

CONTROLE MICROBIOLÓGICO NATURAL: POTENCIALIDADES NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

FRIGIERI, M. C.

Fatec Jaboticabal – Laboratório de Bioprocessos
mariana.salaro01@fatec.sp.gov.br

Natural microbiological control: potentials in bioethanol production

Eixo Tecnológico: Produção industrial/Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Resumo

O controle microbiológico do processo de obtenção de bioetanol sempre foi um desafio por se tratar de um processo envolvendo microrganismos diferentes: os produtores (levedura selecionada) e os invasores (contaminantes), onde os invasores devem ser controlados de forma que esse controle não atrapalhe a ação dos produtores. A presença descontrolada de contaminantes pode inviabilizar a produção devido à competição pela matéria prima além da produção de substâncias inibitórias, alterações nas condições ideais do processo, consumo do produto entre outras situações. O controle geralmente é realizado com a utilização de ácido sulfúrico e, em casos mais extremos com o uso de antibióticos. Atualmente devido a diversas preocupações econômicas e ambientais, como resíduos nas células de levedura, estímulo à resistência bacteriana e disposição no ambiente, alternativas menos agressivas e mais atraentes economicamente tem sido foco de pesquisas. Neste sentido, o grupo de estudo em Controle Microbiológico Natural (COMINAT) da Fatec Jaboticabal analisa extratos vegetais como fontes de bioativos. No momento está sendo avaliado a ação específica em bactérias e leveduras isoladas diretamente de processos fermentativos industriais de extratos vegetais padronizados disponíveis comercialmente (como na área de saúde, alimentícia, agropecuária etc), porém com uma nova possibilidade de aplicação. A avaliação está sendo realizada pelo método hole plate, utilizando os microrganismos padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* como controle de atividade. Os extratos foram selecionados com base na literatura, totalizando 9 potenciais candidatos, com a possibilidade de desenvolver um produto de baixo custo, solúvel e de manipulação segura, sendo que até o momento 4 foram avaliados. Todos revelaram ação antibacteriana, sem ação nas leveduras, porém apenas um extrato revelou atividade específica contra contaminantes do processo industrial, necessitando de mais estudos para comprovar a ação. A ação antimicrobiana não específica dos extratos avaliados pode ser explorada para desenvolvimento de saneantes naturais.

Palavras-chave: *Antimicrobiano, Biocombustíveis, Fermentação, Saneantes.*

Abstract

The microbiological control of the process of obtaining bioethanol has always been a challenge when dealing with a process involving different microorganisms: the producers (desired yeast) and the invaders (contaminants), where the invaders must be controlled in a way that this control does not disturb the producer action. The uncontrolled presence of contaminants can make production unfeasible due to competition for raw materials, in addition to the production of inhibitory substances, changes in ideal process conditions, product consumption, among other situations. Control is usually done with the use of sulfuric acid and, in more extreme cases, with the use of antibiotics. Currently, due to various economic and environmental issues, such as residues in yeast cells, stimulation of bacterial resistance and disposal in the environment, less aggressive and more economically interesting alternatives have been the focus of research. In this sense, the study group on Natural Microbiological Control (COMINAT) at Fatec Jaboticabal analyzes plant extracts as sources of bioactives. At the moment, the specific action on bacteria and yeasts isolated directly from industrial fermentation processes of commercially available standardized plant extracts is being evaluated (such as in the area of health, food, agriculture, etc.), but with a new possibility of application. The evaluation is being carried out using the hole plate method, using the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* standards as an activity control. The extracts were selected based on the literature, totaling 9 potential candidates, with the possibility of developing a low cost, soluble and safe handling product, and so far 4 have been evaluated. All showed antibacterial action, without action on yeasts, but only one extract showed specific activity against industrial process contaminants, requiring further studies to prove the action. The non-specific antimicrobial action of the evaluated extracts can be explored for the development of natural sanitizing agents.

Key-words: Antimicrobial, Biofuels, Fermentation, Sanitizing.

1. Introdução

A produção de bioetanol pode sofrer diversas interferências, sendo que a interferência microbiológica é uma grande preocupação e um desafio por se tratar de um processo envolvendo microrganismos diferentes: os produtores (levedura selecionada) e os invasores (contaminantes), onde os invasores devem ser controlados de forma que esse controle não atrapalhe a ação dos produtores. A presença descontrolada de contaminantes pode inviabilizar a produção devido à competição pela matéria prima além da produção de substâncias inibitórias, alterações nas condições ideais do processo, consumo do produto entre outras situações que diminuem o rendimento fermentativo, sendo necessárias ações de controle microbiológico para que o processo possa ser efetivo [1]. O controle geralmente é realizado com a utilização de ácido sulfúrico e, em casos mais extremos de contaminação são utilizados os antibióticos [2], porém esse uso tem sido questionado devido a diversas preocupações econômicas e ambientais como resíduos nas células de levedura, estímulo à resistência bacteriana e disposição no ambiente [3, 4].

A possibilidade de encontro de formas alternativas de controle tem despertado diversos pesquisadores buscarem nas fontes menos agressivas e mais atraentes economicamente como é o caso dos extratos vegetais [1]. O lúpulo (*Humulus lupulus*) tem sido o mais utilizado na indústria de bioetanol [5].

Os produtos naturais derivados de vegetais são atrativos devido a facilidade e o custo de obtenção, além de possuírem uma infinidade de moléculas químicas bioativas [6] e diversos vegetais apresentam-se eficazes frente a bactérias resistentes à antibióticos [7].

Neste sentido, o grupo de estudo em Controle Microbiológico Natural (COMINAT) da Fatec Jaboticabal analisa extratos vegetais como fontes de bioativos para controle microbiológico, principalmente, na produção de bioetanol [8, 9, 10].

No momento está sendo avaliado a ação específica em bactérias e leveduras isoladas diretamente de processos fermentativos industriais de extratos vegetais padronizados disponíveis comercialmente (como na área de saúde, alimentícia, agropecuária etc), com a possibilidade de desenvolver um produto de características desejáveis (baixo custo, solúvel, manipulação segura, inóculo ao meio ambiente etc) como uma forma alternativa de controle microbiológico.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Na realização do experimento estão sendo utilizados extratos comerciais solúveis obtido a partir do método de secagem por Spray Drying. Até o momento foram avaliados extratos de *Nasturtium officinale*, *Beta vulgaris*, *Myrciaria cauliflora* e *Hylocereus undatus*.

Para avaliação microbiológica foram utilizados microrganismos padrões *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) e também um combinado de leveduras fermentativas e contaminantes bacterianos do processo fermentativo obtidos a partir do material

da cuba de tratamento do fermento de três unidades sucroenergéticas diferentes da região de Jaboticabal (Usinas A, B e C) [9].

2.2. Metodologia

A seleção dos extratos foi feita com base na literatura e na avaliação da disponibilidade comercial.

A solubilidade em água foi confirmada [9] e indicada em termos descritivos [11].

Os microrganismos foram isolados utilizando meios específicos para bactérias e leveduras [9]. A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos foi avaliada método hole plate ou difusão por poço [12, 13]. O solvente de solubilização foi utilizado como controle. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 48h de incubação à 32°C os halos obtidos foram medidos, sendo considerado positivo halos maiores que 7mm.

3. Resultados e Discussão

A análise dos extratos segundo o padrão de solubilidade [11] revelou serem facilmente solúvel (Tab. 1), resultado muito importante pela facilidade de aplicação, homogeneização no processo e remoção com possibilidade diminuída de aderência nos equipamentos, sendo assim possível dar continuidade aos ensaios de atividade antimicrobiana.

Tab. 1 - Solubilidade do extrato vegetal em termos descritivos

Extrato vegetal	Solubilidade observada (mg/ml)	Termo descritivo
<i>Nasturtium officinale</i>	1:2	Facilmente solúvel
<i>Beta vulgaris</i>	1:3	Facilmente solúvel
<i>Myrciaria cauliflora</i>	1:3	Facilmente solúvel
<i>Hylocereus undatus</i>	1:2	Facilmente solúvel

Fonte: Elaboração própria

Na avaliação antimicrobiana foi possível observar que os extratos não inibiram o crescimento das leveduras produtoras, sendo esse resultado fundamental para o prosseguir os experimentos, uma vez que, o produto a ser utilizado no processo de produção de bioetanol deve ser inócuo às leveduras, ou seja, não comprometer a viabilidade e o processo metabólico. Diversos autores que também observaram atividade antimicrobiana, dos extratos em questão, usando métodos de difusão em poço ou em disco, sendo atividade antifúngica não foi observada [14] em consonância com os dados obtidos pelo grupo COMINAT.

Nasturtium officinale, *Hylocereus undatus* e *Myrciaria cauliflora* não apresentaram efeito inibitório em bactérias dos processos industriais, porém apresentaram efeito inibitório contra microrganismos padrões de acordo com a literatura [15, 16, 17, 18, 19]. A ação antimicrobiana não específica dos extratos avaliados pode ser explorada para desenvolvimento de saneantes naturais. *Beta vulgaris* apresentou ação sobre o microrganismo padrão gram positivo e efeito inibitório sobre as bactérias isoladas de uma unidade produtora específica, tendo potencial para ser utilizado como controle microbiano específico, uma vez que os

principais contaminantes do processo fermentativo são gram positivos. Assim, novos estudos serão realizados para comprovar essa ação. Um resumo das observações de cada extrato avaliado pode ser verificado na Tab. 2.

Tab. 2 - Resultados obtidos na avaliação dos extratos vegetais

Extrato	Ação antimicrobiana			
	Leveduras produtoras	Bactérias processo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Nasturtium officinale</i>	-	-	+	+
<i>Beta vulgaris</i>	-	+	+	-
<i>Myrciaria cauliflora</i>	-	-	+	-
<i>Hylocereus undatus</i>	-	-	+	+

Fonte: Elaboração própria

4. Considerações finais

Os extratos avaliados revelaram ação em bactérias padrões de atividade antibacteriana e não alteraram o crescimento das leveduras produtoras, característica desejável para o controle microbiológico na produção de bioetanol, porém apenas um extrato revelou atividade específica contra contaminantes do processo industrial, necessitando de mais estudos para comprovação. A ação antimicrobiana não específica dos extratos avaliados pode ser explorada para desenvolvimento de saneantes naturais.

Referências

- [1] CARVALHO, A. J. L. et al. Produção de bioetanol e controle microbiológico do processo, In: **Microbiologia: Clínica, Ambiental e Alimentos**. Atena Editora, 2021. p. 1-388-416.
- [2] MUTHAIYAN, A. et al. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351-370, 2011.
- [3] FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica. **Bioenergia em Revista**, v. 3, n. 2, p. 29-37, 2013.
- [4] BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.
- [5] CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 80, 2018.
- [6] ANAND, U. et al. A review on antimicrobial botanicals, phytochemicals and natural resistance modifying agents from Apocynaceae family: Possible therapeutic approaches against multidrug resistance in pathogenic microorganisms. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 51, p. 100695-100695, 2020.

- [7] KUBILIENE, L. et al. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 165, 2018.
- [8] MADALENO, L. L. et al. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. **Científica**, v. 44, n. 2, p. 226–234, 2016.
- [9] CARVALHO, A. J. L. et al. Potential of *byrsonima intermedia* in isolates from the industrial fermentation process, **International Journal of Biological and Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2022.
- [10] GONÇALVES, L. B. et al. Isolates from industrial fermentative processes would be sensitive to extracts of *Myrcia bella*?. **Journal of Agricultural Sciences Research**. v. 2, p. 2-9, 2022.
- [11] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 5a edição, v. 2, p. 1-523, 2010.
- [12] SILVA, D. M. Efeito de extratos vegetais e antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina. 2012. 45p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.
- [13] BONA, E. A. M. D. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.
- [14] KUMAR, S.; BROOKS, M. S. Use of red beet (*Beta vulgaris* L.) for antimicrobial applications—a critical review. **Food and bioprocess technology**, v. 11, p. 17-42, 2018.
- [15] KOOCHAK, H.; SEYYEDNEJAD, S. M.; MOTAMEDI, H. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 3, p. 180-184, 2010.
- [16] NURMAHANI, M. M. et al. Antibacterial property of *Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus* peel extracts. **International Food research journal**, v. 19, n. 1, 2012.
- [17] ERCAN, L.; DOĞRU, M. Determination of Antimicrobial Activity of *Nasturtium officinale* and Its Content of Volatile Organic Compounds and Fatty Acids. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi**, v. 25, n. Ek Sayı 1, p. 11-21, 2022.
- [18] KARIM, A.; SYARTIKA, Y.; NURTJAHJA, K. Antibacterial Activity of Watercress (*Nasturtium Officinale*) against *Staphylococcus Aureus*. In (2022). In **Proceedings of the 1st International MIPAnet Conference on Science and Mathematics (IMC-SciMath 2019)**, p. 552-554.
- [19] ZAKARIA, Nik Nur Azwanida et al. Antioxidant and antibacterial activities of red (*Hylocereus polyrhizus*) and white (*Hylocereus undatus*) dragon fruits. **Journal of Tropical Resources and Sustainable Science (JTRSS)**, v. 10, n. 1, p. 9-14, 2022.