

CONTROLE MICROBIOLÓGICO ALTERNATIVO

MARIANA CARINA FRIGERI SALARO¹

¹Fatec Jaboticabal - Laboratório de Bioprocessos
mariana.salaro01@fatec.sp.gov.br

Alternative Microbiological Control

Eixo Tecnológico: *Produção Industrial*

Resumo

A presença descontrolada de contaminantes no processo de obtenção de bioetanol pode inviabilizar a produção devido à competição pela matéria prima, produção de substâncias inibitórias, alterações nas condições ideais do processo, consumo do produto entre outras situações, exigem intervenções para que o processo possa ser efetivo. No entanto, o controle da interferência microbiológica não é uma tarefa simples, sendo necessário controlar contaminantes e não prejudicar a ação do microrganismo produtor. O grupo de estudo em Controle Microbiológico Natural (CoMiNat) da Fatec Jaboticabal tem atuado no controle alternativo ao uso de antibióticos, com possibilidade do emprego de extratos vegetais. Objetivo do estudo foi verificar a ação específica dos extratos vegetais em bactérias e leveduras isoladas diretamente de processos fermentativos industriais e inespecífica utilizando microrganismos padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A ação antimicrobiana não específica dos extratos avaliados foi explorada para desenvolvimento de produtos (etanol gel 70%, sabonete em barra e líquido). Foi realizado o método hole plate empregando extratos vegetais disponíveis comercialmente e obtidos por maceração. Os extratos avaliados exibiram característica desejável para o controle microbiológico na produção de bioetanol pois não alteraram o desenvolvimento das leveduras produtoras. Dois extratos revelaram atividade específica contra contaminantes do processo industrial, necessitando de mais estudos para comprovação. Os produtos desenvolvidos com extratos possuindo ação não específica revelaram potencial antibacteriano, porém a confirmação da ação, características e estabilidade dos produtos ainda necessitam de verificação.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Contaminação Microbiana, Extratos Vegetais, Fermentação.

Abstract

The uncontrolled presence of contaminants in the bioethanol production process can make production unfeasible due to competition for raw material, production of inhibitory material, changes in ideal process conditions, product consumption, among other situations, excluding provisions for the process to be effective. However, controlling microbiological interference is not a simple task, and it is necessary to control contaminants and not harm the action of the producing microorganism. The study group on Natural Microbiological Control (CoMiNat) at Fatec Jaboticabal has been working on alternative control to the use of antibiotics, with the possibility of using plant extracts. The objective of the study was to verify the specific action of plant extracts on bacteria and yeasts isolated directly from industrial fermentation processes and nonspecific using standard microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The non-specific antimicrobial action of the extracts evaluated was explored for product development (70% ethanol gel, bar and liquid soap). The hole plate method was performed using commercially available plant extracts obtained by maceration. The evaluated extracts exhibited beneficial characteristics for microbiological control in bioethanol production, as they did not alter the development of the yeasts produced. Two extracts revealed specific activity against contaminants from the industrial process, requiring further studies for verification. The products developed with extracts with specific action did not reveal antibacterial potential, but confirmation of the action, characteristics and stability of the selected products still requires verification.

Key-words: Biofuels, Microbial Contamination, Plant Extracts, Fermentation.

1. Introdução

O processo de produção ocorre por ação de leveduras selecionadas e 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, necessitando de ações para que o processo possa ser efetivo [1]. No entanto, o controle do processo não é tão simples, sendo necessário controlar contaminantes e não afetar a ação do microrganismo produtor. A interferência microbiológica no processo geralmente é abrandada pela utilização de ácido sulfúrico [2], porém níveis críticos de contaminantes necessitam do emprego de antibióticos. O controle microbiológico alternativo tem sido alvo de diversas pesquisas buscando uma produção industrial sustentável minimizando efeitos indesejáveis como resíduos nas células de levedura, estímulo à resistência bacteriana e disposição no ambiente [3, 4]. Diversos vegetais apresentam-se eficazes frente a bactérias resistentes à antibióticos [5] e neste sentido os extratos vegetais representam uma possibilidade menos agressivas e atraentes economicamente,

O grupo de estudo em Controle Microbiológico Natural (CoMiNat) da Fatec Jaboticabal tem atuado na possibilidade do emprego de extratos vegetais no controle microbiológico, principalmente, na produção de bioetanol [6, 7, 8 e 9]. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação específica dos extratos vegetais em bactérias e leveduras isoladas diretamente de processos fermentativos industriais e inespecífica utilizando microrganismos padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Alguns extratos vegetais exibindo ação inespecífica foram explorados no desenvolvimento e/ou melhoramento de produtos (sabonetes, antissépticos e saneantes). Com o estudo da ação inespecífica foi possível o desenvolvimento de Trabalhos de Graduação, participação e apresentação de trabalhos em eventos. O desenvolvimento de produtos também contribui com a divulgação do curso e reconhecimento externo da instituição.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Os extratos vegetais 1 e 2 foram obtidos pelo grupo CoMiNat.. Os extratos vegetais 3, 4 e 5 foram adquiridos comercialmente.

Na avaliação antimicrobiana 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) [7].

2.2. Metodologia

Os extratos vegetais foram produzidos pelo grupo CoMiNat por maceração [10] em água (extração aquosa). Basicamente, os vegetais selecionados foram separados em partes, desidratados, triturados (alguns não necessitaram dessa ação), macerados, filtrados, armazenados ou liofilizados e armazenados. A armazenagem foi em ultrafreezer a -62°C. Na

Anais da VIII Mostra de Docentes em RJ

realização do experimento também foram utilizados extratos comerciais solúveis obtidos a partir do método de secagem por Spray Drying. Os extratos vegetais adquiridos comercialmente foram armazenados a temperatura ambiente. A solubilidade dos extratos em água foi confirmada e indicada em termos descritivos [10].

Na avaliação antimicrobiana foi utilizado o método hole plate ou difusão por poço [11, 12]. 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.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método da microdiluição e a revelação do crescimento foi verificada com resazurina (100µg/mL) [13].

Foram desenvolvidos produtos a partir de extratos vegetais apresentando ação antibacteriana inespecífica (ação somente em microrganismos padrões). Os produtos foram gerados a partir de base comercial. Foram desenvolvidos o etanol gel 70% com 0,1 e 1% de extrato e sabonete em barra e líquido com 0,5% de extrato.

3. Resultados e Discussão

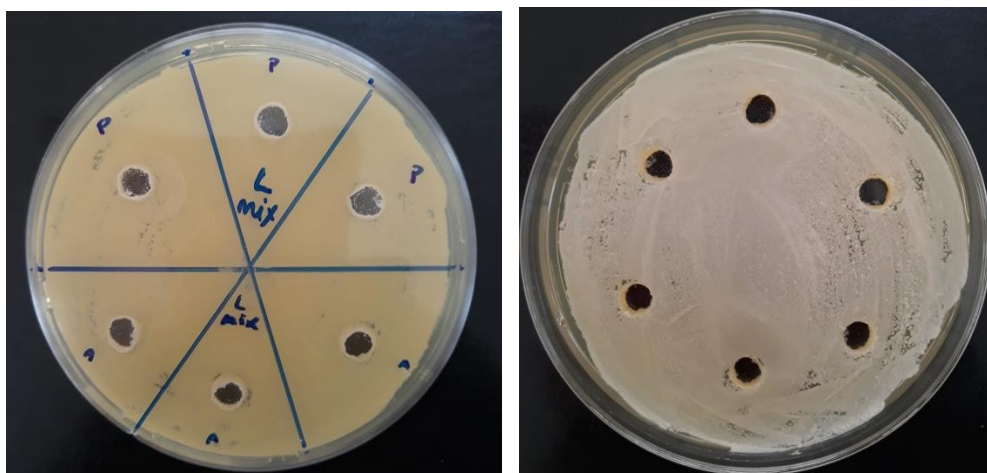
A Tab. 1 apresenta dos resultados obtidos na avaliação antimicrobiana. Foi possível observar que os extratos avaliados foram solúveis e não exibiram halo de inibição sobre o Mix de levedura sendo esse resultado fundamental para o prosseguir os experimentos (Fig. 1). Os extratos que inibiram o desenvolvimento dos isolados bacterianos industriais e não afetaram a ação da levedura produtora foram selecionados para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os extratos inibindo apenas bactérias padrões foram utilizados no desenvolvimento de produtos.

Tab. 1 - Avaliação antimicrobiana

Extrato vegetal	Solubilidade	Inibição de crescimento			
		<i>S. cerevisiae</i>	Isolados bacterianos	Bactérias padrões	
				<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
1	+	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+
4	+	-	-	+	+
5	+	-	-	+	+

Fonte: CoMiNat.

Fig. 1 – Placa resultante da análise em levedura



Fonte: CoMiNat. LMix: Combinado de leveduras (3 unidades industriais).

Quanto à realização da Concentração mínima inibitória (CIM) tivemos problemas devido a coloração dos extratos que interferiram na verificação dos resultados por ser um método colorimétrico. Desta forma, os testes realizados não foram conclusivos necessitando de reavaliação.

Os extratos que apresentaram ação antibacteriana apenas para microrganismos padrões (ação antibacteriana não específica) foram utilizados no desenvolvimento de produtos, sendo que a realização de testes e protótipos originaram Trabalhos de Graduação e participação em eventos científicos/tecnológicos. Na Figura 2 é possível observar exemplos produtos desenvolvidos.

Fig. 2 – Protótipos desenvolvidos



Fonte: CoMiNat

4. Considerações finais

Os extratos avaliados exibiram característica desejável para o controle microbiológico na produção de bioetanol pois não alteraram o desenvolvimento das leveduras produtoras. Dois extratos revelaram atividade específica contra contaminantes do processo industrial, necessitando de mais estudos para comprovação. Os produtos desenvolvidos com extratos

possuindo ação não específica revelaram potencial antibacteriano, porém a confirmação da ação, características e estabilidade dos produtos ainda necessitam de verificação.

Agradecimentos

Ao CPS pelo oferecimento de bolsas do Programa de Monitoria de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – MIDTI.

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] 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.
- [6] MADALENO, L. L. et al. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. **Científica**, v. 44, n. 2, p. 226-234, 2016.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] CARVALHO, A. J. L. et al. *Byrsonima intermedia* and microbial control in bioethanol production. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, v. 22, p. e3395, 2024.
- [10] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 5a edição, v. 2, p. 1-523, 2010.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] ROZATTO, M. R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda. 2012. 100 p. Tese. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, 2012.