extratos vegetais em termos descritivos

Extrato vegetal	Solubilidade observada		Termo descritivo
		(mg/mL)	
<i>A. fraxinifolium</i> Pós chuva	EtOH	1:200	Pouco solúvel
	Aquoso	1:40	Ligeiramente solúvel
<i>B. intermedia</i>	EtOH	1:150	Pouco solúvel
	Aquoso	1:20	Solúvel
<i>M. bella</i>	EtOH	1:100	Ligeiramente solúvel
	Aquoso	1:20	Solúvel

Tabela 2 – Halos de inibição obtidos para micro-organismos padrões (mm)

Amostra	Extrato	Halos obtidos	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>A. fraxinifolium</i>	EtOH	11,3	10,3
	Aquoso	10,7	9,0
<i>B. intermedia</i>	EtOH	12,0	11,0
	Aquoso	13,3	11,0
<i>M. bella</i>	EtOH	12,0	11,3
	Aquoso	10,7	10,7

*Não ocorreu formação de halos ou apresentaram halos < 7mm.

Tabela 3 – Halos de inibição obtidos para micro-organismos isolados (mm)

Amostra	Extrato	Halos obtidos			
		FATEC	Usina A	Usina B	Usina C
<i>A. fraxinifolium</i>	EtOH	10,0	11,3	11,0	11,7
	Aquoso	9,7	9,7	9,7	11,0
<i>B. intermedia</i>	EtOH	11,0	11,6	9,6	10,3
	Aquoso	12,3	12,6	10,6	12,6
<i>M. bella</i>	EtOH	13,0	10,3	10,0	12,6
	Aquoso	11,6	11,3	10,3	11,0
Controle	Água	*	*	*	*

*Não ocorreu formação de halos ou apresentaram halos < 7mm.

Foi possível observar que tanto os extratos aquosos quanto os hidroalcóolicos apresentam solubilidade em água (Tabela 1).

Os extratos de *Astronium fraxinifolium* apresentaram inibição dos dois micro-organismos padrões, sendo que para *S. aureus* apresentaram halo de inibição superior ao apresentado para *E. coli* (Tabela 2). Salvat, et. al., 2004, estudando extrato de *A. balansae* observou maior atividade em *S. aureus* do que em *E. coli*. Foi possível observar também a inibição dos quatro grupos de micro-organismos isolados (Tabela 3). Em todas as análises empregando-se essa espécie vegetal foi verificado que o extrato hidroalcólico mostrou-se mais efetivo. A ação antimicrobiana está observada em concordância com estudos de outras espécies do gênero *Astronium*, as quais mostraram potencial antimicrobiano (SALVAT, et. al., 2004; COSTA, et. al., 2010).

O extrato de *Byrsonima Intermedia*, apresentou maior ação sobre a bactéria *S. aureus* em relação à *E. coli*, porém a ação foi mais efetiva para o extrato aquoso (Tabela 2). Essa maior efetividade do extrato aquoso foi novamente observada sobre os quatro grupos de micro-organismos isolados (Tabela 3), apresentando os maiores valores de halo obtido entre todas as espécies vegetais avaliadas. Santos et al., 2018, utilizando extrato metanólico deste vegetal também observou a presença de ação antimicrobiana nos mesmos micro-organismos padrões utilizados no presente estudo.

A atividade antimicrobiana observada pode ser favorecida pela presença de flavonoides, taninos e saponinas evidenciadas nos extratos de *A. fraxinifolium* e *Byrsonima intermedia* (CARDOSO et. al., 2014).

Para o extrato de *Myrcia bella* foi possível verificar que também foi mais ativo para inibir o crescimento da bactéria padrão *S. aureus* (Tabela 2) e revelou ação nos quatro grupos de micro-organismos isolados (Tabela 3). Jesus et al., 2016, estudando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Myrcia ovata* observou também maior atividade em *S. aureus* que em *E. coli*. Flavonóides, glicosídeos e ácidos fenólicos foram evidenciados por Saldanha et al. 2013, na espécie *M. bella*. Santos et. al., 2018, também verificou atividade antimicrobiana de extratos hidroalcólicos de *M. bella* e de outras espécies dentro do mesmo gênero e concluiu que a atividade observada está intimamente relacionada com a composição fenólica dessas plantas.

CONCLUSÕES

Foi possível observar que tanto os extratos aquosos quanto os hidroalcóolicos apresentam solubilidade em água e foram capazes de inibir as amostras bacterianas testadas. A continuidade do estudo será importante para a utilização dos extratos vegetais nas etapas do processo industrial, como substituinte dos antibióticos utilizados atualmente.

REFERENCIAS

CARDOSO, Cássia Regina Primila et al. Controle de qualidade preliminar de *astronium fraxinifolium*, uma planta promissora do cerrado brasileiro. *Ciência & Tecnologia Fatec-JB*, v. 6, n. 1, 2014.

COSTA, Edja Maria Melo de Brito et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

JESUS, Isabela Cristina et al. *Myrcia ovata* Cambessedes essential oils: A proposal for a novel natural antimicrobial against foodborne bacteria. *Microbial Pathogenesis*, v. 99, p. 142-147, 2016.

SALDANHA, Luiz et al. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, 2013.

SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*, v. 11, n. 2-3, p. 230-234, 2004.

SANTOS, Catarina et al. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. *Molecules*, v. 23, n. 5, p. 986, 2018.