



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

PATRÍCIA REGINA KITAKA

**Bioativos naturais: potencial de óleos essenciais
para controle de contaminação bacteriana na
indústria de bioetanol**

CAMPINAS

2020

PATRÍCIA REGINA KITAKA

Bioativos naturais: potencial de óleos essenciais para controle de
contaminação bacteriana na indústria de bioetanol

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Genética e Biologia
Molecular, na área de Microbiologia*

Orientadora: Prof^a Dra. Valeria Maia Merzel

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA PATRÍCIA REGINA KITAKA E
ORIENTADA PELA DRA. VALERIA MAIA
MERZEL.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Kitaka, Patrícia Regina, 1978-
K646b Bioativos naturais : potencial de óleos essenciais para controle de
contaminação bacteriana na indústria de bioetanol / Patrícia Regina Kitaka. –
Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Valeria Maia Merzel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Leveduras. 3. Bactérias produtoras de
ácido láctico. 4. Fermentação. 5. Bioetanol. I. Oliveira, Valeria Maia de, 1966-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Natural bioactive compounds : potential of essential oils to control
bacterial contamination in the bioethanol industry

Palavras-chave em inglês:

Essences and essential oils

Yeast

Lactic acid bacteria

Fermentation

Bioethanol

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Valeria Maia Merzel [Orientador]

Fabiana Fantinatti Garboggini

Tiago Rodrigues e Silva

Franceli da Silva

Maira Christina Marques Fonseca

Data de defesa: 23-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2073-3709>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

Campinas, 23 de Novembro de 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Valeria Maia Merzel

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Dra. Franceli da Silva

Dr. Tiago Rodrigues e Silva

Dra. Maira Christina Marques Fonseca

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,
que com amor e muito apoio me acompanhou
até aqui, celebrando cada passo dado e
entendendo minhas ausências necessárias
para a realização deste trabalho

Em especial aos meus pais, Vera e Álvaro,
pela vida e boas raízes, aos meus queridos filhos Diego e Davi,
luzes da minha vida, que me fazem prosseguir sem cessar
olhando para o futuro, para me tornar a melhor versão de mim mesma
e ao meu amado Ricardo que possibilita o equilíbrio da caminhada
e o nascimento da minha melhor versão a cada dia.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Pela alegria e privilégio de nunca precisar caminhar só, agradeço:

A Deus pela possibilidade de todos os dias ter um novo recomeço com infinitas possibilidades;

À minha amada família, em especial aos meus ancestrais pela vida e amor recebidos;

À minha mãe, Vera, meu maior exemplo de flexibilidade e generosidade, também por seu incentivo, amor, apoio e pelo zelo com os meus tesouros mais caros, nas minhas muitas ausências necessárias para a realização deste trabalho;

Ao meu pai, Álvaro, meu exemplo de constância e perseverança, pelo amor e suporte em cuidar dos meus tesouros mais caros para a realização deste trabalho;

Aos meus amados tesouros Diego e Davi, por darem sentido à minha caminhada;

Ao meu amado Ricardo por todo respeito, apoio, paciência, incentivo e amor que me dedicou durante a realização deste trabalho e por seguir ao meu lado permitindo que eu possa ser a melhor versão possível de mim mesma a cada dia;

Aos meus irmãos e companheiros de caminhada, Thais, Victor e Bruna pelo amor e companhia inigualáveis;

À minha amada e querida América Kitaka Lanza (*in memoriam*) e Odair Lanza por todo amor que recebi;

Aos meus “pequenos” amores Mellany, Caio e Nathan por trazerem para minha vida tanta alegria, amor e intensidade...

... e aos meus eternos “pequenos”, (mas já não tão pequenos) e nunca menos amados: Isabella, Mariana e Lucas Rafael por me mostrarem um prelúdio de quão boa a maternidade pode ser.

Aos meus familiares e amigos, sejam eles próximos ou distantes, que contribuíram para que eu me tornasse quem sou.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), universidade pública, gratuita e de excelência, por toda formação recebida;

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), pela oportunidade e infraestrutura disponibilizada para execução deste trabalho;

Ao Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, meu primeiro *lar científico*, em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura e oportunidades, bem como aos professores que nele atuam com excelência;

Ao Laboratório de Bioprocessos do CPQBA/Unicamp pelo suporte financeiro, em especial à Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta e à Dra. Cláudia Steckelberg que atuaram como coordenadoras da Divisão de Bioprocessos ao longo do desenvolvimento deste projeto;

À minha orientadora, Profa. Dra. Valéria Maia Merzel, pela oportunidade, apoio, amizade e confiança no transcorrer do mestrado que se converteu em doutorado, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico;

À Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta, pela oportunidade de realização deste trabalho de modo concomitante ao meu trabalho na Divisão de Bioprocessos e por permitir que eu pudesse unir e transformar em realidade dois sonhos, o doutorado e a possibilidade de trabalhar com produtos naturais.

Aos membros da banca pela disponibilidade, valiosas correções e sugestões realizadas nesta tese.

Aos queridos companheiros de jornada Klauss e Milene do Laboratório de Bioprocessos, pela grande amizade e parceria em todos esses anos de trabalho, cuja colaboração foi imprescindível para que eu pudesse desenvolver este trabalho, especialmente nos momentos de desânimo;

À Dra. Cláudia Steckelberg pelo apoio e incentivo.

À Agência de Inovação da Unicamp, em especial à Ana Carolina Gonzaga e à Ana Claudia Cavichioli Daidone pelo suporte no processo de depósito da patente;

À Dra. Glyn Mara Figueira por valorizar meu trabalho, dando suporte incondicional e contribuições valiosíssimas na execução deste trabalho;

Às pesquisadoras Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pelo apoio e valiosas contribuições ao longo da execução deste trabalho;

Ao Dr. Adilson Sartoratto por toda ajuda com a identificação da composição química dos óleos essenciais e por todas as ricas sugestões e contribuições;

À Dra. Rosana Goldebeck pela amizade e grande incentivo que me ajudaram a ter ânimo para retomar a pós-graduação após anos de dedicação à maternidade.

À Camila Delarmelina pela disposição e gentileza em me ensinar as técnicas de microdiluição para determinação de MIC e MBC, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Benício Pereira pela presteza e toda ajuda com as plantas medicinais e extração de óleos essenciais, sem os quais esse trabalho não seria possível;

À Dra. Livia Cordi, que com gentileza, auxiliou no depósito de plantas no Herbário da Unicamp (UEC);

Aos técnicos da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) Msc. Viviane Piccin dos Santos, Milena Binatti Ferreira e especialmente, Msc. Túlio de Lucca Capelini pelas conversas encorajadoras, pelo companheirismo, e gentis sugestões.

Às unidades industriais produtoras de etanol pela parceria, que tanto colaboraram para meu crescimento profissional ao longo dos anos;

A todos colegas e alunos contemporâneos do DRM cujo apoio foi inesquecível, em especial às queridas Dra. Daiane Rodrigues Barbosa Belgini e Dra. Milene Barbosa Gomes pela paciência e ajuda fundamental nas análises de identificação das bactérias contaminantes.

Aos meus primeiros orientadores Dr. Domingos da Silva Leite e Dr. Hiroshi Aoyama por guiarem meus primeiros passos na ciência, mostrando-me o valor e a importância da ética científica;

A todos colegas e amigos do CPQBA/UNICAMP pela parceria, companheirismo e agradáveis momentos de convivência e incentivo;

Aos professores e aos Programas de Capacitação da Escola Corporativa da Unicamp (Educorp) e Inglês sem Fronteiras (IsF) da Unicamp por colaborarem com meu desenvolvimento.

À querida Robin Hopps pela amizade, ensinamentos, paciência e incentivo, que permitiram que eu pudesse escrever em outro idioma com segurança. Enfim, minha eterna gratidão a todos que colaboraram direta ou indiretamente com dedicação, colaboração e ensinamentos para a execução deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

***“Se quiser ir rápido, vá sozinho,
mas se quiser ir longe, vá acompanhado”***

Provérbio Africano

***"If you want to go fast, go alone,
but if you want to go far, go together."***

African Proverb

RESUMO

A contaminação por bactérias produtoras de ácido láctico (LAB, do inglês *Lactic Acid Bacteria*) é um dos principais problemas enfrentados no processo de fermentação alcoólica em usinas de bioetanol, uma vez que reduz o rendimento do processo e traz perdas econômicas significativas. As LAB, além de competirem com as leveduras (*Saccharomyces sensu stricto*), responsáveis pela produção do bioetanol, também secretam metabólitos inibitórios prejudiciais às leveduras.

O uso de antibióticos para o controle de LAB na fermentação alcoólica tem sido uma prática constante na indústria de bioetanol, apesar de gerar resíduos potencialmente nocivos, que resultam na disseminação de linhagens de bactérias resistentes que acarretam problemas ambientais e a saúde humana. Assim, no intuito de estabelecer processos ecologicamente mais amigáveis e sustentáveis, é indispensável a substituição dos antibióticos utilizados na indústria de bioetanol. Para tanto, é preciso substâncias eficazes que não se tornem resíduos nocivos, o que faz dos produtos naturais uma alternativa promissora para este tipo de substituição.

No Brasil, a biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, onde muitas plantas vêm sendo amplamente reconhecidas por suas propriedades antimicrobianas ao longo dos séculos. Princípios ativos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas com aplicações biotecnológicas podem ser obtidos a partir de diferentes partes das plantas. Este fato motiva a investigação de produtos naturais provenientes de plantas, como óleos essenciais (OE), que possam ser utilizados no controle da contaminação por LAB no processo de fermentação alcoólica. Os OE possuem um alto potencial biotecnológico para esta substituição pois muitos apresentam atividade antimicrobiana para diversas bactérias. Em adição, são substâncias consideradas seguras, uma vez que são utilizados na indústria de alimentos e não produzem resíduos nocivos ao ambiente e à saúde humana.

Desta forma, propomos neste trabalho, a triagem, caracterização e avaliação do efeito antimicrobiano de OE obtidos preferencialmente a partir de plantas da flora brasileira, que tenham atividade biológica seletiva, ou seja, inibitórios e/ou microbicidas para LAB e inertes para leveduras do gênero *Saccharomyces sensu stricto*, com potencial para substituir os antibióticos no controle de contaminação da fermentação de bioetanol.

Palavras-Chave: Óleo essencial; *Saccharomyces cerevisiae*; Bactérias Ácido-Lácticas; Fermentação Alcoólica; Bioetanol.

ABSTRACT

The use of antibiotics to control bacterial contamination in alcoholic fermentation process has been a common practice in the industry. Lactic acid bacteria (LAB), the main group of contaminating bacteria in the bioethanol fermentation process, are considered a huge problem to the process, since they are capable to thrive under the conditions found in fermentation tanks, competing with yeasts (*Saccharomyces sensu stricto*) for the sugar to be fermented (sugarcane juice or molasses). Furthermore, they secrete substances that may inhibit the development of yeasts in the process, compromising fermentation yield.

In order to prevent LAB and limit production losses, the ethanol industry makes continuous use of the same antibiotics consumed by humans, such as, penicillin, erythromycin and virginiamycin. This practice can lead to the selection of resistant bacteria and contributes to the growing concern about the effects of the indiscriminate use of antibiotics in human health. In addition, traces of these antibiotics may be found in ethanol byproducts, such as dry yeast, which is sold as source of protein for animal feed preparation. Antibiotic traces in Brazilian dry yeast have caused frequent rejection of this product by the European Community.

Hence, the replacement of antibiotics in fermentation process for bioethanol production is of paramount importance and should entail the use of substances that do not turn into harmful residues to the environment and, consequently, a hazard to human health. Essential oils (EO) are considered an important source of substances with antimicrobial activity. Thus, these oils may become a promising alternative to replace antibiotics in the control of lactic acid bacteria (LAB). In this context, the aim of this study was to screen and characterize EO obtained preferentially from Brazilian plants and showing selective activity, exhibiting inhibitory and/or biocidal activity against LAB and being inert to yeasts of the genus *Saccharomyces sensu stricto*, with potential to replace antibiotics in the contamination control of bioethanol fermentation.

Key words: Essential Oils; *Saccharomyces cerevisiae*; Lactic Acid Bacteria; Fermentation; Bioethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sankofa	20
Figura 2: Disseminação de antibióticos e resistência a antibióticos na agricultura, comunidade, hospitais, tratamento de águas residuais e ambientes associados.	30
Figura 3: O Grito, de Edvard Munch (1895)	38
Figura 4: Frequência de uso/adição de antibióticos nos processos fermentativos para produção de etanol combustível em unidades industriais brasileiras. N=10	44
Figura 5: Óleos Essenciais.....	48
Figura 6: Foto da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), CPQBA/UNICAMP, gentilmente cedida pela Divisão de Agrotecnologia/CPQBA.	69
Figura 7: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
Figura 8: Estados em que se situam as unidades industriais onde as linhagens de leveduras nativas foram isoladas.....	81
Figura 9: <i>Lactobacillus paracasei</i>	136
Figura 10: Mapa de localização dos estados brasileiros onde estão situadas as unidades industriais nas quais os contaminantes bacterianos foram isolados.	143
Figura 11: Estimativa da concentração do DNA genômico das linhagens de LAB em gel de agarose 0,8%.....	144
Figura 12: Análise filogenética da sequencias parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação para produção de bioetanol afiliados ao gênero <i>Lactobacillus</i> e micro-organismos recuperados da base de dados Genbank.	145
Figura 13: Análise filogenética das sequências parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação alcoólica afiliados aos gêneros <i>Staphylococcus</i> e à família Leuconostocaceae, juntamente com micro-organismos rec recuperados da base de dados Genbank.	146
Figura 14: Análise filogenética das sequências parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação alcoólica afiliados ao gênero <i>Acetobacter</i> e micro-organismos relacionados recuperados da base de dados Genbank.	147
Figura 15: Eficácia da atividade dos óleos essenciais em bactérias ácido-lácticas (LAB). N=37.....	154
Figura 16: Eficácia da atividade bacteriostática de óleos essenciais em linhagens de bactérias ácido lácticas (LAB).....	155

Figura 17: Eficácia da atividade bactericida de óleos essenciais em linhagens de bactérias ácido lácticas (LAB).....	155
Figura 18: Perfil de atividade (bacteriostática ou bactericida) e faixas de atuação dos óleos essenciais	157
Figura 19: Etapas de avaliação dos óleos essenciais.....	160
Figura 20: Equação de Van den Dool e Kratz utilizada para calcular o índice aritmético (IA) (Adaptado de Adams, 2007).	162
Figura 21: Concentração de ácido láctico em cada uma das condições dos ensaios fermentativos.	175
Figura 22: Concentração de ácido acético em cada uma das condições dos ensaios fermentativos.	176
Figura 23: Blend de óleos essenciais.	179

LISTA DE TABELAS

🔥 Tabela 1: Lista de Óleos Essenciais (OE).	70
🔥 Tabela 2: Triagem de Óleos Essenciais em Leveduras Industriais.	72
🔥 Tabela 3: Linhagens de leveduras <i>Saccharomyces sensu stricto</i> utilizadas.	82
🔥 Tabela 4: Meios de cultivo e manutenção dos micro-organismos.	139
🔥 Tabela 5: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Aloysia gratissima</i> (1).	163
🔥 Tabela 6: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper abutiloides</i> (9).	164
🔥 Tabela 7: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper aduncum</i> (10).	164
🔥 Tabela 8: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Vetiveria zizanioides</i> (12).	165
🔥 Tabela 9: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (15).	165
🔥 Tabela 10: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Pilocarpus microphyllus</i> (28)	166
🔥 Tabela 11: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper caldense</i> (34)	166
🔥 Tabela 12: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper cernuum</i> (35).	167
🔥 Tabela 13: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper marginatum</i> (36).	167
🔥 Tabela 14: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper mollicomum</i> (37)	168
🔥 Tabela 15: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Piper ovatum</i> (38)	168
🔥 Tabela 16: Perfil Químico do Óleo Essencial de <i>Photomorphe umbellata</i> (40).	169
🔥 Tabela 17: Efeito da adição de antibióticos e biocidas no rendimento em etanol em fermentação alcoólica.	177

LISTA DE QUADROS

🔥 Quadro 1: Questões utilizadas na entrevista com as unidades industriais para avaliação das estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos.	42
🔥 Quadro 2: Respostas das questões objetivas da entrevista fornecidas pelas unidades industriais a respeito das estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos.....	43
🔥 Quadro 3: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias lácticas (LAB) isoladas de processo industrial de produção de bioetanol.....	153
🔥 Quadro 4: Atividade antimicrobiana de 11 Composições de óleos essenciais (Blends) em bactérias contaminantes	171
🔥 Quadro 5: Exemplo de análise comparativa entre os resultados de atividade do blend em relação aos resultados obtidos com os óleos essenciais isoladamente.....	172
🔥 Quadro 6: Exemplo de avaliação comparativa entre Blends de óleos essenciais. ...	173
🔥 Quadro 7: Resultado da avaliação comparativa do blend B16.	173

SUMÁRIO

	PÁGINA
Primeiras Palavras.....	20
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
1.1 Fontes Alternativas de Energia.....	22
1.2 A Indústria de Bioetanol.....	23
1.2.1 Processos Fermentativos.....	24
1.2.2 Contaminação Bacteriana como Desafio.....	24
1.2.3 Estratégias de Controle de Contaminação.....	26
1.2.3.1 Agentes químicos.....	26
1.2.3.2 Bacteriocinas e Antimicrobianos naturais.....	27
1.2.3.3 Bacteriófagos e Endolisinas.....	28
1.2.3.4 Leveduras <i>Killer</i>	28
1.2.3.5 Antibióticos.....	29
1.3 Potencial dos Bioativos Naturais.....	31
1.4 Metabolismo Secundário e Bioativos Naturais.....	32
1.5 Óleos Essenciais.....	34
2. APRESENTAÇÃO DA TESE.....	36
CAPÍTULO 1: Uso de antimicrobianos nos processos de fermentação na indústria de bioetanol: Paradigma atual e desafios.....	38
1.1 Introdução.....	39
1.2 Material e Métodos.....	41
1.3 Resultados e Discussão.....	42
1.4 Conclusões.....	45
1.5 Referências.....	46
CAPÍTULO 2: ÓLEOS ESSENCIAIS.....	48
2.1 Óleos Essenciais.....	49
2.2 <i>Potential Use of Essential Oils in Baker's Yeast</i>	50
2.3 Por que avaliar óleos essenciais para utilização na indústria de bioetanol?.....	67
2.4 Óleos Essenciais Estudados e Critério de Seleção.....	68
2.5 Extração de Óleos Essenciais.....	69
2.6 Avaliação e Triagem de Óleos Essenciais.....	71
2.7 Referências.....	73

CAPÍTULO 3: ATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM LEVEDURAS.....	79
3.1 Introdução.....	80
3.2 <i>Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds</i>	83
3.3 <i>Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds</i>	101
3.4 Conclusões.....	130
3.5 Referências.....	131
CAPÍTULO 4: BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL E ÓLEOS ESSENCIAIS.....	136
4.1 Introdução.....	137
4.2 Bactérias Contaminantes de Processos Fermentativos Industriais para Produção de Bioetanol: Quem são?.....	139
4.2.1 Material e Métodos.....	139
4.2.1.1 Isolamento das Linhagens.....	139
4.2.1.2 Estoque e manutenção das linhagens.....	140
4.2.1.3 Identificação das linhagens.....	140
4.2.1.3.1 Reativação das linhagens.....	140
4.2.1.3.2 Extração de DNA genômico.....	140
4.2.1.3.3 Amplificação e Purificação de Genes RNAr 16S.....	141
4.2.1.3.4 Sequenciamento dos Genes RNAr 16S.....	141
4.2.1.3.5 Análise Filogenética.....	142
4.3 Resultados e Discussão.....	143
4.3.1 Identificação das LAB.....	143
4.4 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais em Bactérias Contaminantes de Processos Fermentativos Industriais para Produção de Bioetanol.....	149
4.4.1 Material e Métodos.....	149
4.4.1.1 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais em Contaminantes Bacterianos (LAB).....	149
4.4.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	150
4.4.1.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) ..	151
4.4.2 Resultados e Discussão.....	152
4.4.2.1 Atividade Antimicrobiana dos OE (MIC /MBC) em LAB.....	152
4.5 Referências.....	158

CAPÍTULO 5: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, BLENDS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E FERMENTAÇÃO USANDO BLEND.....	160
5.1 Perfil Químico dos Óleos Essenciais.....	161
5.1.1 Avaliação da Composição Química: Critério de Seleção.....	161
5.1.2 Material e Métodos.....	161
5.1.2.1 Óleos Avaliados.....	161
5.1.2.2 Análise de Composição Química dos Óleos Essenciais.....	161
5.1.3 Resultados.....	163
5.2. Combinações de Óleos Essenciais – <i>Blends</i>	170
5.3 Ensaio de Fermentação.....	174
5.4 Referências.....	178
CAPÍTULO 6: PATENTE DE INVENÇÃO: <i>COMPOSIÇÕES E SEU USO</i>	179
7. DISCUSSÃO GERAL.....	225
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	235
9. CONCLUSÕES GERAIS.....	236
10. REFERÊNCIAS.....	237
11. ANEXOS.....	252
11.1 Documento de Declaração de Bioética e Biossegurança.....	253
11.2 Documento de Declaração de Direito Autoral.....	254
11.3 Documento de Declaração de Acesso ao Patrimônio Genético e/ou Conhecimento Tradicional Associado	255

PRIMEIRAS PALAVRAS

Sankofa

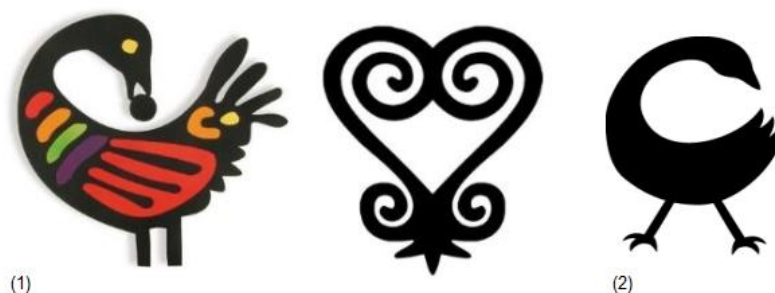


Figura 1: Sankofa

Elaborado pela autora a partir das fontes (1) e (2)

Fonte¹: <https://www.dicionariodesimbolos.com.br/>

Fonte²: Dravet; Oliveira (2017)

“Nunca é tarde para voltar e apanhar o que ficou atrás”

“O termo *Sankofa* se traduz no português, ao pé da letra como “*volte e pegue*” (*san-* voltar, retornar; *ko* – ir; *fa* – olhar, buscar e pegar), mas pode ser elaborado como “nunca é tarde para voltar e apanhar o que ficou para trás. (Dravet; Oliveira, 2017).

Esta palavra-provérbio acompanhada de um desenho-símbolo, constitui um elemento do conjunto ideográfico *Adinkra*, que apesar de não ser um referencial à minha ancestralidade direta, me remete à ancestralidade de todos nós como humanos.

Sankofa não é apenas uma palavra-provérbio acompanhada de um desenho-símbolo *Adinkra* em formato circular, cuja representação pode ser de um pássaro mítico que voa para frente, tendo a cabeça voltada para trás, carregando em seu bico um ovo, o futuro. Este termo tem um simbolismo filosófico cujo significado permeia a ideia da sabedoria de aprender com o passado para construir o presente e o futuro.

Os símbolos *Adinkra* utilizados para representar este provérbio também podem ser desenhos similares a um coração ocidental, mantendo porém, o significado original que expressa a busca de sabedoria em aprender com o passado para entender o presente e moldar o futuro.

Assim como Sankofa possui sua dualidade de representação simbólica, também o é minha trajetória profissional que oscila entre a academia e a vivência industrial e que também se reflete na perspectiva da concepção deste trabalho, que traz o resgate de conhecimentos ancestrais a partir da extração de bioativos de plantas, como o são os óleos essenciais, e a inovação de propor sua aplicação em ambiente industrial, em um nicho mercadológico novo, na tentativa de substituir a utilização de antibióticos sob uma perspectiva mais sustentável.

Pessoalmente, *Sankofa* tem um simbolismo não só de trajetória profissional, de retorno e resgate da vida acadêmica que foi pausada ou modificada em parte da minha história, mas representa um de seus entendimentos mais profundos, que nos ensina sobre a possibilidade de voltar atrás, voltar às nossas raízes para poder realizar nosso potencial para avançar.

Assim, *Sankofa* é também um pouco do meu desenvolvimento pessoal, a realização de uma parte do meu eu, que por vezes acreditei estar perdido, esquecido, privado ou renunciado e que a oportunidade de criação que este projeto possibilitou, de conclusão desta etapa, reavivou o meu “porquê”, e me mostrou que minha inclinação à pesquisa não se limita apenas à profissão, mas é parte de quem eu sou.

E essa auto-identidade pode ser redefinida
e sempre poderá ser resgatada,
por isso: *Sankofa*!

Porque como bem mencionou Friedrich Nietzsche:
“He who has a why to live for can bear almost any how.”

"Aquele que tem um porquê viver,
pode suportar quase qualquer como"
(tradução livre)

Por isso, aqui registro *Sankofa*, para que não nos esqueçamos sobre a possibilidade de voltar atrás, às nossas raízes, para poder realizar nosso potencial no futuro.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Fontes alternativas de energia

A queima de combustíveis fósseis provocada por veículos automotores e atividade industrial, juntamente com o desmatamento, são as principais atividades humanas responsáveis pelo efeito estufa na Terra. O excesso da liberação de gases na atmosfera, especialmente o dióxido de carbono (CO₂), potencializa a ação do efeito estufa. Neste sentido, o uso de fontes alternativas de energia é uma opção para minimizar esta questão (GOLDEMBERG et al., 2008).

A busca por outras fontes de energia para substituição de combustíveis fósseis, como alternativa renovável e menos poluente, tem sido eixo de discussões e pesquisas em todo o mundo (FARRELL et al., 2006).

O acordo estabelecido em 1997 no Japão, com a presença de delegações de mais de 160 países, conhecido como Protocolo de Kyoto, estabeleceu como objetivo a restrição da emissão de CO₂ e outros cinco gases responsáveis pelo efeito estufa. A meta de redução estabelecida teve como principal premissa a substituição de combustíveis fósseis por fontes alternativas de energia (MASTRANDREA; STEPHEN, 2005).

No final de 2009, outra reunião sobre esta temática foi realizada em Copenhague, a Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (COP15), em que a mudança climática foi posta como um dos maiores desafios atuais e foi definido que ações deveriam ser tomadas para manter o aumento de temperatura global para valores abaixo de 2°C, reforçando as metas estabelecidas no protocolo de Kyoto de redução de emissões de gases para as décadas seguintes.

Dez anos depois, a Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas, também conhecida como COP 25, realizada em Madrid, teve como desafio debater pontos do *Emissions Gap Report*, relatório da ONU Meio Ambiente que mostrou a necessidade de cortar emissões em 7,6% ao ano para estabilizar o aquecimento global em 1,5°C.

Em função disso, os últimos anos têm sido caracterizados por um aumento expressivo nos investimentos das nações em pesquisas e desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de fontes alternativas

e renováveis de energia, como por exemplo: bioetanol, biodiesel, 1-butanol, biogás (MISSAWA, 2009).

1.2 A indústria de bioetanol

A busca por fontes de energia renováveis tem no etanol combustível não apenas uma promessa, mas uma realidade que vem se consolidando nas últimas décadas com potencial para substituição, ao menos parcial, dos combustíveis fósseis.

O uso de etanol combustível aumentou significativamente nas últimas duas décadas. Nos Estados Unidos, o aumento da produção deste biocombustível saiu de patamares de 6,4 milhões de litros no ano 2000 para 37 milhões de litros em 2009. Em 2007, o Congresso dos Estados Unidos promulgou o *Energy Independence and Security Act (HR6)*, que estabeleceu a meta de combustível renovável em 136 bilhões de litros de etanol até o ano de 2022.

Aumentos semelhantes na produção têm ocorrido na América Latina e Europa.

No Brasil, este acréscimo vertiginoso também vem sendo notado nas últimas décadas, tendo o país conquistado lugar de destaque no cenário mundial de produção dos biocombustíveis. A exemplo disto podemos observar o acréscimo de volume de etanol produzido nos últimos 20 anos. Na safra de 1999/2000 foram produzidos aproximadamente 13 milhões de litros de etanol, e 20 anos depois, na safra 2019/2020, a produção deste biocombustível ultrapassou os 35 milhões de litros (UNICA, 2020).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de bioetanol de cana-de-açúcar do mundo, produzindo mais de 30 milhões de litros em 2019 (UNICA, 2019; UDOP, 2020).

1.2.1 ***Processos fermentativos***

O processo de produção do etanol industrial ocorre em larga escala a partir de matérias-primas agrícolas por meio de processos fermentativos utilizando leveduras, em que o açúcar é convertido em etanol e dióxido de carbono. Muitas matérias-primas podem ser utilizadas para fornecer o açúcar para a fermentação, incluindo potencialmente qualquer amido ou material celulósico. As matérias-primas mais comumente utilizadas são o milho, sorgo, cana-de-açúcar e beterraba. Como as matérias-primas usadas para a produção de etanol são produtos naturais, apresentam naturalmente muitos micro-organismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Assim, os açúcares presentes nestas matérias-primas são fermentados e destilados em tanques que promovem um ambiente adequado para o crescimento não apenas de leveduras, mas também de bactérias (AMORIM et al, 2011).

No Brasil, o etanol é proveniente majoritariamente da cana-de-açúcar, e é produto da fermentação de açúcares do melaço e do caldo da cana-de-açúcar por leveduras. Como as condições do processo de fermentação comercial não são completamente estéreis, micro-organismos contaminantes estão presentes ao longo do processo produtivo.

A principal consequência da presença de micro-organismos contaminantes nestes tanques, também conhecidos como dornas de fermentação, é a redução da eficiência fermentativa, acompanhada de uma menor produção de etanol e causando prejuízos consideráveis (LUDWIG, et al., 2001).

1.2.2 ***Contaminação bacteriana como desafio***

Nos últimos 40 anos, inúmeros avanços científicos e tecnológicos em microbiologia da fermentação têm contribuído para a evolução da indústria de bioetanol no Brasil. Essas contribuições têm ampliado a compreensão sobre o processo de fermentação a fim de reduzir as condições de estresse para as células de leveduras. Entretanto, a contaminação microbiana permanece como um dos maiores desafios na fermentação para produção de bioetanol (ARUNACHALAM; STEVEN, 2010; AMORIM et al., 2011).

O processo de fermentação alcoólica é altamente susceptível à contaminação por bactérias que competem com as leveduras por nutrientes. Esta competição diminui a conversão de açúcares em etanol pelas leveduras e resulta em redução no rendimento do processo (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Bactérias produtoras de ácido láctico têm sido apontadas como principais contaminantes responsáveis pela redução de rendimento em etanol (MAKANJOULA et al., 1992, CHANG et al., 1995, NARENDRANATH et al., 1997; BISCHOFF et al., 2009). Estes contaminantes estão relacionados às perdas em rendimento devido ao potencial de competição com as leveduras de processo, pois estão adaptados às condições presentes na fermentação alcoólica, além de produzirem ácidos orgânicos indesejáveis.

Enquanto as leveduras fazem uso dos açúcares para a produção do bioetanol, as bactérias, por outro lado, produzem diversos metabólitos, inibindo o processo de fermentação (NARENDRANATH et al., 2001).

As LAB, ou bactérias lácticas, como são comumente conhecidas, são capazes de se desenvolver de forma vigorosa nas condições dos tanques de fermentação. Além de competirem pelos açúcares com as leveduras, podem secretar metabólitos tóxicos, como peptídeos biocidas específicos e ácidos orgânicos, que diminuem o pH do meio e o pH interno das leveduras, inibindo o desenvolvimento das mesmas (OLMSTEAD; WALLINGA, 2009).

Este efeito de inibição das leveduras e aumento na população de bactérias nas dornas de fermentação causam paradas no processo e acarretam perdas significativas nas usinas produtoras de etanol, comprometendo o rendimento do processo (OLIVA- NETO, 1995). Como há perdas consideráveis, a contaminação microbiana no processo de fermentação alcoólica é uma preocupação significativa para indústria de bioetanol em função da limitação na conversão em etanol que os contaminantes acarretam, tendo em vista que uma perda de 1% na produção de etanol representa um impacto financeiro da ordem de milhões de litros de etanol por ano e, conseqüentemente, milhares de dólares (MUTHAIYAN; RICKE, 2010).

Assim, para prevenir a propagação das LAB e limitar as perdas, os produtores de etanol fazem uso de diversas estratégias. Entretanto, a mais

comum é o uso contínuo de antibióticos, dentre os quais estão os mesmos utilizados para tratamento de infecções que afetam a saúde humana, como penicilina, eritromicina e virginamicina (AQUARONE, 1960; BAYROCK, 2003; HYNES, 1997).

1.2.3 ***Estratégias de controle de contaminação***

Diversas abordagens têm sido utilizadas com o intuito de realizar o controle de contaminantes bacterianos nos processos fermentativos para produção de bioetanol. Na sequência são apresentadas algumas estratégias.

1.2.3.1 **Agentes químicos**

Estratégias de controle de contaminação tais como: tratamento ácido, tratamento com amônia (BRODA; GRAJEK, 2009) e peróxido de hidrogênio (MUTHAIYAN; RICKE, 2010) têm sido avaliadas para combater o crescimento microbiano desenfreado indesejável no processo de fermentação alcoólica.

Um dos tratamentos utilizando agentes químicos mais comuns na indústria de bioetanol é o tratamento ácido, onde as células são lavadas com solução diluída de ácido sulfúrico antes e depois da fermentação para redução de contaminantes (BASSO et al., 2008). Segundo Costa e colaboradores (2018), a lavagem com solução de ácido sulfúrico acrescida de 5% de etanol (pH 2,0) pode ser mais efetiva na redução dos contaminantes do que quando comparada apenas com a adição de ácido. Entretanto, a lavagem do fermento com solução ácida e os múltiplos ciclos de células que ocorrem no processo de fermentação no Brasil, podem reduzir a viabilidade das células de leveduras, resultando em um decréscimo de eficiência.

Além do uso de ácidos, o uso de amônia, peróxido de hidrogênio ou uréia também tem sido aplicado para o controle de contaminantes como tratamento de substrato em processos utilizando fermentação de milho e sorgo (BRODA; GRAJEK, 2009; SALVI et al., 2010), o que não se aplica para a realidade dos processos fermentativos brasileiros.

Outra estratégia de controle de contaminantes comumente encontrada na fermentação alcoólica na indústria de bioetanol é o uso de dióxido de cloro (ClO₂). No entanto, este tipo de tratamento é muito sensível à dosagem, isto

é, a concentração para inibição de bactérias varia de 10 a 200 ppm mas concentrações superiores a 50 ppm também afetam leveduras.

Assim, essas abordagens não apresentam resultados viáveis, visto que muitas delas, embora sejam eficazes no combate às bactérias, afetam também as células das leveduras e comprometem o rendimento do processo.

1.2.3.2 Bacteriocinas e antimicrobianos naturais

Compostos antimicrobianos naturais derivados de animais, plantas e micro-organismos têm sido utilizados como tratamento para infecções humanas e controle de contaminantes na indústria de alimentos. Na indústria de produção de bioetanol, no entanto, poucas são as estratégias alternativas aplicadas neste sentido. Muthaiyan e colaboradores (2011) e, mais recentemente, Seo e colaboradores (2020) descrevem algumas iniciativas do uso de antimicrobianos naturais, como é o caso do uso de produtos à base de lúpulo, de hidrolisados lignocelulósicos como agentes antibacterianos e peptídeos conhecidos como bacteriocinas.

Segundo Muthaiyan e colaboradores (2011), os produtos à base de lúpulo são aplicados em processos fermentativos em destilarias que utilizam grãos como matéria-prima, em concentrações que variam de 10 a 50 mg/L. Todavia, o autor aponta que, assim como os antibióticos, esses compostos também podem ser alvo de resistência microbiana.

Outra abordagem interessante apresentada por Seo e colaboradores (2020) é o uso de hidrolisados lignocelulósicos provenientes de biomassa de plantas contendo agentes antibacterianos naturais. Entretanto, o autor aponta que estes compostos apresentam como desvantagem fitoquímicos que mostram um efeito negativo sobre a viabilidade de leveduras.

A última estratégia apresentada dentro deste grupo é o uso bacteriocinas, que são peptídeos secretados principalmente por LAB para competir com outras LAB da mesma espécie ou proximamente relacionadas. Considerando que os principais contaminantes nos processos fermentativos de produção de bioetanol são LAB, a ideia é o uso de um coquetel de diversas bacteriocinas que seja capaz de controlar de maneira eficaz os contaminantes no processo de fermentação (BISCHOFF et al., 2007). Um exemplo de

molécula de bacteriocina bem estudada e utilizada para aplicações na indústria de alimentos, produção de vinhos e cerveja é a nisina (MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015; OGDEN, 1986; RADLER, 1990). A desvantagem, porém, deste tipo de estratégia está no custo associado à produção, já que a produção de bacteriocinas é cara e se limita ao uso em processos de pequena escala.

1.2.3.3 Bacteriófagos e Endolisinas

Outra estratégia estudada para o controle de contaminantes no âmbito da fermentação industrial para produção de bioetanol é o uso de bacteriófagos, vírus que têm como alvos, bactérias. Sob o ponto de vista da especificidade, o uso de bacteriófagos como agente antibacteriano para controlar contaminantes apresenta vantagens, já que lisam as células bacterianas sem afetar células animais, humanas e não teriam impacto sobre o crescimento de leveduras nos processos fermentativos para produção de etanol. Entretanto, a possibilidade de seleção de bactérias resistentes à infecção de bacteriófagos e o risco de infecções emergentes causadas por estas bactérias limitam o desenvolvimento e aplicação desta abordagem como agente antimicrobiano (AZAM; TANJI, 2019).

Por outro lado, o uso de enzimas líticas codificadas por bacteriófagos, denominadas endolisinas, também poderia ser uma estratégia para o controle da contaminação bacteriana. Um exemplo é a endolisina LysA2 que, segundo Ribelles e colaboradores (2012), é capaz de reduzir o crescimento de um amplo espectro de LAB. No entanto, do mesmo modo que ocorre para as bacteriocinas, o custo de produção destas proteínas acaba sendo proibitivo para aplicação na indústria de produção de bioetanol.

1.2.3.4 Leveduras Killer

Outra abordagem apontada por alguns estudos para reduzir a contaminação bacteriana nos processos fermentativos para produção de etanol combustível é o uso de leveduras *killer* nativas que inibem o crescimento de bactérias e outras espécies de leveduras (FÉRNANDEZ DE ULLIVARRI et al., 2014). Entretanto, leveduras *killer* podem não apresentar

características fermentativas desejáveis em termos de produtividade em etanol.

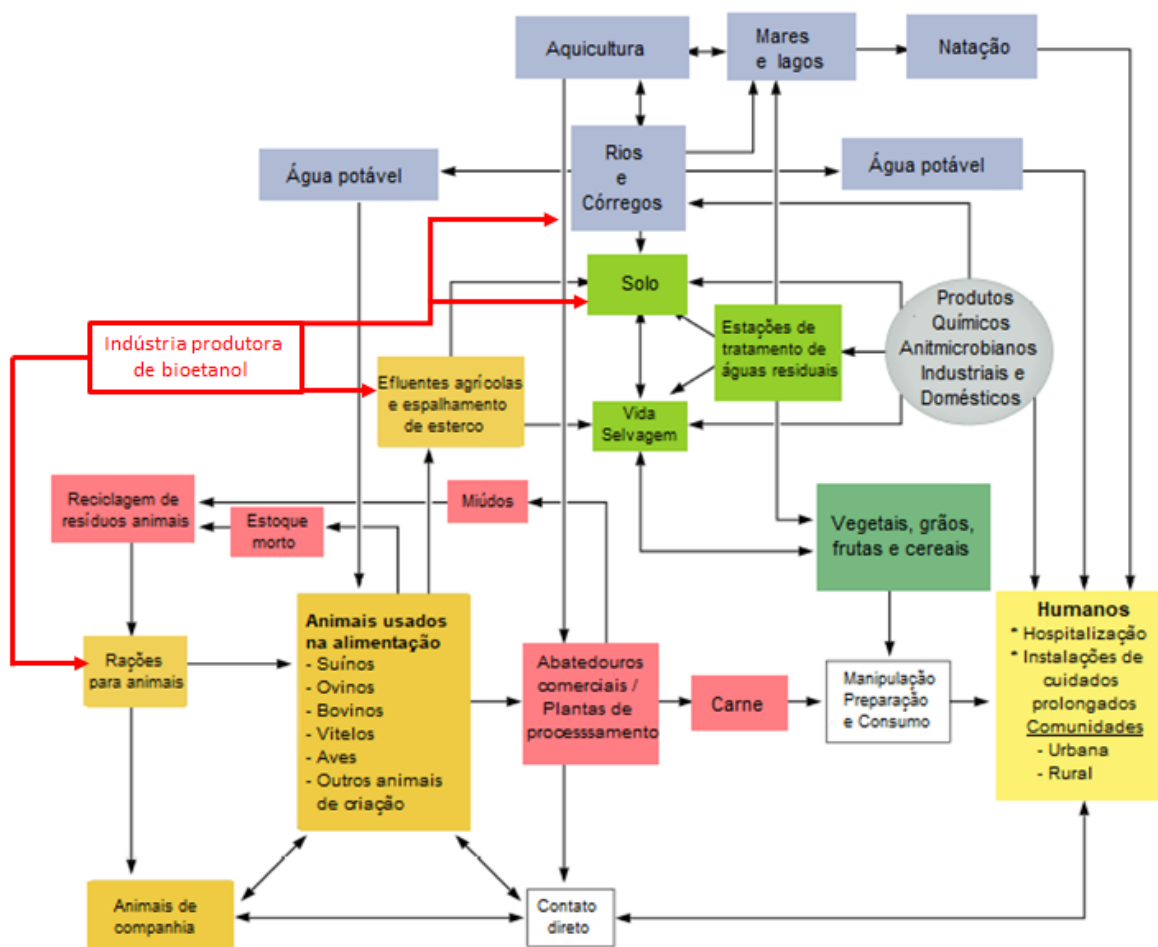
1.2.3.5 Antibióticos

Assim, a abordagem comumente utilizada na tentativa de controlar contaminações bacterianas em processos de fermentação alcoólica tem como premissa o uso de antibióticos.

Nesta abordagem, para prevenir a propagação das bactérias, especialmente LAB, e limitar as perdas, os produtores de etanol das unidades industriais têm como prática adicionar ao processo, de forma contínua, antibióticos, incluindo alguns utilizados para saúde humana em baixas concentrações (AQUARONE, 1960; BAYROCK et al., 2003; HYNES, 1997).

Embora seja um processo com relativa eficácia para controlar a contaminação bacteriana, esta abordagem pode gerar resíduos nocivos (JURANEK; DUQUETTE, 2007).

Segundo Davies e Davies (2010), inúmeros tipos de atividade antropogênica, incluindo o uso de antibióticos na agricultura, aquicultura e outras aplicações não médicas, criam grandes reservas ambientais de resistência a antibióticos e, de acordo com Doyle (2006), muito provavelmente reservatórios de genes de virulência e dos organismos que os abrigam, conforme pode ser visto na Figura 2.



Fonte: Adaptação e tradução livre da autora a partir de Davies e Davies (2010) em *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*.

Figura 2: Disseminação de antibióticos e resistência a antibióticos na agricultura, comunidade, hospitais, tratamento de águas residuais e ambientes associados.

Dentro deste contexto, a aplicação de antibióticos no processo produtivo na indústria de bioetanol de forma indiscriminada apresenta risco potencial de seleção de bactérias resistentes que afetam a saúde humana, como tem sido relatado em alguns estudos que demonstram a presença de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos comumente utilizados em tratamentos médicos como: tetraciclina, eritromicina, rifampicina, gentamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína e ciprofluoxacina (GARVEY et al., 2016; SHALLCROSS et al., 2015; O'NEILL, 2014). Esse fato fundamenta a crescente preocupação sobre os efeitos do uso indiscriminado de antibióticos neste contexto para a saúde humana (SILBERGELD et al., 2008; BAQUERO; BLÁZQUEZ, 1997).

Embora o uso generalizado de antibióticos, incluindo a utilização na produção de bioetanol, possa selecionar bactérias resistentes, diminuindo a

efetividade destes no tratamento de infecções, até recentemente, este tipo de utilização não recebia a devida atenção até que a *Food and Drug Administration* (FDA) reconheceu que a adição de antibióticos em processos agrícolas e industriais pode interferir na disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (SMITH et al., 2005).

Além do uso de antibióticos no processo fermentativo ter um papel significativo na seleção de bactérias resistentes, existe ainda outra restrição em relação ao uso desses produtos. Esta restrição está relacionada aos subprodutos da produção do etanol, como exemplo, pode-se citar a levedura seca (GORDON, 2009).

A levedura seca, um dos subprodutos da produção de etanol, é vendida como fonte de proteína para o preparo de ração animal. O Brasil, como grande exportador dessa proteína, convive com a rotina de rejeição desse produto pela Comunidade Europeia, já que são encontrados traços de antibióticos nessa levedura seca.

1.3 Potencial dos bioativos naturais

A substituição dos antibióticos no controle de contaminação para produção de bioetanol é fundamental frente à problemática exposta. Muitas das inúmeras estratégias apresentadas anteriormente evidenciam essa tentativa, porém sem sucesso ou eficácia desejada, visto que essa substituição deve pressupor a manutenção ou melhoria da eficácia do processo produtivo, utilização de substâncias ou produtos que não se tornem resíduos nocivos ao ambiente e, conseqüentemente, um risco para a saúde humana. Sendo assim, a busca por produtos naturais surge como alternativa promissora para este tipo de substituição.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de compostos químicos com atividade biológica tem sido amplamente relatado ao longo dos anos (ALVES et al., 2000; KOURKOUTAS et al. 2015).

Dentre os produtos naturais, as plantas têm sido fonte significativa de compostos com propriedades antimicrobianas, uma vez que são amplamente reconhecidas por sua atividade biológica ao longo dos séculos. A identificação e o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos presentes em tais

plantas têm sido objeto de estudo de inúmeras pesquisas, já que a busca por compostos com atividade biológica provenientes de plantas tem aumentado consideravelmente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (SMITH- PALMER et al., 2001; EDRIS, 2007).

No Brasil, a biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990) e sua preservação e estudo são de fundamental importância, seja por sua enorme potencialidade na descoberta de novos fármacos (ALVES et al., 2000), que há muito vem despertando interesse de pesquisadores da área farmacêutica, seja por seu potencial em aplicações biotecnológicas (SMITH-PALMER et al., 1998; KORDALI et al., 2008).

Estes dados motivam a investigação de produtos naturais provenientes de plantas, como óleos essenciais e extratos vegetais, que possam ser utilizados no controle da contaminação sem, entretanto, tornarem-se resíduos nocivos ao ambiente e à saúde humana.

1.4 Metabolismo Secundário e Bioativos Naturais

A atividade metabólica é uma característica inerente e essencial aos seres vivos. Segundo a definição proposta por Kreis e colaboradores (2017), o termo metabolismo refere-se à totalidade dos processos químicos que ocorrem em um organismo vivo.

Em espécies vegetais, o metabolismo pode ser dividido em processos químicos que compreendem as vias metabólicas. A denominação desta divisão do conjunto de reações químicas nos leva aos conceitos de metabolismo primário (basal) e metabolismo secundário (especial) (CASTRO et al., 2005; KREIS et al. 2017).

O metabolismo primário ou basal compreende o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, como é o caso da fotossíntese, da respiração ou transporte de solutos. Por outro lado, ao metabolismo secundário é atribuída a produção de compostos que não têm uma distribuição ubíqua, pois não são fundamentais a todas as plantas (CASTRO et al., 2005). As vias biossintéticas dos metabólitos básicos gerados a partir do metabolismo

primário apresentam semelhanças entre os diversos organismos, enquanto que as rotas biossintéticas dos metabólitos especiais, produzidos pelo metabolismo secundário, são restritos, na maioria das vezes, a *taxa* específicos (KREIS et al., 2017). Ainda que o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, este metabolismo desempenha um papel crucial nas inter-relações da planta com seu meio ambiente, sendo os compostos produzidos indispensáveis para a existência e sobrevivência de uma espécie, contrariando a ideia de que sejam produtos residuais sem função, como foi sugerido no início do século XX (MOTHES et al.1985; WINK, 2008).

A defesa contra herbivoria e micro-organismos é tida como uma das principais funções dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário. Alguns metabólitos secundários são também compostos sinalizadores para atrair polinizadores e animais que dispersam sementes ou têm um papel nas relações simbióticas entre plantas e micro-organismos (TIWARI; RANA., 2015).

Segundo Castro e colaboradores (2005), os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Já os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina).

Dentre os produtos do metabolismo secundário, destacam-se os óleos essenciais, cuja biossíntese, em sua maioria, remete às estruturas terpenoide e fenilpropanoide.

Essas duas classes, que abrangem uma grande variedade de compostos, tem suas origens apoiadas em estruturas do 2-metilbutadieno, também conhecido como isopreno, e aminoácidos aromáticos. Além disso, os óleos essenciais também podem apresentar em sua composição alcanos, alquenos lineares e constituintes contendo heteroátomos como nitrogênio e enxofre.

A presença de vários princípios bioativos derivados do metabolismo

secundário vegetal é explicada como uma estratégia que as espécies vegetais desenvolveram com funções complementares, na defesa contra pragas e doenças. Este tipo de estratégia impede o desenvolvimento de resistência por parte dos organismos que as atacam e/ou parasitam e podem ser suficientes para matar micro-organismos, insetos ou mesmo vertebrados de grande porte (CASTRO et al., 2005). Ativos obtidos a partir do metabolismo secundário, como óleos essenciais, quando utilizados em doses e combinações adequadas podem se converter em soluções biotecnológicas com diversas aplicações.

1.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidos tradicionalmente de partes de plantas (flores, brotos, sementes, folhas, ramos, cascas, frutos e raízes) através de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação. Também são chamados de óleos etéreos, voláteis ou essências (GUENTHER, 1948). Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente (GIORDANI et al., 2008). Quimicamente são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre em diferentes concentrações (SIMÕES et al., 2007).

Estima-se que existam mais de 3.000 óleos essenciais (OE) conhecidos, dentre os quais em torno de 300 são comercialmente importantes por apresentarem características aromáticas interessantes na indústria cosmética e alimentícia (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999; SMITH-PALMER et al., 1998, *apud* BURT, 2004).

Entretanto, a aplicação dos óleos essenciais não se restringe apenas a atividades relacionadas a fragrâncias e aromas, uma vez que os óleos essenciais têm sido considerados a principal fonte de substâncias com atividade antimicrobiana, como foi demonstrado por Guenther (1948) e Boyle

(1955) e revisto por Shelef (1983) e Nychas (1995) *apud* Burt (2004).

Além da atividade antimicrobiana que alguns óleos apresentam, o fato de serem utilizados comercialmente na indústria, seja de alimentos, farmacêutica e/ou cosmética, demonstra características interessantes sob o ponto de vista tecnológico, visto que estes OE não se tornam resíduos nocivos ao ambiente e à saúde humana (BAKKALI et al., 2008).

Sendo assim, os óleos essenciais e seus componentes podem representar uma alternativa para a substituição de antibióticos utilizados no controle das LAB no processo de fermentação para obtenção do bioetanol. Neste contexto, este estudo propôs a investigação da atividade antimicrobiana de diferentes OE como alternativa no controle de contaminação por LAB no processo de fermentação alcoólica.

APRESENTAÇÃO DA TESE

Este trabalho avaliou o potencial de óleos essenciais quanto à atividade biológica em micro-organismos provenientes de processos de fermentação a fim de desenvolver uma tecnologia alternativa para substituição do uso de antibióticos em processos fermentativos industriais. Para tanto, 40 óleos essenciais extraídos de espécies medicinais nativas e exóticas foram testados quanto à atividade inibitória de micro-organismos provenientes de processos de fermentação para produção de bioetanol combustível. Os óleos essenciais foram extraídos de plantas pertencentes à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O **Capítulo 1** aborda as práticas de utilização de antimicrobianos nos processos de fermentação de unidades industriais sucroalcooleiras brasileiras. A discussão do paradigma atual de utilização de antimicrobianos traz não apenas elementos teóricos, mas também apresenta dados coletados em dez unidades industriais brasileiras a respeito da utilização de antimicrobianos para controle de contaminação bacteriana nos processos fermentativos.

No **Capítulo 2** serão apresentados os óleos essenciais utilizados neste estudo e seus critérios de seleção e, na sequência, o Capítulo *“Potential Use of Essential Oils in Baker’s Yeast”*, publicado no livro *“Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas”* pela editora Atena em 2019.

No **Capítulo 3** serão apresentados os capítulos: *“Sturdiness of baker’s yeast strains to natural bioactive compounds”*, publicado em 2020 no livro *“Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2”*, e *“Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds”*, que foi aceito para publicação e está no prelo para fazer parte do livro *“Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia”*. Ambos capítulos apresentam resultados da primeira etapa de triagem, que consistiu na avaliação da atividade dos óleos essenciais em linhagens de leveduras. Para esta

avaliação foram utilizadas diferentes linhagens de leveduras industriais subdivididas em três grupos principais. Tais linhagens de leveduras foram previamente diferenciadas utilizando a cariotipagem como ferramenta de identificação e diferenciação molecular.

O **Capítulo 4** traz os resultados da segunda etapa de avaliação dos OE, que consistiu na análise da atividade dos óleos essenciais sobre contaminantes bacterianos. Além disso, o capítulo descreve o isolamento e identificação molecular dos contaminantes bacterianos provenientes de diferentes processos fermentativos de unidades industriais produtoras de bioetanol no Brasil.

Já o **Capítulo 5** envolve a terceira etapa da triagem dos OE que englobou a análise da composição química e as avaliações de diferentes misturas de óleos essenciais, aqui denominadas *blends*. Os resultados dos ensaios de fermentação utilizando levedura, bactéria e *blend* de óleos essenciais resultaram no **Capítulo 6**, que consiste da Patente BLEND 1251 “Composições e seu uso”, depositada sob Número do Processo: BR 10 2018 016804 5. Por fim, as principais conclusões obtidas do trabalho serão apresentadas de forma integrada no item **Conclusões Gerais**.

Capítulo 1

Uso de antimicrobianos nos processos de fermentação na indústria de bioetanol: Paradigma atual e desafios

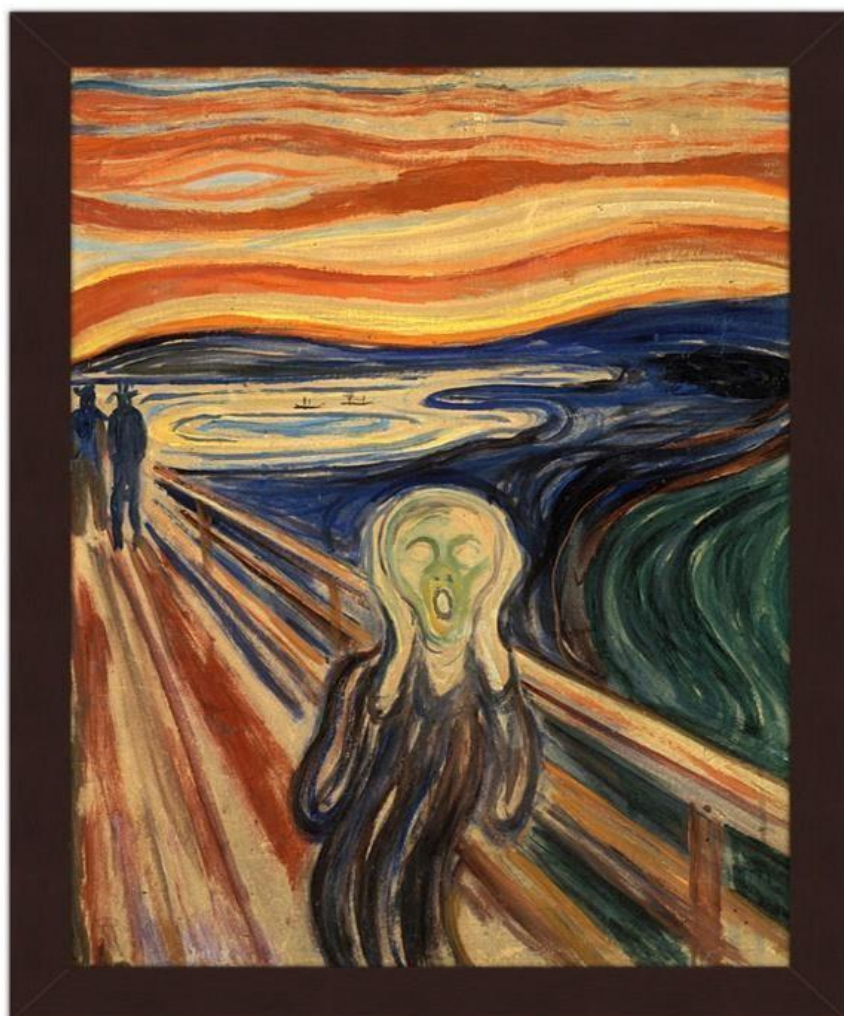


Figura 3: O Grito, de Edvard Munch (1895)

Fonte: <https://super.abril.com.br/blog/superlistas/10-pinturas-mais-caras-do-mundo/>

Eu caminhava com dois amigos - o sol se pôs, o céu tornou-se vermelho-sangue - eu senti como que um sopro de melancolia. Parei, apoiei-me no muro, mortalmente fatigado; sobre a cidade e do fiorde, de um azul quase negro, planavam nuvens de sangue e línguas de fogo: meus amigos continuaram seu caminho - eu fiquei no lugar, tremendo de angústia. Parecia-me escutar o grito imenso, infinito, da natureza. (MUNCH apud NAZÁRIO, 1999, p. 151)

APRESENTAÇÃO

No presente capítulo são abordadas as práticas de utilização de antimicrobianos nos processos de fermentação de unidades industriais sucroalcooleiras brasileiras. Tanto os aspectos industriais (como rendimento e perdas de produtividade em etanol) quanto os principais desafios ambientais e consequências sobre a saúde humana são trazidos em função desta prática de utilização. Além disso, a discussão do paradigma atual de utilização de antimicrobianos traz não apenas elementos teóricos, mas também apresenta dados coletados a partir de entrevistas realizadas em dez unidades industriais brasileiras a respeito da utilização de antimicrobianos para controle de contaminação bacteriana nos processos fermentativos.

1.1 INTRODUÇÃO

A contaminação bacteriana em processos de fermentação na indústria de bioetanol é um problema muito comum e traz inúmeros prejuízos, não apenas para o rendimento do processo, como também prejuízos indiretos, uma vez que a presença de alguns contaminantes colabora para desencadear floculação do fermento e possíveis paradas com consequentes perdas econômicas.

Diferentes antimicrobianos, incluindo antibióticos usados para tratar infecções que acometem a saúde humana e animal, como a penicilina e a virginamicina, são frequentemente utilizados para controlar a contaminação bacteriana em processos fermentativos para produção de bioetanol (BISCHOFF et al., 2007; STROPPIA et al., 2000).

A estratégia de uso destes antimicrobianos varia de uma unidade industrial para outra, sendo que para algumas a adição de antimicrobianos no processo de fermentação é contínua, enquanto em outras, os antimicrobianos são adicionados em altas dosagens de acordo com os níveis de contaminação bacteriana, que são monitorados incessantemente.

O fator comum entre as estratégias de controle de contaminação é o uso permanente de antibióticos em praticamente todo o período de safra.

Nas últimas duas décadas, o uso indiscriminado de antibióticos para o controle de bactérias tem sido uma prática comum em diferentes âmbitos que ultrapassam o uso destas substâncias como antimicrobianos para tratar infecções que acometem a saúde humana.

Historicamente, é possível verificar que este tipo de aplicação desequilibrada dos antibióticos, desde a introdução do primeiro antimicrobiano em 1937, tem promovido um crescimento persistente na disseminação de bactérias resistentes a medicamentos, amplamente conhecida como resistência antimicrobiana (*Antimicrobial Resistance* - AMR) (DAVIES, DAVIES 2010).

A resistência antimicrobiana (AMR), por definição, é o fenômeno em que os micro-organismos causadores de infecções, como bactérias, têm a capacidade de sobreviver à exposição a medicamentos que normalmente inibiriam seu crescimento ou os matariam (O'NEILL, 2016).

As consequências da AMR têm implicações para a saúde humana, afetando inclusive o aparecimento e aumento de casos de micro-organismos multirresistentes (MDR - *Multi Drug Resistant Microorganisms*). Além disso, O'Neill (2016) estima que o aumento da resistência antimicrobiana descontrolada acarretará 10 milhões de mortes evitáveis por ano até 2050.

Por outro lado, Smith (2013) aponta consequências que superam o custo humano ao abordar fatores econômicos em função do aumento da AMR, uma vez que esta resulta em maiores gastos com serviços de saúde e com maior utilização de recursos (ALUMRAN et al., 2014; MARAGAKIS et al., 2008; MCGOWA, 2001). Estima-se que em 2050, se não houver restrições, a AMR terá impactado a produção mundial em US\$100 trilhões (O'NEILL, 2016).

Sob o ponto de vista evolutivo, a resistência antimicrobiana é inevitável, uma vez que as mutações e capacidade de adaptação às situações de estresse e exposição a antimicrobianos, são inerentes às bactérias (FOWLER et al., 2014; WEBER; COURVALIN, 2005). Entretanto, sabendo-se que a taxa de desenvolvimento de AMR é amplamente conhecida, bem como facilitada pelo uso desnecessário e indiscriminado,

ações podem ser adotadas para retardar e conter o desenvolvimento de resistência (O'NEILL, 2016; BUKE et al., 2005).

Diante disso, é incontestável o impacto que o uso indiscriminado de antibióticos nos processos industriais para produção de bioetanol pode desencadear tanto para a saúde humana como para o ambiente, visto que os antibióticos têm o potencial de deixar resíduos, tanto relacionados ao antimicrobiano original como de seus metabólitos e/ou conjugados (ISIDORI et al., 2005; ISLAM et al., 2016; PETERS, et al., 2009).

Assim, para esboçar um panorama atual do cenário brasileiro de uso de antimicrobianos nos processos fermentativos, foi proposta esta investigação como parte suplementar ao desenvolvimento da tese, onde foram realizadas entrevistas com a finalidade de avaliar as estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos em 10 unidades industriais brasileiras ao longo das safras de 2019/2020.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas entrevistas com funcionários de 10 unidades industriais brasileiras produtoras de etanol combustível ao longo da safra de 2019/2020.

Dentre as unidades industriais, 9 estão localizadas no estado de São Paulo e 1 no estado do Mato Grosso do Sul, sendo que todas utilizam cana-de - açúcar como matéria-prima para produção de etanol combustível nos processos de fermentação.

A realização das entrevistas ocorreu no ano de 2019 e os questionamentos foram realizados considerando as práticas adotadas como referência para a safra de 2019/2020 e, no caso das questões 9 e 10, considerando as práticas adotadas para todas as safras, incluindo safras anteriores e a safra 2019/2020.

As entrevistas foram baseadas em um questionário aplicado verbalmente, o qual elencou dez questões envolvendo as estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos, e teve como finalidade identificar as estratégias e os antimicrobianos

utilizados, assim como a frequência de uso/ aplicação. As questões aplicadas nas entrevistas estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1: Questões utilizadas na entrevista com as unidades industriais para avaliação das estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos.

#	Questões utilizadas na entrevista com as unidades industriais
Q1	Qual a localização da unidade industrial?
Q2	A unidade industrial realiza o monitoramento da contaminação bacteriana?
Q3	A unidade industrial realiza o controle de contaminação bacteriana?
Q4	Caso utilize estratégias de controle de contaminação bacteriana, qual(is) utiliza?
Q5	Dentre as estratégias de controle de contaminação utilizadas, qual a mais frequentemente utilizada?
Q6	Utiliza antibiótico para controlar a contaminação bacteriana?
Q7	Qual(is) antibióticos utilizados?
Q8	Qual a frequência de uso do(s) antibiótico(s) utilizado(s)?
Q9	Já utilizou alguma estratégia alternativa ou natural para fazer o controle de contaminação para substituir o uso de antibióticos?
Q10	Em caso afirmativo para a questão 9, qual sua percepção acerca dos resultados obtidos?

Fonte: Elaborada pela autora

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados coletados a partir das entrevistas são descritos a seguir, sendo que a identidade das unidades industriais foi preservada por razões éticas e de condições de sigilo, uma vez que as informações foram fornecidas para este trabalho a título de colaboração. Assim, a nomenclatura adotada para as unidades industriais será composta apenas por letras sequenciais. As respostas objetivas para as questões de 2 a 6 e a questão 9 (Q9) estão listadas no Quadro 2 e serão discutidas na sequência, juntamente com as respostas subjetivas para as questões 7, 8 e 10.

Quadro 2: Respostas das questões objetivas da entrevista fornecidas pelas unidades industriais a respeito das estratégias de controle de contaminação bacteriana utilizadas nos processos fermentativos.

Legenda: **Abreviações:** SP = São Paulo; MS= Mato Grosso do Sul; S = Sim; N= Não; ANT= ANTIBIÓTICO; AAC = ADIÇÃO DE ÁCIDO; DCL = DIÓXIDO DE CLORO; EXL= EXTRATO DE LÚPULO.

USINA	Q1	Q2		Q3		Q4				Q5				Q6		Q9	
		S	N	S	N	ANT	AAC	DCL	EXL	ANT	AAC	DCL	EXL	S	N	S	N
A	SP	X		X		X	X	X		X				X			X
B	SP	X		X		X	X			X				X			X
C	SP	X		X		X				X				X			X
D	SP	X		X		X				X				X			X
E	MS	X		X		X	X			X				X			X
F	SP	X		X		X				X				X			X
G	SP	X		X		X		X		X				X			X
H	SP	X		X		X		X		X				X			X
I	SP	X		X		X			X	X						X	
J	SP	X		X		X				X				X			X

Fonte: Elaborada pela autora

Considerando as unidades avaliadas, 100% afirmaram realizar o monitoramento da contaminação bacteriana e utilizar estratégias de controle de contaminação. Dentre as estratégias de controle de contaminação, foram apontadas quatro principais: 1) uso de antibióticos; 2) adição de ácido ao fermento ou tratamento utilizando ácido; 3) uso de dióxido de cloro e 4) uso de extrato de lúpulo.

O uso de antibióticos como estratégia de controle de contaminação foi prevalente e apontado por 100% das unidades industriais, seguido por 30% das unidades que também adotam dióxido de cloro. Outros 30% das unidades industriais utilizam a adição de ácido como estratégia de controle, além do uso de antibióticos, e apenas 1 unidade (10%) mencionou o uso de extrato de lúpulo para controlar contaminantes bacterianos.

Em relação aos antibióticos adotados pelas unidades industriais, 100% afirmaram utilizar monensina sódica, sendo que 30% fazem uso associado à virginiamicina e outros 20% afirmaram que utilizam, além destes dois antibióticos, outros tipos de antibióticos, como por exemplo penicilina, quinolonas e aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina), contabilizando o uso de mais de cinco tipos de antibióticos de modo intercalado.

Na questão a respeito da frequência de uso e/ou aplicação dos antibióticos no processo fermentativo, não houve um padrão de resposta único, sendo as respostas bem variadas. Os perfis resultantes para esta

questão seguem: 50% fazem uso contínuo e adição constante de antibiótico; 10% fazem adição de antibiótico de hora em hora para controle de contaminação, independente dos níveis de contaminação; 20% aplicam antibióticos de acordo com os níveis de contaminação, considerando dados de contagem de bactérias para que se mantenham abaixo de 10^6 ; 10% afirmaram que utilizam apenas quando há contaminação, mas que essa situação permanece em mais de 95% do tempo de safra e, portanto, fazem uso intercalado de diversos antibióticos; e 10% afirmaram fazer uso esporádico dos antibióticos por utilizarem dióxido de cloro continuamente no processo (Figura 4).

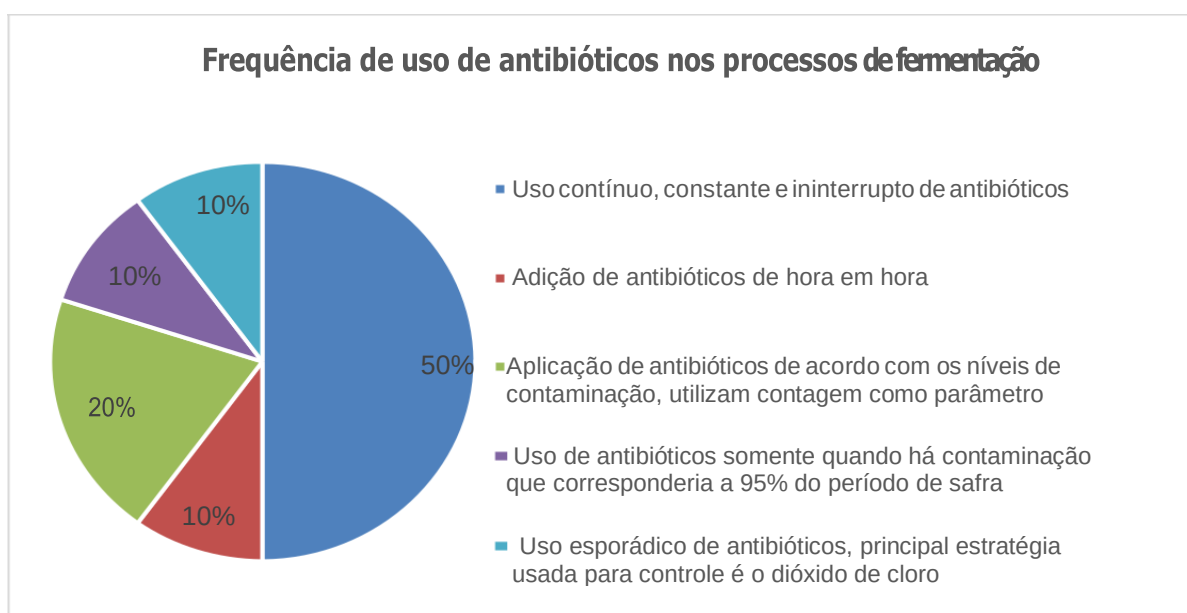


Figura 4: Frequência de uso/adicação de antibióticos nos processos fermentativos para produção de etanol combustível em unidades industriais brasileiras. N=10.

Em relação à experiência das unidades industriais sobre o uso de alguma estratégia alternativa ou natural para fazer o controle de contaminação para substituir o uso de antibióticos, 90% das unidades industriais afirmaram nunca ter usado outras estratégias alternativas com produtos naturais e apenas 10% mencionaram já ter utilizado. No entanto, esta unidade apontou limitações de baixa eficácia para manutenção deste tipo de prática de aplicação.

Os resultados apresentados através dos dados coletados a partir das entrevistas com as unidades industriais comprovam o uso contínuo, irrestrito e sem um critério definido de antibióticos nos processos fermentativos.

Esta estratégia de controle de contaminação aumenta a pressão de seleção, podendo resultar em maior incidência de micro-organismos resistentes ou com múltiplas resistências a antibióticos ao longo do tempo.

Diversos autores têm demonstrado altos níveis de resistência a antibióticos em micro-organismos provenientes de ambientes com alta exposição a antibióticos (DEC et al., 2017).

Além disso, a ubiquidade das LAB na natureza, associada ao fato de que bactérias Gram-positivas, especialmente do gênero *Lactobacillus*, vem sendo consideradas reservatórios de genes de resistência a antibióticos (MURPHREE et al., 2014; SAAED et al., 2014), reforçam a preocupação em relação à transferência de genes de resistência para micro-organismos patogênicos. Portanto, o uso indiscriminado de antibióticos no contexto industrial para o controle de contaminação bacteriana nos processos fermentativos pode trazer sérios problemas ambientais e para a saúde humana.

Neste sentido, diversos autores têm recomendado o emprego prudente de antibióticos e a redução de seu uso excessivo fora da prática médica e veterinária (DEC et al., 2017; MURPHREE et al., 2014; SAAED et al., 2014).

1.4 CONCLUSÕES

Diante destes achados e das informações que a literatura traz a respeito da seleção de micro-organismos resistentes a antibióticos, é possível concluir que o cenário brasileiro de uso de antimicrobianos nos processos fermentativos apresenta um panorama preocupante, sinalizando a necessidade eminente de novas soluções tecnológicas capazes de auxiliar na premissa de redução do uso excessivo e indiscriminado de antibióticos em contextos para além de sua aplicação na saúde, seja ela humana ou animal. Neste sentido, o presente trabalho traz, nos próximos capítulos, a avaliação

de potenciais produtos naturais para serem aplicados no controle de contaminação bacteriana em processos de fermentação.

1.5 REFERÊNCIAS

ALUMRAN A, HOU XY, SUN J, YOUSEF AA, HURST C. Assessing the construct validity and reliability of the parental perception on antibiotics (PAPA) scales. *BMC Public Health*. 2014;14(1):73.

BISCHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A.; LEATHERS, T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *J. Ind Microbiol Biotechnol*. 2007 34:739-744.

BUKE, C.; HOSGOR-LIMONCU, M.; ERMERTCAN, S.; CICEKLIOGLU, M.; TUNCEL, M.; KÖSE, T.; EREN, S. Irrational use of antibiotics among university students. *J Infect*. 2005;51(2):135–9.

DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):417–33.

DEC, M.; URBAN-CHMIEL, R.; STEPIEŃ-PYŚNIAK, D.; WERNICKI, A. Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut Pathog*. 2017;9:54. Published 2017 Sep 19. doi:10.1186/s13099-017-0203-z

FOWLER, T.; WALKER, D.; DAVIES, S.C. The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: is the alarm working?. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1323(1):1–0.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ*. 2005;346(1-3):87–98.

ISLAM, A.; SAIFUDDIN, A.K.M.; FARUQ, A.A; ISLAM, S.; SHANO, S.; ALAM, M.; HASSAN, M.M. Antimicrobial residues in tissues and eggs of laying hens at Chittagong, Bangladesh. *Int. J. One Health*. 2016;2(2):75–80.

MARAGAKIS, L.L.; PERENCEVICH, E.N.; COSGROVE, S.E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2008;6(5):751–63.

MCGOWAN, J.E. JR. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):286–92.

MURPHREE, C. A.; HEIST, P.E.; MOE, L.A. Antibiotic Resistance Among Cultured Bacterial Isolates from Bioethanol Fermentation Facilities Across the United States **Curr Microbiol** 2014 DOI 10.1007/s00284-014-0583-y

NAZÁRIO, L. As sombras móveis. Belo Horizonte. Editora UFMG, 1999.

O'NEILL, J. The review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

PETERS, R.J.B.; BLOCK, Y.J.C.; RUTGER, S.P.; STOLKER, A.A.M.; NIELEN, M.W.F. Multi residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2009;1216(46):8206–8216.

SAAED, R.M.; ELYAS, Y.Y.A.; YOUSIF, N.M.; ELTAYEB, M.M.; AHMED, I.S.M Incidence of antibiotic resistance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from various Sudanese fermented foods. *J. Food Nutr. Disor.* 2014, 3:6 <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9323.1000161>

SMITH R, COAST J. The true cost of antimicrobial resistance. *Bmj*. 2013;346:f1493.

STROPPA C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. *Int Sugar J*. 2000. 102:78–82

WEBER, J.T.; COURVALIN, P. An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):791.

World Health Organization. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization 2001. http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf?ua=1

Capítulo 2

Óleos Essenciais



Figura 5: Óleos Essenciais
FONTE: Elaborada pela autora

Potential Use of Essential Oils in Baker's Yeast

Patrícia Regina Kitaka¹, Marta Cristina Teixeira Duarte², Glyn Mara Figueira³,
Adilson Sartoratto⁴, Cláudia Steckelberg¹, Camila Delarmelina², Valéria Maia de
Oliveira⁵, Maria da Graça S. Andrietta¹

¹Division of Bioprocess, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

²Division of Microbiology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

³Division of Agrotechnology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁴Division of Organic Chemistry and Pharmaceutical, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁵Division of Microbial Resources, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

Publicado no livro Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas pela editora Atena em 2019.

APRESENTAÇÃO

No presente capítulo serão abordados alguns conceitos relativos aos óleos essenciais (OE), apresentados os óleos essenciais avaliados neste trabalho, bem como os critérios utilizados para seleção. Na sequência segue o Capítulo **“Potential Use of Essential Oils in Baker’s Yeast”** publicado no livro *“Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas”* pela Editora Atena em 2019, que apresenta um breve histórico dos óleos essenciais e uma discussão a respeito de suas aplicações, bem como alguns resultados da atividade antimicrobiana dos OE em linhagens de leveduras de panificação, que são mais profundamente explorados no Capítulo 3. As etapas de triagem dos OE são descritas e os resultados referentes às análises de composição química são apresentados.

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidos tradicionalmente de partes de plantas (flores, brotos, sementes, folhas, ramos, cascas, frutos e raízes) através de destilação por arraste com vapor d’água, também conhecida por hidrodestilação. Também são chamados de óleos etéreos, voláteis ou essências (GUENTHER, 1948). Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente (GIORDANI *et al.*, 2008). Quimicamente são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre em diferentes concentrações (SIMÕES *et al.*, 2007).

Estima-se que existam em torno de 3000 óleos essenciais (OE) conhecidos, dos quais aproximadamente 300 são comercialmente importantes por apresentarem características aromáticas interessantes para as indústrias cosmética e alimentícia (VAN DE BRAAK; LEIJTEN, 1999; SMITH-PALMER *et al.*, 1998, *apud* BURT, 2004).

2.2 “POTENTIAL USE OF ESSENTIAL OILS IN BAKER’S YEAST” publicado no livro “Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas” Editora Atena 2019



2019 by Atena Editora
 Copyright © Atena Editora
 Copyright do Texto © 2019 Os Autores
 Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
 Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
 Diagramação: Rafael Sandrini Filho
 Edição de Arte: Lorena Prestes
 Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
 Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
 Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
 Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Faria – Universidade Estácio de Sá
 Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
 Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
 Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
 Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
 Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
 Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
 Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
 Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
 Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
 Prof^a Dr^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
 Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Prof^a Dr^a Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof^a Dr^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
 Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
 Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
 Prof. Dr. Julianio Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof^a Dr^a Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P474	Pesquisa na cadeia de suprimentos de plantas aromáticas [recurso eletrônico] / Organizador Cleberton Correia Santos. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-662-1 DOI 10.22533/at.ed.621913009 1. Ervas – Uso terapêutico. 2. Matéria médica vegetal. 3. Plantas medicinais. I. Santos, Cleberton Correia. CDD 581.634
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

O livro **“Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas”** de publicação da Atena Editora apresenta em seu primeiro volume 5 capítulos associados a inovações tecnológicas com uso de plantas aromáticas e medicinais.

As plantas medicinais e aromáticas são utilizadas na medicina popular desde os tempos passos por comunidades indígenas, rurais e urbanas visando à prevenção de enfermidades por meio do uso de chás, compressas, banhos, xaropes, entre outras formas de uso. Nos últimos anos, a busca por uma vida de qualidade tem reforçado o resgate da importância e uso das plantas medicinais, sejam elas exóticas e/ou nativas das diferentes fitofisionomias.

Atualmente foi liberada pelo Ministério da Saúde uma Relação de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), constituída de 71 espécies, contribuindo para implantação de hortos medicinais em postos de saúde, escolas públicas e privadas e instituições de ensino superior em diversos estados do Brasil.

Além disso, as plantas medicinais e aromáticas apresentam potencial tecnológico, pois podem ser inseridas na cadeia industrial e controle fitossanitário, especialmente pela ação que o óleo essencial que muitas espécies detêm. Neste volume, serão abordados trabalhos referentes à alelopatia, controle de plantas espontâneas, uso de óleo essencial em leveduras de panificação, métodos de extração de óleo essencial e sua composição química.

Os agradecimentos do Organizador e da Atena Editora aos estimados autores que empenharam-se em desenvolver os trabalhos de qualidade e consistência, visando potencializar o avanço de uso de fitoterápicos e em bioprocessos.

Espera-se com esse livro incentivar alunos de graduação e pós-graduação, bem como pesquisadores de instituições de ensino, pesquisa e extensão ao desenvolvimento estudos de associados ao cultivo, caracterização fitoquímica e comprovação científica das propriedades das plantas medicinais, incentivando o resgate cultural e fortalecimento da cadeia de plantas medicinais e aromáticas, almejando contribuir na qualidade de vida da sociedade e desenvolvimento sustentável.

Cleberton Correia Santos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
POTENTIAL USE OF ESSENTIAL OILS IN BAKER'S YEAST	
Patrícia Regina Kitaka Marta Cristina Teixeira Duarte Glyn Mara Figueira Adilson Sartoratto Cláudia Steckelberg Camila Delarmelina Valéria M.Oliveira Maria da Graça S. Andrietta DOI 10.22533/at.ed.6219130091	
CAPÍTULO 2	13
FAMÍLIA LAMIACEAE: ATIVIDADE ALELOPÁTICA E POTENCIAL BIOHERBICIDA	
Cristine Bonacina Héliida Mara Magalhães Sílvia Graciele Hulse de Souza DOI 10.22533/at.ed.6219130092	
CAPÍTULO 3	25
PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS DO ESPÍRITO SANTO: O ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E FRUTOS DA ESPÉCIE <i>Schinus terebinthifolia</i> RADDI (AROEIRA VERMELHA)	
Maria Diana Cerqueira Sales Ricardo Machado Kuster Fabiana Gomes Ruas José Aires Ventura DOI 10.22533/at.ed.6219130093	
CAPÍTULO 4	37
CONTROLE PREVENTIVO DE CANCRO EUROPEU DAS POMÁCEAS EM MUDAS DE MACIEIRA	
Rodrigo Luis Boff Murilo César dos Santos DOI 10.22533/at.ed.6219130094	
CAPÍTULO 5	48
RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Eugenia uniflora</i> L. EM DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO	
Lidiane Diniz do Nascimento Márcia Moraes Cascaes Luís Henrique Araújo Oliveira Eloisa Helena de Aguiar Andrade DOI 10.22533/at.ed.6219130095	
SOBRE O ORGANIZADOR	59
ÍNDICE REMISSIVO	60

CAPÍTULO 1

POTENTIAL USE OF ESSENTIAL OILS IN BAKER'S YEAST

Patrícia Regina Kitaka

Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, São Paulo, Brazil

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil. e-mail: patricia.kitaka@gmail.com

<http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

Marta Cristina Teixeira Duarte

Divisão de Microbiologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/6011782448349535>

Glyn Mara Figueira

Divisão de Agrotecnologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3641295718619015>

Adilson Sartoratto

Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2938768700584296>

Cláudia Steckelberg

Divisão de Bioprocessos - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/5958009384445882>

Camila Delarmelina

Divisão de Microbiologia - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2818924682073419>

Valéria M.Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3886687872358496>

Maria da Graça S. Andrietta

Divisão de Bioprocessos - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Paulínia - SP, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3835309163911239>

RESUMO: Este capítulo fornece um panorama geral sobre as aplicações dos óleos essenciais sob uma perspectiva global. Esta visão mais abrangente tem como objetivo cobrir a extensa gama de aplicações industriais dos óleos essenciais, salientando sua importância em diversas áreas. Além disso, avanços e novos estudos são mostrados para estimular o pensamento criativo e encorajar o leitor a obter a informação e descobrir tendências que vão além das aplicações tradicionais.

Na primeira parte, definições, o contexto histórico e características dos óleos essenciais derivados de plantas são brevemente descritos. Os principais compostos com propriedades biológicas significativas e efeitos antimicrobianos são citados de forma resumida. As partes subsequentes retratam o uso dos óleos essenciais no contexto industrial. Por esta razão estudos focados no tanto na aplicação tradicional como nas mais recentes perspectivas são apresentados. Por fim, resultados oriundos de experimentos usando óleos essenciais e leveduras de panificação são demonstrados e discutidos. Estes ensaios tiveram o objetivo de avaliar o efeito dos óleos essenciais em sistemas que utilizam linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, comumente utilizada em diversos ramos industriais. Este capítulo aborda as potenciais aplicações da pesquisa em óleos essenciais (OE) para vários segmentos industriais compreendendo desde o uso mais básico e convencional até as aplicações de vanguarda em processos que adotam leveduras de panificação como plataforma para processos fermentativos.

USO POTENCIAL DE ÓLEOS ESSENCIAS EM LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO

ABSTRACT: This chapter provides an overview of applications of essential oils (EOs) using a global perspective. This broad view aims to cover the extensive industrial applications of EOs, highlighting their importance in several fields. Recent advancements are highlighted to illustrate “out-of-box-thinking” and to encourage readers to acquire information regarding trends beyond traditional applications of EOs. In the first section, definitions, historical contexts and characteristics of plant-derived EOs are briefly outlined. The compounds with significant biological properties and antimicrobial effects are summarized. Subsequent sections describe the use of EOs in the industrial context. We present studies focused on both traditional applications and the latest perspectives. Finally, results from experiments using essential oils and baker’s yeast strains are discussed. These studies aimed to evaluate the effects of EOs in systems that use *Saccharomyces cerevisiae* strains, commonly used in numerous industries. This chapter addresses the potential applications of EOs in industries ranging from the most basic and conventional uses to the cutting edge applications in processes that adopt baker’s yeast as the platform for fermentation processes.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*; Baker’s yeast; Essential oils; Industrial applications

1 | ESSENTIAL OILS – HISTORY AND BRIEF OVERVIEW

Human use of plants dates back to antiquity. From the Neolithic Age, when humans began cultivating plants and extracting oils using stone tools, up to today, plants have played important roles as natural resources to satisfy needs related to health as well as to food (MAZOYER; ROUDART; 2010; GURIB-FAKIM, 2006).

Several ancient historical records show that combinations of ointments and oils produced from various plant species were widely used worldwide (HALBERSTEIN,

2005; SENDRA, 2016). Evidences of medicinal and aromatic plants date back to 5000 years ago in India, China and Egypt as well as in Greece and Central Asia over almost 2500 years (ANG-LEE et al. 2001; JAMSHIDI-KIA. et al. 2018).

Aromatic and medicinal plants were usually used as extracts or ointments. In fact, these plants are rich in specialized secondary metabolites, especially essential oils.

Essential oils are a mixture of several compounds, mainly terpenes, alcohols, acids, esters, epoxides, aldehydes, ketones, amines and sulfides. These phytochemicals are produced by plants in response to stress; indeed, plants possess a wide range of tools to combat pathogenic infections (THEIS; LERDAU, 2003).

These compounds are also known as *volatile* or *ethereal oils*. The name '*essential oil*' is thought to have originated from the term coined in the 16th century by the Swiss medical reformer Paracelsus von Hohenheim; he referred to the effective component of a drug as *Quinta essentia* (GUENTHER, 1948).

Guenther (1948) described essential oils as aromatic oily liquids obtained from various parts of plants, including flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits and roots. Despite the fact essential oils are not strictly-speaking oils, they are frequently poorly soluble in water, a characteristic of oils in general (DEANS; RITCHIE 1987; HAMMER et al.1999; BURT, 2004; SÁNCHEZ et al., 2010).

2 | APPLICATIONS OF ESSENTIAL OILS

Because essential oils contain volatile components with antimicrobial activities, they have been used for centuries for medicinal as well as for cosmetic purposes. Furthermore, they often have a specific odor and sometimes a distinctive and pleasant taste, the main reason why they are used commercially in significant amounts in the flavor and fragrance markets (BURT, 2004).

According to countless authors, including CONNER (1993), plant-derived essential oils have long served as flavoring agents in foods and beverages. Because of their versatility, including their antimicrobial properties, essential oils may potentially replace synthetic additives as natural agents for food preservation.

In recent decades, several studies have been conducted with natural products focusing on antimicrobial properties; this research has been stimulated by increasing signs of negative effects caused by consumption of synthetic preservatives.

More recently, the popularity of natural products has been increasing and has impacted various essential oil applications, as consumer perception towards food preservatives has changed simultaneous with increased interest in clean-label food products (DENGATE et al., 2002; PRIFTIS et al., 2007).

Because of the wide range of essential oils and their effects, they have received attention not only as from the flavoring and perfume industries in recent years, but also from other industrial segments. Consequently, many researchers have studied plant-

derived essential oils and their applications.

Essential oils and their components have been extensively studied, not only for traditional use in perfumery, cosmetic and flavor industries, but also for alternative functions, including antibacterial (DEANS; RITCHIE,1987; OUSSALAH et al., 2007; FREIRES et al., 2015; SANTOS et al.,2017), anti-parasitic (GEORGE et al., 2009; COSTA et al., 2009), insecticidal (ESSAM, 2001; KIM et al., 2003), antifungal (FITZGERALD et al., 2003, KALEMBA;KLUNICKA, 2003;TSERENNADMID et al., 2011; FREIRES et al., 2015), and antioxidant, as well as growth and health promoters (BRENES; ROURA, 2010).

3 | NEWEST POTENTIAL APPLICATIONS OF ESSENTIAL OILS

In the last two decades, as a consequence of the advances in chromatography and chemical analysis, several studies have been undertaken to characterize the composition of essential oils. These studies have involved medicinal and aromatic plants from various parts of the world, including endemic plants that may provide a wide range of components in varying amounts and proportions (SARTORATTO et al.,2004; VIUDA-MARTOS et al. 2011; BALLESTER-COSTA et al., 2013; SHAROPOV et al., 2015; MARÍN et al., 2016).

According to Raut and Karuppayil (2014), several innovative applications using essential oils go beyond traditional uses. These authors mention studies of essential oils applied as anti-protozoans, anti-diabetics, anti-inflammatories, antioxidants, antivirals, and anti-mutagenics.

Given the fact that more than one million compounds have been discovered in natural sources, and that among them 50%–60% are produced by plants, plant-derived essential oils should be emphasized. Several compounds promise high potential to be explored by numerous industrial segments (BERDY, 2005).

Among the various segments in which essential oils can be applied, the food, animal husbandry and agriculture industries are worth highlighting.

Unquestionably, in the context of food industry, the main application of essential oils has been related to their use as flavorings as well as preservatives, because there has been a growing demand for their antifungal, antibacterial and antioxidant properties.

Essential oils should also be considered for food preservation because of several difficult challenges in terms of contamination and spoilage. One of these is related to substantial concern over multidrug-resistant microorganisms on the part of regulatory agencies. Furthermore consumer food preferences are moving away from synthetic additives and preservatives and there is an increasing demand for minimally processed foods and natural preservatives.

In short, essential oils are highly valued by the food industry because they are well-suited for use in organic foods, permitting the use of clean labels on foods.

Nevertheless, the use of essential oils present limitations, because in some cases they cause sensory changes derived from their strong odors, flavors and colors, all of which may change the original characteristics of foods (KUORWEL et al. 2011).

Research on essential oils' biological activities has become increasingly crucial for the pursuit of natural and safe alternative preservatives and health promoters. In this regard, essential oils are used as feed additives for ruminants to alter ruminal metabolism so as to reduce methane and ammonia emissions (COBELLIS et al., 2016).

Another important segment of application of essential oils is related to their use as replacements for antibiotic growth promoters both in animal husbandry and some agricultural processes. In spite of their mode of action in animals, their role remains superficially understood and requires deeper investigation (PEREIRA et al., 2010; NEGI, 2012; COBELLIS et al., 2016; BENTO et al., 2013).

Despite the substantial number of studies of essential oils as potential antimicrobials and as food preservatives, very few reports show their application in processes that use *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae is used to produce bread and other bakery products. It is also widely employed in several industrial segments as a platform for fermentation processes.

4 | BAKER'S YEAST - *Saccharomyces cerevisiae*

In the same way that plant-derived essential oils have shown remarkable applications since antiquity, yeasts have been widely reported in historical documents from several cultures throughout history (FLEET, 2006). Among yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* has been one of the most important domesticated microorganisms.

This microorganism has been extensively used in several fermentation processes since antiquity because of its versatility and capacity to act on various substrates. Interestingly fermentation processes employing *S. cerevisiae* remain common and represent a significant component of modern industrial processes.

In the food industry, *S. cerevisiae* is a double-edge sword. On the one hand, it often appears as a contaminant (STRATFORD, 2006; TYAGI et al., 2014). By contrast, a number of strains of this microorganism are employed as baker's yeasts to produce bread and other bakery products. Furthermore, several strains are used in industrial fermentation processes to produce beer, wine, and bioethanol.

As mentioned above, there is a trend toward green consumerism, not only in the food industry. Essential oils have also recently emerged as possible sources of safe and natural antimicrobial agents.

Long-term selection and domestication of *Saccharomyces cerevisiae* has led to selection and use of various strains with characteristics appropriate for distinct fermentation processes. Consequently, the effects of plant-derived essential oils on

yeast strains used in various fermentation processes are fundamentally important for understanding its action and possible future applications.

The next section summarize some findings from our studies using essential oils in baker's yeast strains.

5 | EFFECT OF ESSENTIAL OILS IN BAKER'S YEAST *Saccharomyces cerevisiae* STRAINS

Our group studied the effect of 25 plant-derived essential oils on strains of *S. cerevisiae* from the bakery industry (Figure 1). We cataloged growth-inhibition profiles following exposure to essential oils at varying concentrations. All strains were isolated from different baker's yeasts: stronger baker's yeast, active dry baker's yeast, and sweet dough baker's yeast. All were distinguished by karyotyping using pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

The essential oils used were extracted from plants belonging to the Medicinal and Aromatic Plant Collection (CPMA) of Chemical, Biological and Agricultural Multidisciplinary Research Center (CPQBA) at University of Campinas (UNICAMP) in Brazil.

Essential Oils	YEAST STRAINS					
	DYS	BMD	FMD	IMD	FFF	IMS
	ADY		SDY			SY
<i>Aloysia tryphylla</i>						
<i>Artemisia annua</i>						
<i>Varonia curassavica</i>						
<i>Cymbopogon winterianus</i>						
<i>Lippia sidoides</i>						
<i>Ocimum gratissimum</i>						
<i>Origanum vulgare</i>						
<i>Achyrocline satureioides</i>						
<i>Alpinia</i>						
<i>Cipó cruz-do-norte</i>						
<i>Cymbopogon citratus</i>						
<i>Cymbopogon martinii</i>						
<i>Cyperus articulatus</i>						
<i>Elyonurus muticus</i>						
<i>Chenopodium ambrosioides</i>						
<i>Eugenia uniflora</i>						
<i>Lippia alba</i>						
<i>Melaleuca alternifolia</i>						
<i>Mentha aquatica</i>						
<i>Mentha piperita</i>						
<i>Ocimum selloi</i>						
<i>Pimenta Dióica</i>						
<i>Schinus terebinthifolius</i>						
<i>Ruta graveolens</i>						
<i>Tagetes patula</i>						

Inhibitory Concentration of Essential Oils (mg/mL)

2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001
---	---	-----	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Terms used considering commercial description:

ADY - Active Dry Baker's Yeast

SDY - Sweet Dough Baker's Yeast

SY - Strong Baker's Yeast

FIGURE 1 Effect of essential oils (EOs) on baker's yeast strains growth

The 25 plant-derived essential oils (Figure 1) were analyzed using gas chromatography – mass spectral analysis (GC-MS) (ADAMS, 2007). Oil components were identified by comparison of mass spectra and retention indices with spectral library and literature. A different activity profile of essential oils in the face of baker's yeast strains was found. Among them, two groups can be highlighted: (I) Essential oils with severe effects on baker's yeast and (II) Essential oils that had no effect on baker's yeast. In the first group, two essential oils should be mentioned: *Elionurus muticus* and *Chenopodium ambrosioides*. In the second group, three essential oils deserve to be highlighted: *Alpinia*; *Achyrocline satureioides*; and *Varronia curassavica*. We will discuss *A. satureioides*; *E. muticus* and *V. curassavica* in more detail.

5.1 *Elionurus muticus*

The genus *Elionurus* Humb.et Bompl ex. Willd (Gramineae) is common in subtropical regions of South America, Africa and Australia. In Brazil *E. muticus* is native to the Pantanal biome and is popularly called "Capim-Carona." This plant has been studied for its negative effects in animal husbandry (SANTOS et al., 2005).

Similar to results shown in Figure 1, in which this essential oil presented one of the most severe effects on all *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from baker's yeast, studies have demonstrated strong antimicrobial inhibitory effects of this oil in yeasts of the *Candida* spp. (SABINI et al., 2006).

Although *E. muticus* essential oil has been mentioned as a repellent (STEFANAZZI, et al., 2011) and antimicrobial for *Candida* species, there are no studies of its effect on *S. cerevisiae*. The main chemical compound found in *E. muticus* essential oil was citral, a mixture of two geometric isomers known as geranial and neral that represent 82% of their composition.

Given the fact that *S. cerevisiae* are model of eukaryotic cells, the severe effect of this oil should be considered when used for human applications due its possible toxicity and need to be deeply studied.

5.2 *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides (D.C.) Lam. (Asteraceae), known as "marcela hembra" (Uruguay and Argentina), "marcela do campo" or "macela" (in Brazil) is a medicinal plant native to southeastern South America and is distributed as well in Europe and Africa. This aromatic plant has been traditionally used as an infusion of the dried flowers and flowered stems by local populations for medicinal purposes (LORENZO et al., 2000).

In our study, the essential oil extracted from *A. satureioides* was found to be harmless for all baker's yeast strains evaluated. Several studies conducting chemical characterization of *A. satureioides* essential oils showed that α -pinene and caryophyllene were major components, consistent with our results (45% of α -pinene; 25% of caryophyllene and 13% of α -humulene). The data showed that there was no inhibitory action on any *S. cerevisiae* strains when the *A. satureioides* essential oil was present at all concentrations tested.

Other studies, including research conducted by Mota et al. (2011) demonstrated the antibacterial effect of this oil. For all these reasons, there is a potential of this essential oil to be studied in depth for fermentation systems that use baker's yeast.

5.3 *Varronia curassavica* (sin = *Cordia verbenaceae* DC.)

Varronia curassavica Jacq. (sin = *Cordia verbenaceae* DC.), Boraginaceae, popularly known as "erva-baleeira", "catinga-de-barão", "maria-preta" and "maria-milagrosa" occurs naturally from Central to South America. In Brazil, it occurs in the Atlantic Forest biome. This traditional medicinal plant has been used to treat several inflammatory disorders, including ulcers and arthritis (FEIJÓ et al., 2014).

As with the essential oil of *A. satureioides*, the *V. curassavica* essential oil was also shown to be harmless for all baker's yeast strains evaluated, at all concentrations tested. Likewise, chemical characterization studies of *V. curassavica* essential oil showed that α -pinene and caryophyllene were the major components (CARVALHO et

al., 2004). Our study supports these results (33% of α -pinene; 33% of caryophyllene and 7,5% of α -humulene) and demonstrates the absence of inhibitory effect of *V. curassavica* essential oil on all baker's yeast strains. As with *A. satoreioides*, there are many studies using *V. curassavica* essential oil, demonstrating an antibacterial effect (RODRIGUES et al., 2012); for this reason, this oil presents potential in systems that use baker's yeast.

CONCLUSION

In this chapter, we provided an overview of applications for essential oils.

Plant-derived essential oils offer a wide range of useful properties. A series of ongoing investigations are demonstrating various advantages with application of essential oils. Several authors have highlighted the reduction of genotoxicity (even after prolonged use), lower toxicity, and the ability to act on several targets as the main reasons for their beneficial characteristics. Furthermore, use in 'eco-friendly' products, associated with low costs of production, increases profitability of their use.

We highlighted traditional and new applications, as well as potential applications in systems that employ baker's yeast in fermentation processes.

Generally, the concept of essential oils as antimicrobials can be considered a traditional approach. Nevertheless, the use of essential oils in baker's yeast strains should be considered an innovative application, because there are no studies using both of them. Furthermore, *S. cerevisiae* strains strongly impact food and beverage production.

The effects of essential oils or their several components in fermentation processes need further exploration because a range of essential oils have been accepted by the European Commission. The United States Food and Drug Administration (FDA) has also classified these substances as generally recognized as safe (GRAS). Studies using essential oils in *Saccharomyces cerevisiae* strains may be applied as screening techniques for antimicrobials to be used in fermentation processes, because there is great potential for new molecules and phytochemical discoveries based on essential oils that are extracted and characterized from traditional and medicinal plants worldwide.

Considering our present knowledge and future perspectives, the use of essential oils on yeast strains is only beginning, and there is a long journey ahead.

REFERENCES

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry 4th ed. Illinois Allured Publ. 2007 804p.
- ANG-LEE, M.K.; MOSS, J.; YUAN, C.S. Herbal medicines and perioperative care. **JAMA**; 286(2):208-

16. 2001

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS M. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Ind. Crops Prod.**, 50:304–311. 2013.

BENTO, M.H.L.; OUWEHAND, A.C.; TIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P.; SAARINEN, M.T.; SCHULZE, H.; MYGIND, T.; FISCHER, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals-effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. **Vet. Med.**, 58, 449–458. 2013.

BERDY J. Bioactive microbial metabolites.A personal view.**J. Antibiot.**; 58: 1–26. 2005.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Anim. Feed Sci. Technol.** 158, 1-4, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94,n.3, 223-253, 2004.

CARVALHO, J.R.P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* DC. **J.Ethnopharmacol.**, 95, 297-301, 2004.

COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; YU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Sci. Total Environ.** 545–546, 556–568. 2016.

CONNER, D.E. **Naturally occurring compounds**. In *Antimicrobials in Foods*; Davidson, P. M., Brannen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; 441-468.

COSTA,E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; NORONHA,H.S.M.; DUARTE, M.C. T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G. M. C. ; LEON, L. L. **Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of Annona foetida (Annonaceae)**. Química Nova v. 32, 78-81, 2009.

DEANS, S. G;RITCHIE,G. Antibacterial properties of plant essential oils.**International Journal Food Microbiology**, 5, 165-180. 1987.

DENGATE, S.;RUBEN,A. Controlled trial of cumulative behavioural effects of a common bread preservative.**J. Paediatr.Child Health**, 38, 373-376. 2002.

ESSAM, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp.Biochem. Physiol. C.Toxicol. Pharmacol.**130, 325-337, 2001.

FEIJÓ, E.V.R.da S.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L. C. do B. Light effects *Varronia curassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 24, 516-523, 2014.

FITZGERALD, D.J.; STARTFORD,M.; NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin.**Int. J. Food Microbiol.**, 86,113-122, 2003.

FLEET, G. H. The commercial and community significance of yeasts in Food and Beverage Production in Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

FREIRES, I.A.; BUENO-SILVA, B.; GALVÃO,L.C.C.; DUARTE, M.C. T.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; ALENCAR, S.M.de ; ROSALEN, P. L. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015.1-9, 2015.

GEORGE, D.R.; SMITH, J.; SHIEL, R.S.; SPARAGANO, O.A.E.; GUY, J.H. Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* **Vet. Parasitol.** 161, 276-282, 2009.

GUENTHER, E., **The essential Oils** D. Van Nostrand, New York. 1948.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine** n.6, 1-93, 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns **Ann. Epidemiol.** 15. 686-699, 2005.

HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Appl. Microbiol.**, 86, 985-990, 1999.

JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. **J Herbmed Pharmacol.** 7(1):1-7. 2018.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, 10, 813-829, 2003.

KIM, S.I.; ROH, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H.S.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **J. Stored Prod. Res.** 39, 293-303, 2003.

KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. **J. Food. Sci.** 76, R164–R177. 2011.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFIN, L.; SANTOS, AC; FRIZZO, C.D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay **Planta Medica** 66, 476-477, 2000.

MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. **Foods**, 5, 18. 2016.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das Agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea** 1933 [Tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]. São Paulo; Brasília, DF: NEAD, Editora UneSP – 2010 586p. il

MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. Botucatu, **13**, 298-304. 2011.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **Int. J. Food Microbiol.**, 156, 7–17. 2012.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S. SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* **Food Control**, 18, 414-420, 2007.

PEREIRA, R. A. N.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, VERA L. G.; GODOY, M. C. L. ; SILVA, A. F. **Uso de Plantas Mediciniais na Terapêutica Animal**. Informe Agropecuário (Belo Horizonte), v. 31, p. 101-105, 2010.

PRIFTIS, K.M.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ANTHRACOPOULOS, M. B.; PAPADIMITRIOU, A.; NICOLAIDOU, P. Aims, methods and preliminary findings of the Physical Activity, Nutrition and Allergies in Children Examined in Athens (PANACEA) epidemiological study. **BMC Public Health**, 7:140, 1471-2458. 2007.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M.A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, 62, 250–264, 2014.

RODRIGUES.F.F.; OLIVEIRA, L.G.; RODRIGUES, F.F.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.; CABRAL, M.E.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G. **Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from Cordia verbenacea DC leaves** Pharmacognosy Res. 4(3):161-165, 2012.

SABINI, L.I. Study of the cytotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp. **Molecular Medicinal Chemistry**, v.11, 31-3, 2006.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. **Appl Environ. Microbiol.** 76, 6888-6894, 2010.

SANTOS, A. R.; BENGHI, T.G.S.; NEPEL, A.; MARQUES, F.A.; LOBÃO, A. Q.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L.N.S. Antiproliferative and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of Guatteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, 1-6, 2017.

SANTOS, S.A.; CRISPIM, S.M.A.; FILHO, J.C.; POTT, A.; CARDOSO, E.L. **Substituição de Pastagem Nativa de Baixo Valor Nutritivo por Forrageiras de Melhor Qualidade no Pantanal**. EMBRAPA, Circular Técnica, nov, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 35, n.4, 275-280, 2004.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, **Foods**, 5:43, 1-3, 2016.

SHAROPOV, F.; BRAUN, M.; GULMURODOV, I.; KHALIFAEV, D.; ISUPOV, S.; WINK, M. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from tajikistan. **Foods**. 4:645. 2015.

STEFANAZZI, N. STADLER, T. FERRERO, A. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Manag. Sci.**, 67, 639-646. 2011.

STRATFORD M. **Food and Beverage Spoilage Yeasts**. In: Querol A., Fleet G. (eds) Yeasts in Food and Beverages. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences** 164(S3):93-102, 2003.

TYAGI, A. D.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M.E.; Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. **LWT-Food Science and Technology**, 57 (2), 731-737, 2014.

TSERENNADMID, R.; TAKÓ, M.; GALGÓCZY, T.; PAPP, T.; PESTI, M.; VÁGVÖLGYI, C.; ALMÁSSY, K.; KRISCH, J., Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk **Int. J. Food Microbiol**, 144, 480-486, 2011.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Cont.** 19, 1130-1138, 2008.

2.3 POR QUE AVALIAR ÓLEOS ESSENCIAIS PARA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE BIOETANOL?

A problemática em relação à necessidade de substituição do uso de antibióticos nos processos de fermentação para produção de etanol combustível foi exposta ao longo do Capítulo 1 e demonstra que, além do uso de antibióticos no processo fermentativo ter um papel significativo na seleção de bactérias resistentes, existe ainda outra restrição em relação ao uso desses produtos. Diz respeito aos traços desses antibióticos, os quais podem ser encontrados em subprodutos da produção do etanol (GORDON, 2009).

Após a utilização no processo industrial de fermentação, a levedura seca, um dos subprodutos da produção de etanol, é vendida como fonte de proteína para o preparo de ração animal. O Brasil, como grande exportador dessa proteína, convive com a rotina de rejeição desse produto pela Comunidade Europeia, já que são encontrados traços de antibióticos nessa levedura seca.

Sendo assim, a busca por produtos naturais surge como uma alternativa promissora para este tipo de substituição.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de compostos químicos com atividade biológica tem sido amplamente relatado ao longo dos últimos anos (KOURKOUTAS et al, 2015).

No Brasil, a biodiversidade é considerada uma inestimável fonte de substâncias biologicamente ativas, e sua preservação e estudo são de fundamental importância (BARREIRO et al 2009), seja por sua enorme potencialidade na descoberta de novos fármacos, que há muito vem despertando interesse de pesquisadores da área farmacêutica, seja por seu potencial em aplicações biotecnológicas (SMITH-PALMER et al, 1998; KORDALI et al., 2008).

Muitas espécies medicinais vêm sendo amplamente reconhecidas por suas propriedades antimicrobianas ao longo dos séculos. A identificação e o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos presentes em tais plantas tem sido objeto de estudo de inúmeras pesquisas, já que a busca por compostos com atividade biológica provenientes de plantas tem aumentado consideravelmente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica

(SMITH-PALMER et al, 2001; EDRIS, 2007).

Em toda parte da planta, podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas, que dão origem a uma série de substâncias conhecidas e com diversas aplicações.

Este fato motiva a investigação de produtos naturais provenientes de plantas, como óleos essenciais e extratos vegetais que possam ser utilizados no controle da contaminação sem, entretanto, tornarem-se resíduos nocivos ao ambiente e à saúde humana.

Sabe-se que a aplicação dos óleos essenciais não se restringe apenas a atividades relacionadas a fragrâncias e aromas, uma vez que estes compostos têm sido considerados a principal fonte de substâncias com atividade antimicrobiana, como foi demonstrado por Guenther (1948) e Boyle (1955) e revisto por Shelef (1983) e Nychas (1995) *apud* Burt, (2004).

Além disso, devido à atividade antimicrobiana que alguns óleos apresentam, alguns OE já têm sido utilizados comercialmente na indústria, seja de alimentos, farmacêutica e/ ou cosmética, demonstrando características interessantes sob o ponto de vista tecnológico, visto que não geram resíduos nocivos ao ambiente e à saúde humana (BAKKALI *et al.*, 2008).

Sendo assim, os óleos essenciais e seus componentes se apresentam como uma possibilidade na substituição de antibióticos utilizados no controle das bactérias lácticas (LAB) no processo de fermentação para obtenção do bioetanol.

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS ESTUDADOS E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Os óleos essenciais (OE) utilizados para o desenvolvimento deste trabalho (Tabela 1) foram gentilmente cedidos pelas Divisões de Microbiologia (DM) e de Agrotecnologia (DAGRO) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. Com exceção do OE de Vetiver (*Vetiveria zizanioides*), obtido comercialmente, os demais OE foram obtidos através de extração de material vegetal proveniente de plantas da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA) (Figura 6), do CPQBA

da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).



Figura 6: Foto da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas (CPMA), CPQBA/UNICAMP, gentilmente cedida pela Divisão de Agrotecnologia/CPQBA. Fonte: <https://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/>

2.5 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As extrações dos OE foram realizadas por hidrodestilação, em um sistema do tipo Clevenger adaptado, utilizando material vegetal, sendo que para cada OE as massas dos órgãos vegetativos variaram de acordo com a disponibilidade de material no momento da coleta. O tempo de extração dos OE foi de 3 horas a partir do início da destilação. Os OE obtidos foram separados da fase aquosa com auxílio de pipeta Pasteur, transferidos para frascos âmbar e acondicionados em freezer (-20°C).

Tabela 1: Lista de Óleos Essenciais (OE).

LEGENDA OE = Óleos essenciais; E = Planta exótica; N = Planta Nativa; NA = não se aplica.

#OE	Nome científico	Origem	# Voucher	Família	Nome Popular
1	<i>Aloysia gratissima</i>	E	NA	Verbenaceae	Erva Santa
14	<i>Alpinia galanga</i>	E	NA	Zingiberaceae	Alpínia
3	<i>Artemisia annua</i>	E	NA	Asteraceae	Atemísia
21	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	E	NA	Amaranthaceae	Erva de Santa Maria
17	<i>Cymbopogon citratus</i>	E	NA	Poaceae	Capim-limão
18	<i>Cymbopogon martinii</i>	E	NA	Poaceae	Palmarosa
5	<i>Cymbopogon winterianus</i>	E	NA	Poaceae	Citronela
24	<i>Melaleuca alternifolia</i>	E	NA	Myrtaceae	Tea tree
25	<i>Mentha aquática</i>	E	NA	Lamiaceae	Hortelã
26	<i>Mentha piperita</i>	E	NA	Lamiaceae	Hortelã apimentada
7	<i>Ocimum gratissimum</i>	E	NA	Lamiaceae	Alfavaca-cravo
8	<i>Origanum vulgare</i>	E	NA	Lamiaceae	Orégano
30	<i>Pimenta Dióica</i>	E	NA	Myrtaceae	Pimenta da jamaica
32	<i>Ruta graveolens</i>	E	NA	Rutaceae	Arruda
33	<i>Tagetes patula</i>	E	NA	Asteraceae	Cravo-de-defunto
11	<i>Thymus vulgaris</i>	E	NA	Lamiaceae	Tomilho
12	<i>Vetiveria zizanioides</i>	E	NA	Poaceae	Vetiver
13	<i>Achyrocline satureioides</i>	N	UEC 127116	Asteraceae	Macela do campo
2	<i>Aloysia triphylla</i>	N	UEC 121412	Verbenaceae	Erva Maria Luíza
15	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	N	UEC 188585	Asteraceae	Alecrim-do-campo
16	<i>Calea pinnatifida</i>	N	UEC 121950	Asteraceae	Cipó Cruz do Norte
19	<i>Cyperus articulatus</i>	N	UEC 121396	Cyperaceae	Priprioca
20	<i>Elionurus muticus</i>	N	UEC 139466	Poaceae	Capim-carona
22	<i>Eugenia uniflora</i>	N	UEC 184195	Myrtaceae	Pitanga
23	<i>Lippia alba</i>	N	UEC 121413	Verbenaceae	Erva cidreira de folha
6	<i>Lippia origanoides</i>	N	UEC 184171	Verbenaceae	Alecrim pimenta
27	<i>Ocimum selloi</i>	N	UEC 121406	Lamiaceae	Manjerição-anis
28	<i>Pilocarpus microphyllus</i>	N	UEC 150310	Rutaceae	Jaborandi
29	<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	N	UEC 184143	Rutaceae	Canela-cutia
9	<i>Piper abutiloides</i>	N	UEC 149639	Piperaceae	NA
10	<i>Piper aduncum</i>	N	UEC 127118	Piperaceae	Pimenta-de-macaco
34	<i>Piper caldense</i>	N	UEC 184700	Piperaceae	Pimenta d'arda
35	<i>Piper cernuum</i>	N	UEC 180855	Piperaceae	Pimenta de macaco
36	<i>Piper marginatum</i>	N	UEC 121395	Piperaceae	Caapeba
37	<i>Piper mollicomum</i>	N	UEC 128163	Piperaceae	Jaborandi-manso
38	<i>Piper ovatum</i>	N	CPMA 1618	Piperaceae	Jaguarandi
39	<i>Piper regnellii</i>	N	UEC 127119	Piperaceae	Pariparoba
40	<i>Pothomorphe umbellata</i>	N	UEC 127123	Piperaceae	Caapeba
31	<i>Schinus terebinthifolius</i>	N	UEC 166613	Anacardiaceae	Aroeira
4	<i>Varronia curassavica</i>	N	UEC 184153	Boraginaceae	Erva baleeira

Fonte: Elaborada pela autora

2.6 AVALIAÇÃO E TRIAGEM DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os 40 óleos essenciais utilizados neste trabalho foram selecionados inicialmente com base nos resultados obtidos a partir de pesquisas anteriores dos grupos de pesquisa do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CQPBA) da Unicamp sobre as atividades de óleos essenciais sobre leveduras patogênicas. Assim, foram selecionados óleos essenciais cujo perfil não demonstrou atividade biológica para leveduras patogênicas.

Na sequência, os óleos essenciais passaram por três etapas de avaliação e triagem tendo como objetivo selecionar aqueles com perfil adequado para inibir contaminantes bacterianos nos processos de fermentação para produção de etanol combustível. As quatro etapas de triagem consistiram em:

- 1) avaliação da segurança de uso dos óleos essenciais, ou seja, avaliar os OE em relação à inocuidade em leveduras presentes nos processos fermentativos;
- 2) avaliação da eficácia da atividade dos OE para inibição de contaminantes bacterianos provenientes de processos fermentativos. Esta etapa foi subdividida em duas partes: avaliação da atividade bacteriostática (determinação da concentração inibitória mínima – *Minimal Inhibitory Concentration* – MIC) e avaliação da atividade bactericida (determinação da concentração bactericida mínima – *Minimal Bactericidal Concentration* – MBC);
- 3) avaliação do perfil de composição química.

Na primeira etapa, os 40 óleos essenciais listados na Tabela 1 foram avaliados quanto à atividade inibitória de leveduras presentes nos processos fermentativos brasileiros, cuja descrição detalhada e análises encontram-se no Capítulo 3.

Na segunda etapa, apenas os OE inócuos para todas as linhagens de leveduras industriais foram testados. Assim, a segunda etapa, utilizou apenas os 21 OE descritos na Tabela 2 para testar a atividade bacteriostática e bactericida dos óleos essenciais em bactérias isoladas de processos de fermentação. A segunda etapa é abordada no Capítulo 4.

Tabela 2: Triagem de Óleos Essenciais em Leveduras Industriais.

Legenda: ■ OE sem atividade antimicrobiana para todas as linhagens de leveduras em todas as concentrações testadas
■ OE com atividade diferencial para as linhagens de leveduras avaliadas
■ OE com atividade para todas as linhagens avaliadas

ÓLEOS ESSENCIAIS	
1 <i>Aloysia gratissima</i>	2 <i>Aloysia triphylla</i>
3 <i>Artemisia annua</i>	5 <i>Cymbopogon winterianus</i>
4 <i>Varronia curassavica</i>	6 <i>Lippia sidoides</i>
9 <i>Piper abutiloides</i>	7 <i>Ocimum gratissimum</i>
10 <i>Piper aduncum</i>	8 <i>Origanum vulgare</i>
12 <i>Vetiveria zizanioides</i>	11 <i>Thymus vulgaris</i>
13 <i>Achyrocline satureioides</i>	17 <i>Cymbopogon citratus</i>
14 <i>Alpinia galanga</i>	18 <i>Cymbopogon martinii</i>
15 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	19 <i>Cyperus articulatus</i>
27 <i>Ocimum selloi</i>	20 <i>Elyonurus muticus</i>
28 <i>Pilocarpus microphyllus</i>	21 <i>Chenopodium ambrosioides</i>
29 <i>Pilocarpus pennatifolius</i>	22 <i>Eugenia uniflora</i>
31 <i>Schinus terbinthifolius</i>	25 <i>Mentha aquatica</i>
32 <i>Ruta graveolens</i>	30 <i>Pimenta Dióica</i>
34 <i>Piper caldense</i>	16 <i>Calea pinnatifida</i>
35 <i>Piper cernuum</i>	23 <i>Lippia alba</i>
36 <i>Piper marginatum</i>	24 <i>Melaleuca alternifolia</i>
37 <i>Piper mollicomum</i>	26 <i>Mentha piperita</i>
38 <i>Piper ovatum</i>	33 <i>Tagetes patula</i>
39 <i>Piper regnellii</i>	
40 <i>Photomorphe umbellata</i>	

Fonte: Elaborada pela autora.

2.7. REFERÊNCIAS

ANG-LEE, M.K.; MOSS, J.; YUAN, C.S. Herbal medicines and perioperative care. **JAMA**; 286(2):208- Pesquisa na Cadeia de Suprimentos de Plantas Aromáticas Capítulo 1 **10** 16. 2001.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p.446-475, 2008.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDAMARTOS M. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Ind. Crops Prod.**, 50:304–311. 2013.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679- 688, 2009.

BENTO, M.H.L.; OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P.; SAARINEN, M.T.;SCHULZE, H.; MYGIND, T.; FISCHER, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals-effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. **Vet.Med.**, 58, 449–458. 2013.

BERDY J. Bioactive microbial metabolites.A personal view.**J. Antibiot.**; 58: 1–26. 2005.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Anim. Feed Sci. Technol.** 158, 1-4, 2010.

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **The American Perfumer and Essential Oil Review**. 66, p.25-28, 1955.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiological**. 94 (3), p.223-253, 2004.

CARVALHO, J.R.P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* DC. **J.Ethnopharmacol.**, 95, 297-301, 2004.

COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; YU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Sci. Total Environ**. 545–546, 556–568. 2016. CONNER, D.E. **Naturally occurring compounds**. In Antimicrobials in Foods; Davidson, P. M., Branen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; 441-468.

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; NORONHA, H.S.M.; DUARTE, M.C. T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. **Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae)**. *Química Nova* v. 32, 78-81, 2009.

DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal Food Microbiology**, 5, 165-180. 1987.

DENGATE, S.; RUBEN, A. Controlled trial of cumulative behavioural effects of a common bread preservative. **J. Paediatr. Child Health**, 38, 373-376. 2002.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. 21: p.308-323, 2007.

ESSAM, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 130, 325-337, 2001.

FEIJÓ, E.V.R.da S.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L. C. do B. Light effects *Varroniacurassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 24, 516-523, 2014.

FITZGERALD, D.J.; STARTFORD, M.; NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. **Int. J. Food Microbiol.**, 86, 113-122, 2003.

FLEET, G. H. The commercial and community significance of yeasts in Food and Beverage Production in Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

FREIRES, I.A.; BUENO-SILVA, B.; GALVÃO, L.C.C.; DUARTE, M.C. T.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; ALENCAR, S.M.de; ROSALEN, P. L. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015.1-9, 2015.

GEORGE, D.R.; SMITHT, J.; SHIEL, R. S.; SPARAGANO, O.A.E.; GUY, J.H. Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. **Vet. Parasitol.** 161, 276-282, 2009.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. **Fitoterapia**. 79(3), p.199-203, 2008.

GORDON. C. R. 2009 FDA Sampling detects Antibiotics Residues in Ethanol Distillers Products. **National Grain and Feed Association Newsletter**, January 29, 2009. Disponível em <http://www.ngfa.org/files/misc/News1-29.pdf> (Acessado em 15 Outubro 2015).

GUENTHER, E., **The essential Oils** D. Van Nostrand, New York. 1948.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine** n.6, 1-93,2006.

HALBERSTEIN, R. A.Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns **Ann. Epidemiol.**15. 686-699, 2005.

HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.**J Appl. Microbiol.**, 86, 985-990, 1999.

JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. **J HerbmedPharmacol.**7(1):1-7. 2018.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils.**Current Medicinal Chemistry**, 10, 813-829, 2003.

KIM, S. I.; ROH, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H. S.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **J. Stored Prod.Res.** 39, 293-303, 2003.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and α -cymene. **Bioresource Technology**, Dec; 99(18) p.8788-95, 2008.

KOURKOUTAS, Y.; KARATZAS, K.A.G.; VALDRAMIDIS, V.P.; CHORIANOPOULOS, N. Bioactive Natural Products: Facts, Applications, and Challenges. **BioMed Research International**, Vol.2015

KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films.**J. Food. Sci.** 76, R164–R177. 2011.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFIN, L.; SANTOS, AC; FRIZZO, C.D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay **Planta Medica** 66, 476-477, 2000.

MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. **Foods**, 5, 18.2016.

MAZOYER, M.; ROUDART, L.**História das Agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**1933 [Tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]. São Paulo: Brasília, DF:NEAD, Editora UneSP –2010 586p.:il

MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. Botucatu, **13**, 298-304.2011.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **Int. J. Food Microbiol.**, 156, 7–17. 2012.

NYCHAS, J.E. Natural antimicrobials from plants. In: Goul, G.W. (Ed), New methods of food preservation. Blackie Academic and Professional, London, p.58-89, 1995.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S. SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* **Food Control**, 18, 414-420, 2007.

PEREIRA, R. A. N.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, VERA L. G.; GODOY, M. C. L. ; SILVA, A. F. **Uso de Plantas Medicinais na Terapêutica Animal**. Informe Agropecuário (Belo Horizonte), v. 31, p. 101-105, 2010.

PRIFTIS, K.M.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ANTHRACOPOULOS, M. B.; PAPADIMITRIOU, A.; NICOLAIDOU, P. Aims, methods and preliminary findings of the Physical Activity, Nutrition and Allergies in Children Examined in Athens (PANACEA) epidemiological study. **BMC Public Health**,7:140, 1471-2458. 2007.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils.**Industrial Crops and Products**, 62, 250–264, 2014.

RODRIGUES. F.F.; OLIVEIRA, L.G.;RODRIGUES, F.F.;SARAIVA, M.E.;ALMEIDA, S.C.;CABRAL, M.E.;CAMPOS, A.R.;COSTA, J.G.**Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from Cordia verbenacea DC leaves**Pharmacognosy Res. 4(3):161-165, 2012.

SABINI, L.I. Study of the cytotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp. **Molecular Medicinal Chemistry**, v.11, 31-3,2006.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N.Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*, **Appl Environ. Microbiol.**76, 6888-6894, 2010.

SANTOS, A. R.; BENGHI, T.G.S.; NEPEL, A.; MARQUES, F.A.; LOBÃO, A. Q.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L.N.S. Antiproliferative and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of Guatteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, 1- 6, 2017.

SANTOS, S.A.; CRISPIM, S.M.A.; FILHO, J.C.; POTT, A.; CARDOSO, E.L. **Substituição de Pastagem Nativa de Baixo Valor Nutritivo por Forrageiras de Melhor Qualidade no Pantanal**. EMBRAPA, Circular Técnica, nov, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 35, n.4, 275-280, 2004.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, **Foods**,5:43, 1-3, 2016.

SHAROPOV, F.; BRAUN, M.; GULMURODOV, I.; KHALIFAEV, D.; ISUPOV, S.; WINK, M. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from tajikistan. **Foods**. 4:645. 2015.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, p.29-44,1983.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-bourne pathogens. **Letters in Food Microbiology** 26, p118-122, 1998.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**. 18, p.463-470, 2001.

STEFANAZZI, N. STADLER, T. FERRERO, A. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Manag. Sci.**, 67, 639- 646. 2011.

STRATFORD M. **Food and Beverage Spoilage Yeasts**. In: Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences** 164(S3):93-102, 2003.

TYAGI, A. D.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M.E.; Chemical composition, in vitro anti- yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil . **LWT-Food Science and Technology**, 57 (2), 731-737, 2014.

TSERENNADMID, R.; TAKÓ, M.; GALGÓCZY, T.; PAPP, T.; PESTI, M.; VÁGVÖLGYI, C.; ALMÁSSY, K.; KRISCH, J., Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk **Int. J. Food Microbiol**, 144, 480-486, 2011.

VAN DE BRAAK; S.A.A.J.; LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Center for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p.16, 1999.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS,Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis*L.) essential oils. **Food Cont.** 19,1130-1138, 2008.

Capítulo 3

Atividade dos Óleos Essenciais em Leveduras

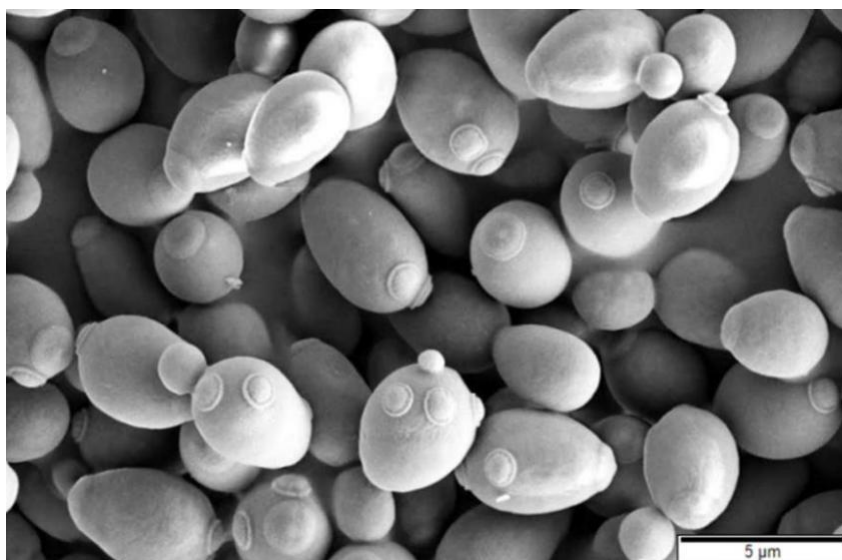


Figura 7: *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Mogana Das Murtey and Patchamuthu Ramasamy / CC BY- SA
(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)

Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds

Patrícia Regina Kitaka¹, Glyn Mara Figueira², Marta Cristina Teixeira Duarte³, Cláudia Steckelberg¹, Camila Delarmelina³, Valéria Maia de Oliveira, Maria da G.S. Andrietta¹

Capítulo publicado no livro Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2. Editora Atena. 2020

Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds

Patrícia Regina Kitaka¹, Marta Cristina Teixeira Duarte², Valéria Maia de Oliveira³, Maria da Graça S. Andrietta¹

Capítulo aceito para publicação para fazer parte do livro “Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia” Editora Atena. 2020

¹Division of Bioprocess, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

²Division of Agrotechnology, Puridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

³Division of Microbiology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁴Division of Microbial Resources, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

Capítulo publicado no livro Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2. Editora Atena. 2020

APRESENTAÇÃO

O presente capítulo traz a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre linhagens de leveduras, bem como os critérios de seleção e metodologia empregada para diferenciação molecular das linhagens. Na sequência seguem os Capítulos “***Sturdiness of baker’s yeast strains to natural bioactive compounds***”, publicado em 2020 no livro “Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2”, e “***Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds***”, que foi aceito para publicação e está no prelo para fazer parte do livro “Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia”. Ambos apresentam os resultados dos ensaios realizados para determinação de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as diferentes linhagens de leveduras.

3.1 INTRODUÇÃO

Para realizar a seleção das linhagens de leveduras a serem testadas nos ensaios de susceptibilidade aos óleos essenciais (OE), foram estabelecidos três grupos principais de linhagens de leveduras presentes nos processos fermentativos em usinas produtoras de bioetanol: 1) linhagens de padrões comerciais, 2) linhagens nativas e 3) linhagens de leveduras de panificação.

O primeiro grupo denominado linhagens de padrões comerciais, é composto por linhagens de leveduras isoladas de unidades industriais brasileiras e que já foram amplamente estudadas, caracterizadas e que, atualmente, são comercializadas. Estas linhagens são frequentemente utilizadas como “*starters*”, ou seja, como inóculo inicial para começar o processo fermentativo nas unidades sucroalcooleiras brasileiras. Tais linhagens são utilizadas isoladamente ou combinadas com outras linhagens.

Dentro deste grupo encontram-se as linhagens: Santa Adélia (SA-1); Pedra-2 (PE2); Catanduva (CAT-1); Barra Grande (BG-1) e FT858L, que foram obtidas a partir do acervo de leveduras do Laboratório de Bioprocessos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

O segundo grupo incluiu as linhagens nativas, isoladas a partir de amostras de fermentos provenientes de processos industriais de produção de bioetanol de diferentes usinas brasileiras situadas em quatro estados (Figura 8), que encaminham regularmente amostras de fermento para o Laboratório de Bioprocessos (CPQBA) para análises de identificação molecular e caracterização dessas linhagens.



Figura 8: Estados em que se situam as unidades industriais onde as linhagens de leveduras nativas foram isoladas.

O terceiro grupo é composto de linhagens de leveduras de panificação, que também são utilizadas nos processos de fermentação das unidades industriais no início da safra, embora não permaneçam por um período prolongado nos processos.

As linhagens de leveduras utilizadas estão listadas na Tabela 3 e são descritas mais detalhadamente nos capítulos “***Sturdiness of baker’s yeast strains to natural bioactive compounds***” e “***Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds***”, os quais são apresentados a seguir demonstrando os resultados oriundos dos ensaios de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as linhagens de leveduras.

Tabela 3: Linhagens de leveduras *Saccharomyces sensu stricto* utilizadas.

LEGENDA: MG – Minas Gerais; SP – São Paulo; MS – Mato Grosso do Sul; TO – Tocantins *
Identificação dos nomes de acordo com as especificações comerciais dos fermentos das unidades industriais foram substituídos por siglas para preservar a identidade das unidades

Linhagens de leveduras *Saccharomyces sensu stricto*

SA 1 – Linhagem padrão comercial Santa Adélia 1

PE 2 – Linhagem padrão comercial Pedra 2

CAT 1 – Linhagem padrão comercial Catanduva 1

BG 1 – Linhagem padrão comercial Barra Grande 1

FT858L - Linhagem padrão comercial FT858L

ANG – Linhagem padrão comercial ANGEL

DBP_AR – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em MG*

DBP_RV – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em SP*

DBP_SF – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em MS*

DBP_SM – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em SP*

DBP_BPA – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em TO*

DBP_CVG – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em MG*

DBP_TFT – Linhagem nativa isolada a partir da Unidade Industrial localizada em MS

SY_FFF – Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Forte**

SY_IMS - Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Forte Massa Sal**

ADY_DYS - Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Seco**

SDY_BMD - Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Massa Doce**

SDY_FMD Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Massa Doce**

SDY_IMD Linhagem de levedura de panificação isolada de *Fermento Massa Doce**

DBP_CLE – Linhagem considerada padrão isolada a partir da Unidade Industrial e mantida em laboratório por 20 anos

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 *Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds*

Patrícia Regina Kitaka¹, Glyn Mara Figueira², Marta Cristina Teixeira Duarte³, Cláudia Steckelberg¹, Camila Delarmelina³, Valéria Maia de Oliveira, Maria da Graça S. Andrietta¹

Capítulo publicado no livro Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2. Editora Atena. 2020

¹Division of Bioprocess, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

²Division of Agrotechnology, Puridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

³Division of Microbiology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁴Division of Microbial Resources, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2



Atena
Editora
Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Karine de Lima

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
 Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
 Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
 Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
 Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
 Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
 Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
 Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Instituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
 Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
 Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
 Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
 Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
 Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
 Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
 Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
 Profª Drª Gírlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
 Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
 Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
 Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
 Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhangüera de Brasília
 Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
 Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
 Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
 Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
 Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
 Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
 Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
 Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
 Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
 Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
 Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Profª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Livia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Profª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
 Profª Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
P474	Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia 2 [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-939-4 DOI 10.22533/at.ed.394202201 1. Microbiologia – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 579
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Temos o prazer de apresentar o segundo volume da obra “Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia”, contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos locais do país que apresentam análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

Conforme destacamos no primeiro volume, a microbiologia é um vasto campo que inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas. Como uma ciência básica a microbiologia utiliza células microbianas para analisar os processos fundamentais da vida, e como ciência aplicada ela é praticamente a linha de frente de avanços importantes na medicina, agricultura e na indústria. Os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e hoje possuímos ferramentas cada vez mais eficientes e acuradas que nos permitem investigar e inferir as possíveis enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

O potencial desta obra é enorme para futuras novas discussões, haja vista que enfrentamos a questão da resistência dos microrganismos à drogas, identificação de viroses emergentes, ou reemergentes, desenvolvimento de vacinas e principalmente a potencialização do desenvolvimento tecnológico no estudo e aplicações de microrganismos de interesse.

Portanto apresentamos aqui temas ligados à pesquisa e tecnologia microbiana são com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Parabenizamos à todos os envolvidos que de alguma forma contribuíram em cada capítulo e cada discussão, com destaque principal à Atena Editora que tem valorizado a disseminação do conhecimento obtido nas pesquisas microbiológicas.

Assim desejo a todos uma ótima leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

CAPÍTULO 14

STURDINESS OF BAKER'S YEAST STRAINS TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS

Data de aceite: 10/12/2019

Divisão de Bioprocessos CPQBA / UNICAMP
<http://lattes.cnpq.br/3835309163911239>

Patrícia Regina Kitaka

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Paulínia - SP,
Brazil
patricia.kitaka@gmail.com
<http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

Glyn Mara Figueira

Divisão de Agrotecnologia – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/3641295718619015>

Marta Cristina Teixeira Duarte

Divisão de Microbiologia – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/6011782448349535>

Cláudia Steckelberg

Divisão de Bioprocessos – CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/5958009384445882>

Camila Delarmelina

Divisão de Microbiologia CPQBA / UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/2818924682073419>

Valéria Maia de Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos CPQBA /
UNICAMP
<http://lattes.cnpq.br/3886687872358496>

Maria da Graça S. Andrietta

ABSTRACT: Briefly, this chapter provides an overview about baker's yeast strains, more specifically about the sturdiness of different yeast strains in the face of essential oils. General aspects of plant-derived essential oils are discussed, and some applications of these substances are lightly addressed. The sturdiness of the baker's yeast strains is reported for 31 plant-derived essential oils extracted from Brazilian and exotic medicinal and aromatic plants.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*; Baker's yeast strains; Essential Oils; Industrial applications

ROBUSTEZ DE LINHAGENS DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO A BIOATIVOS NATURAIS

RESUMO: Este capítulo fornece, resumidamente, uma visão geral sobre as linhagens de levedura de panificação, mais especificamente sobre a robustez das diferentes cepas destas levedura na presença de óleos essenciais. Aspectos gerais dos óleos essenciais derivados de plantas são discutidos e algumas aplicações dessas substâncias são levemente abordadas. A robustez das linhagens

de leveduras de panificação é relatada para 31 óleos essenciais derivados de plantas, extraídos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras e exóticas.

1 | BAKER'S YEASTS

In fermentation processes involving yeasts for industrial purposes, whether for the production of beverages such as beer, wine or spirits, or for the production of bread and bakery products, or in the symbiotic matrices with bacteria as kombucha or kefir, one microorganism should be highlighted: *Saccharomyces cerevisiae*.

This microorganism has shown remarkable attributes since ancient times, and plays an important role due to its versatility and capacity to act in different kinds of substrates (STRATFORD, 2006).

In the food industry, *S. cerevisiae* represent a significant part of the microorganisms employed as baker's yeast to produce bread and other bakery products in the fermentation processes. Inside this species, numerous strains are broadly used in industrial fermentation processes to produce not only bakery products, but also beer, wine, and bioethanol. Thus, it is necessary to know the characteristics of this microorganism and its behavior in different situations.

As mentioned above, *Saccharomyces cerevisiae* is widely used in different industrial segments, mainly in the food industry, in which the use of natural products free of synthetic additives has been a trend.

Recently, because of the higher demand for natural products and the development of green consumerism, plant-derived essential oils have been gaining popularity.

According to several authors, essential oils have long acted as flavoring agents in beverages and food. Besides that, they could be used as a natural source of antimicrobial compounds, and due to their versatility, they could have a great potential to replace synthetic additives as natural agents for food preservation (DEANS; RITCHIE, 1987; CONNER, 1993; BURT, 2004; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

More recently, natural products are in the spotlight, and they have been highly valued by several industrial segments. In the food industry, their visibility has led to many studies using plant-derived essential oils focusing on antimicrobial and antioxidant properties (KUORWEL et al., 2011; KALEMBA, KUNICKA, 2003; NEGI, 2012).

Despite the amount of studies and articles concerning the application of essential oils as potential antimicrobials and as food preservatives, in the industrial segments, very few reports have demonstrated their direct application in processes which use *Saccharomyces cerevisiae*.

As referred to previously, this important microorganism is used as baker's yeast in order to produce bread and other bakery products. In addition, there are several strains with different characteristics responsible for their wide application in several industrial segments as a platform for fermentation processes.

In this study, we took a step toward exploring this question by conducting an initial

baker's yeast characterization in order to determine the sturdiness profile from different yeast strains in the face of several essential oils extracted from Brazilian native plants and also exotic plants.

For this reason, baker's yeasts were previously evaluated considering their genetic identification in a sub specific level using molecular fingerprint tools.

2 | STRAINS DIFFERENTIATION

Our study involved six microorganisms belonging to three different commercial baker's yeasts.

The baker's yeasts strains were isolated from baker's yeast samples commercially used in Brazil and all of them are identified as *Saccharomyces cerevisiae*. This yeast species has an important and strong impact in the food and beverage industries.

Firstly, all commercial baker's yeasts were grown using the spread-plating technique, in which a small sample is spread over the surface of an agar plate in order to evaluate the biotypes, i.e., we evaluated the morphology of discrete colonies formed across the surface of the WL Nutrient medium agar (WLN, DIFCO 242420).

After that, we used a streak-plating technique to check the purity of the culture of yeast. Then, single colonies, which are comprised of millions of cells growing in a cluster on an agar plate, were transferred to another plate using the spread-plate technique. Thus, the pure microorganisms were grown in petri dishes with Potato Dextrose Agar medium (PDA, DIFCO 213400) to be submitted to DNA extraction protocol (BIDENNE et al., 1992 modified; OAKLEY-GUTOWSKI et al., 1992 modified; ARGUESO, et al. 2008).

All isolates were distinguished by an electrophoretic karyotyping profile obtained from pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This technique consists of the separation of intact chromosomal DNA according to its size on a gel matrix of agarose. According to the number and size of the chromosomes present in each strain, specific banding patterns were obtained.

In a different way to conventional DNA electrophoresis, which is able to separate molecules of up to 50 kilobases, PFGE is able to do the separation of large DNA molecules, as yeast chromosomes, which range from several hundred to several thousand kilobases (ZIMMERMAN; FOURNIER, 1996). It is possible because this technique uses an electric field that periodically changes direction in a gel matrix of agarose.

Unquestionably, nowadays there is an immense variety of molecular techniques for the identification of microorganisms. Nonetheless, not all of them are able to have sufficient sensitivity to distinguish some microorganisms at the sub-specific level, i.e., by distinguishing among different strains.

According to VILANOVA et al. (2007), PFGE has a greater discriminatory power when compared to mtDNA restriction analysis for *Saccharomyces cerevisiae* yeast

clones. Therefore, this greater resolution in the power of differentiation among strains makes it better suited for the detection of genetic diversity in yeasts.

For this reason, we used PFGE to do the differentiation of baker's yeast strains. Below we present the DNA electrophoretic profile for all baker's yeast strains evaluated (Figure 1). The terms used to name the baker's yeast groups were established based on the commercial description: (ADY Active dry baker's yeast; SDY Sweet dough baker's yeast; SY strong baker's yeast).

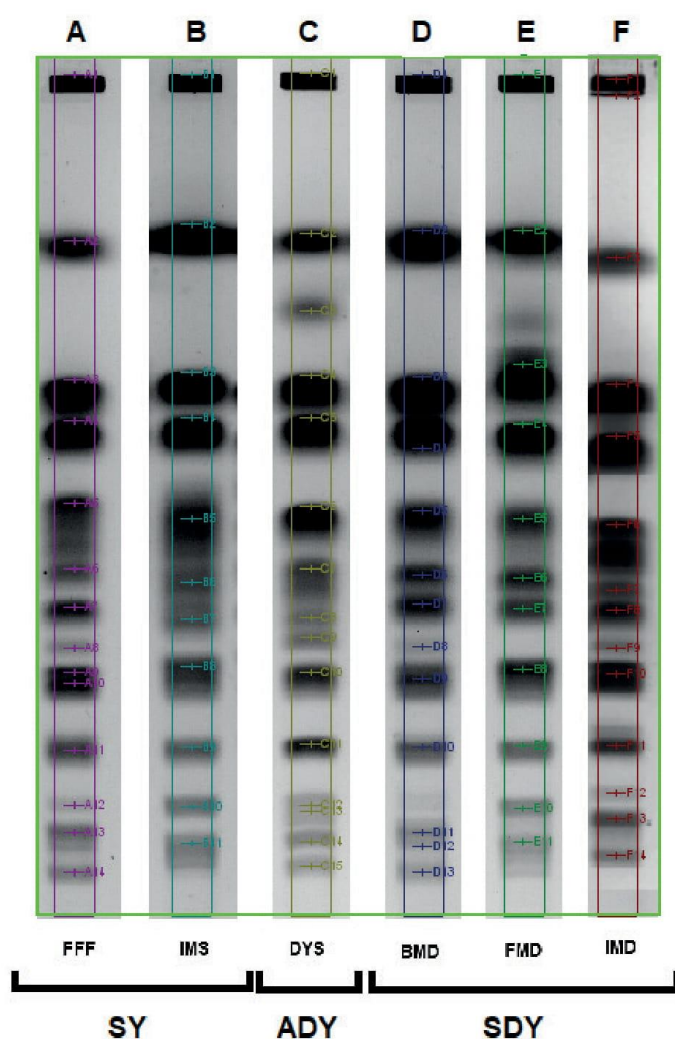


Figure 1: Genomic DNA electrophoretic profile of baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) obtained using PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) in agarose gel 0.8%. Image acquisition by UVP Vision Works LS system. (A) Strain FFF; (B) Strain IMS; (C) Strain DYS; (D) Strain BMD; (E) Strain FMD; (F) Strain IMD.

The differentiation among the yeast strains was established by the DNA electrophoretic profile comparison. Figure 2 illustrates the analysis results using PFGE and UVP Vision Works L.S. systems.

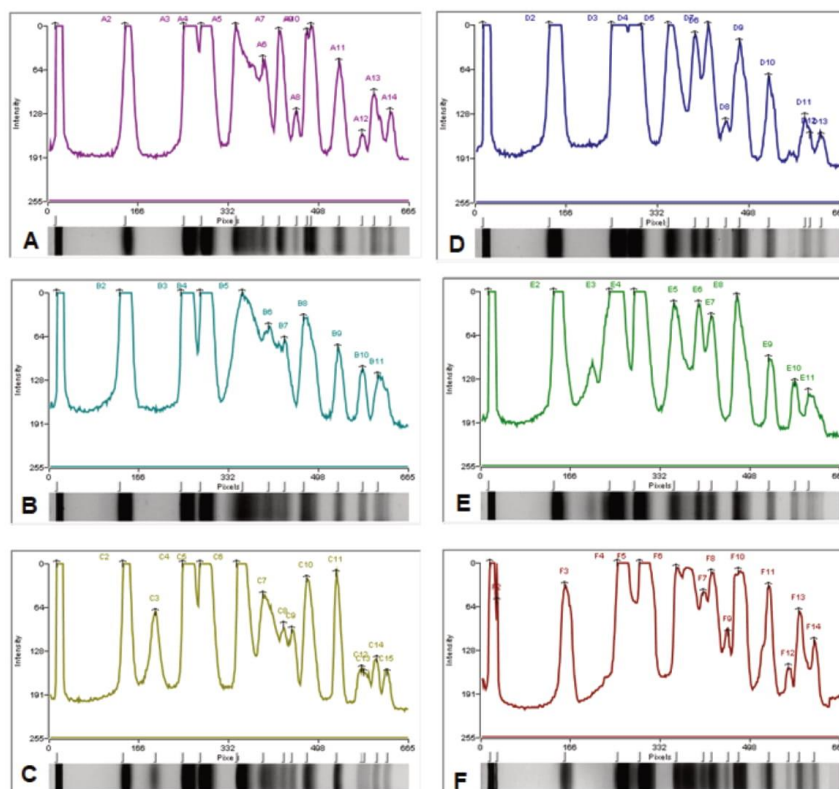


Figure 2: Differentiation among baker's yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*). Comparative of genomic DNA electrophoretic profile. Image acquisition and differentiation analysis system by UVP Vision Works LS. (A) Strain FFF; (B) Strain IMS; (C) Strain DYS; (D) Strain BMD; (E) Strain FMD; (F) Strain IMD.

After the PFGE analysis, six strains were identified as different yeast strains. Each one was tested with 31 plant-derived essential oils.

The next session presents some concepts about plant-derived essential oils, reveals the essential oils studied, and summarizes some findings from our studies with baker's yeast strains' sturdiness to these compounds.

3 | ESSENTIAL OILS

Recently, synthetic additives have been accused of causing toxic and carcinogenic effects, and the consumer concerns regarding healthier food options have increased. As a result, the popularity of natural products has been blasting and the demand for alternatives to synthetic food additives has gained significant market share.

Given the fact that plant-derived essential oils (EOs) contain volatile components with antimicrobial and antioxidant activities and have been used for centuries for medicinal and cosmetic purposes, as well as flavor and fragrance markets, they would be strong candidates to this replacement (HAMMER et al., 1999; HALBERSTEIN, 2005; Gurib-Fakim, 2006; MARÍN et al., 2016; Jamshidi-Kia et al., 2018).

Plant-derived essential oils are a mixture of several compounds, with different chemical origins. Their composition vary and could include terpenes, alcohols, acids, esters, epoxides, aldehydes, ketones, amines, and sulfides. These complex aromatic and volatile mixtures could be obtained from different plant materials such as leaves, flowers, buds, roots, and barks (GUENTHER, 1948; BURT, 2004). The production of these phytochemicals is mentioned by several authors as a stress response of the plants, which possess a wide range of tools to combat pathogenic infections (THEIS; LERDAU, 2003).

In addition, these complex mixtures extracted from plants have high potential to scale down the use of synthetic compounds, which are widely used by the food industry to control undesirable contaminants, since they have important properties, like antimicrobial and antioxidant actions (DEANS; RITCHIE, 1987; HAMMER et al., 1999; BURT, 2004; SARTORATTO et al., 2004; SENDRA, 2016).

In this study, 31 plant-derived essential oils were used. These essential oils were extracted from plants belonging to the Medicinal and Aromatic Plant Collection (CPMA) of the Chemical, Biological and Agricultural Multidisciplinary Research Center (CPQBA) at University of Campinas (UNICAMP), in Brazil.

The sturdiness of 6 different strains of *S. cerevisiae*, previously identified and differentiated, was established considering their capability to grow in the face of different essential oils, in all concentrations evaluated.

The sturdiness was inferred from the growing ability considering the inhibitory effect of the plant-derived essential oils (EOs) using the microdilution test and determining Minimal Inhibitory Concentration - MIC (NCCLS, 2002) for each of the 31 essential oils. Figure 3 summarizes the results from the experiments with the 31 EOs in different concentrations, in which we catalogue the resistance profiles of all baker's yeast strains studied.

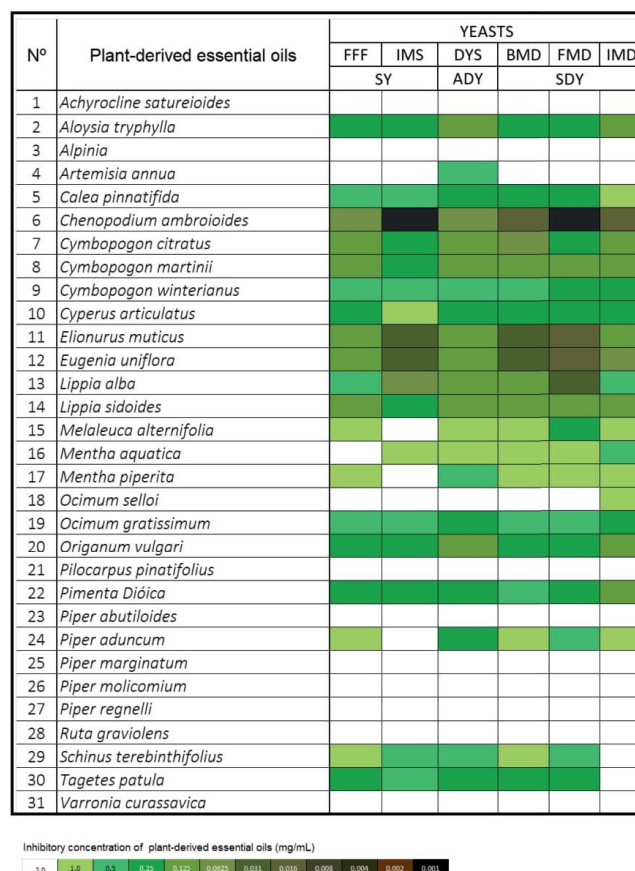


FIGURE 3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) - Effect of plant-derived essential oils on baker's yeast strains growth.

4 | RESULTS

The convergence among resistance or susceptibility profile comparing all strains demonstrated a similarity of 75%, considering all OE evaluated. In other words, the robustness profile differed among the 3 groups of yeasts studied for only 8 essential oils. (*Artemisia annua*; *Melaleuca alternifolia*; *Mentha aquatica*; *Mentha piperita*; *Ocimum gratissimum*; *Schinus terebinthifolius*; *Piper aduncum* and *Tagetes patula* essential oils).

Considering all EOs, the strains presented an average robustness of 35%. The strains commercially referred as Strong Yeast revealed greater sturdiness, achieving 45% for one strain and an average of 42%, comparatively (Figure 4).

Contrastingly, DYS yeast strain, belonging to Active dry yeast (ADY) group, showed the worst sturdiness pattern to all essential oils evaluated (Figure 4).

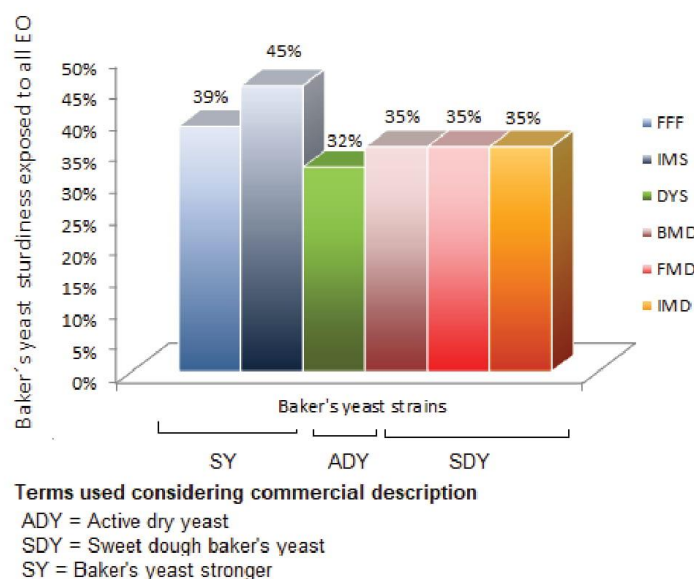


FIGURE 4 Baker's yeast sturdiness considering all essential oils evaluated.

For the groups in which two or more strains were tested, the same robustness pattern was observed in the different strains inside the same group. Interestingly, although the strains were isolated from yeasts of distinct brands/suppliers, the same standard of robustness was observed for different lineages of the same group (Figure 4).

All strains were resilient to EO of *Varronia curassavica* (sin = *Cordia verbenaceae* DC.); *Achyrocline*; *satureioides*; *Pilocarpus pinatifolius*; *Ruta graveolens*; and several species of *Piper* sp., in all tested concentrations.

Distinctly, most of the baker's yeast strains have presented slight inhibitory growth pattern in the face of *Artemisia annua*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha aquatica* and *Mentha piperita* essential oils, in which concentrations can reach 0,5mg/mL.

Conversely, the essential oils extracted from: *Cymbopogon citratus*; *Cymbopogon martini*; *Cyperus articulatus*, *Elionurus muticus*; *Chenopodium ambrosioides*; *Lippia alba*; *Pimenta dióica* and *Tagetes patula*, were very harmful for all the yeasts assessed in much lower concentrations of EOs.

5 | FINAL CONSIDERATIONS

This chapter provided the characterization of several baker's yeast strains, including the genetic differentiation among strains and the establishment of the sturdiness profile using essential oils obtained from native Brazilian plants and exotic ones.

Despite the significant number of research studies of plant-derived essential oils as

potential food preservatives, antioxidants and antimicrobials, extremely few show their application in processes using *Saccharomyces cerevisiae* as fermentation platforms.

In this chapter, both the sturdiness of different baker's yeast strains in the face of several EOs and the inhibitory effect of them, were discussed.

Generally, the yeast strains' robustness presented results convergence, i.e., the same EO inhibitory effect was observed for different strains for one specific plant-derived essential oil.

Although there is a general convergence of results regarding the robustness of the strains against one specific OE, especially in the case of lineages of the same group or commercial classification, the results related to the concentrations of EO highlighted the need to evaluate sturdiness of the strains with different essential oils, even if they belong to plants of the same genus.

On the one hand, the results demonstrate that the sturdiness of baker's yeast strains distinctly vary when submitted to essential oils, but on the other hand, it is not possible to predict the effect of EO extracted from plants belonging to the same plant family or genus.

For some groups (family or genus), the results of yeast robustness point toward the same pattern. One example is the yeast strains' sturdiness presented with EOs extracted from the vast majority of plants belonging to the genus *Piper* sp. and the genus *Mentha* sp. By contrast, in other cases, the sturdiness to EOs extracted from plants belonging to the same plant genus is not necessarily similar, as EOs extracted from *Ocimum* spp plants demonstrated significant difference in the baker's yeast sturdiness profile.

Furthermore, the sensitivity profile of baker's yeast strains in the face of essential oils with a high harmful effect exhibited a more convergent outcome. One example is the inhibitory effect of EOs extracted from plants belonging to family Verbenaceae and Poaceae. EOs extracted from *Lippia* spp. (family Verbenaceae) and *Cymbopogon* spp. (family Poaceae), were very toxic for all the baker's yeast strains, presenting similar harmful effects against all of them.

In short, not only the baker's yeast sturdiness results, but also the essential oils inhibitory effect results were significant and have implications on technological applications for both the food industry and other industrial segments that use *Saccharomyces cerevisiae* strains.

Finally, these findings open new perspectives for the industrial application of bioactives as plant-derived essential oils.

6 | ACKNOWLEDGMENT

CAPES /PROEX and CPQBA/UNICAMP for financial support.
Genetics and Molecular Biology Graduate Program at Biology Institute, UNICAMP.
Bioprocess, Microbiology, Agrotechnology, Organic Chemistry/ Pharmaceuticals
and Microbial Resources Divisions teams by the technical support.

REFERENCES

- ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. PNAS 105 (33) 11845-11850; 2008.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>
- BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet 22, 1-7. 1992.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, p.223-253, 2004.
- CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In Antimicrobials in Foods; Davidson, P. M., Branen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; pp 441-468.
- DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal Food Microbiology 1987, 5, 165-180
- GUENTHER, E., The essential Oils D. Van Nostrand, New York. 1948
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. Molecular Aspect of Medicine n6, p1-93, 2006
- HALBERSTEIN, R. A.Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns Ann. Epidemiol. 15 686-699, 2005.
- HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant-extracts. J Appl. Microbiol., 86, 985-990, 1999
- JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. J Herbmed Pharmacol. 2018;7(1):1-7. doi: 10.15171
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, 10, 813-829, 2003.
- KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. J. Food. Sci. 2011, 76, R164–R177.
- MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. Foods 2016, 5, 18.
- NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int. J. Food Microbiol. 2012, 156, 7–17.

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. *Am. Soc. Brew. Chem.* v.50, p. 48–52, 1992.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M.. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.. *Brazilian Journal of Microbiology*, Brasil, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, *Foods*,5:43, 1-3, 2016.

STRATFORD M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164(S3):93-102, 2003

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* J. *Int. Sci. Vigne Vin*, 41, n°3, n°3, 155-159, 2007.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3

3.3 *Industrial yeast strains resistance to natural bioactive compounds*

Patrícia Regina Kitaka¹, Marta Cristina Teixeira Duarte², Valéria
Maia de Oliveira³, Maria da Graça S. Andrietta¹

Capítulo publicado no livro “Projetos Inovadores e Produção
Intelectual na Microbiologia” Editora Atena. 2020

¹Division of Bioprocess, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

²Division of Agrotechnology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

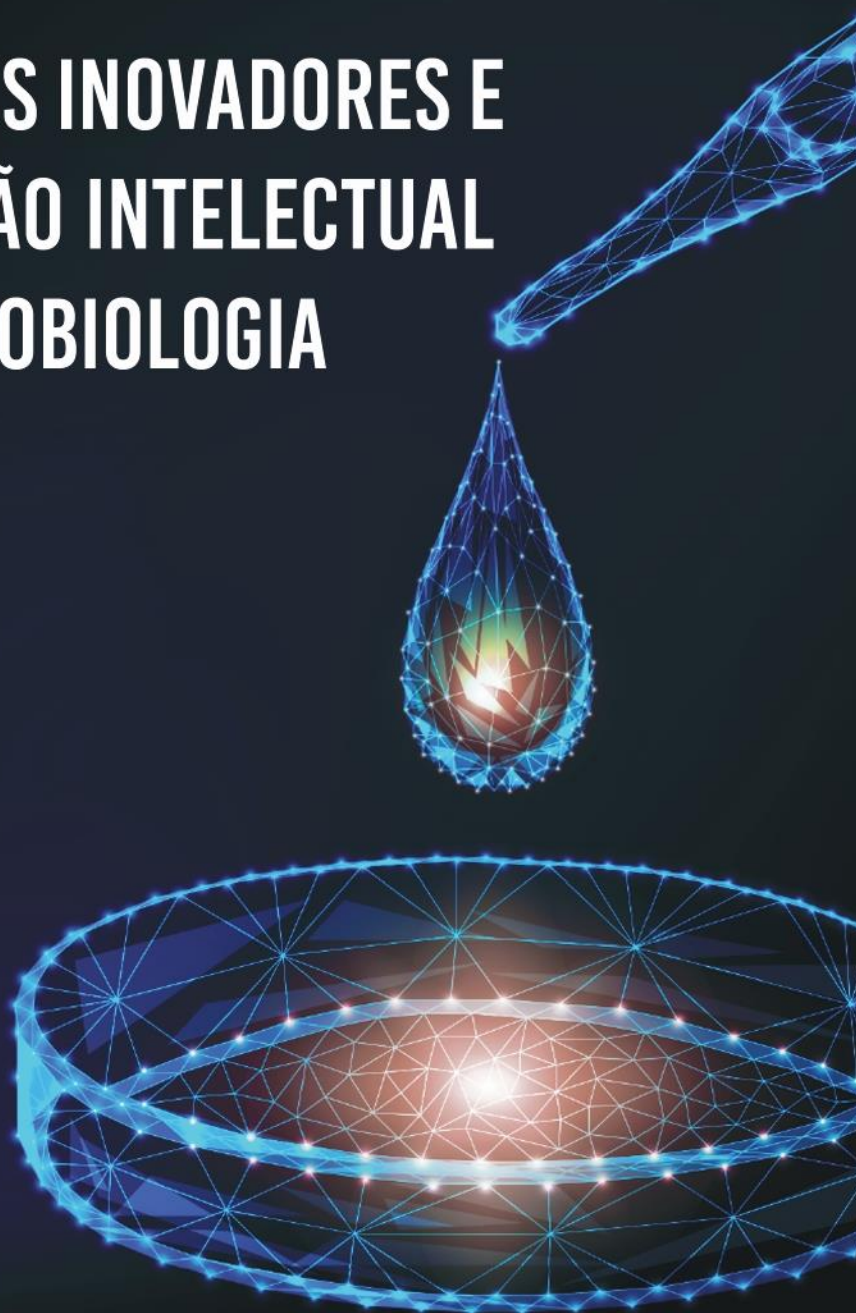
³Division of Microbiology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁴Division of Microbial Resources, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO
(ORGANIZADOR)

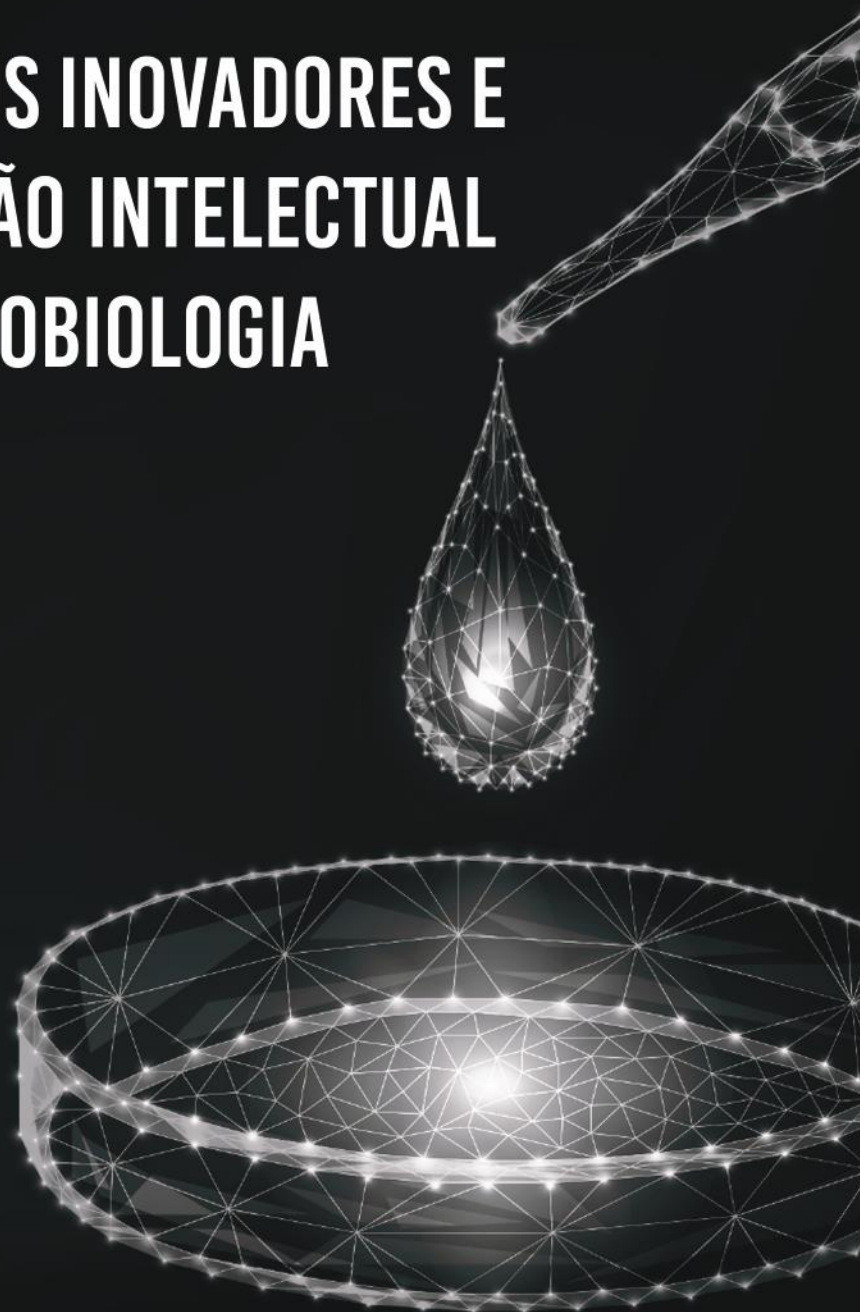
PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA

 **Atena**
Editora
Ano 2020



BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO
(ORGANIZADOR)

PROJETOS INOVADORES E PRODUÇÃO INTELECTUAL NA MICROBIOLOGIA



Atena
Editora
Ano 2020

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Assistentes Editoriais

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto Gráfico e Diagramação

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Imagens da Capa

Shutterstock

Edição de Arte

Luiza Alves Batista

Revisão

Os Autores

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Atena
Editora
Ano 2020

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense
 Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília
 Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
 Profª Drª Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá
 Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará
 Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
 Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros
 Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
 Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador
 Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
 Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas
 Profª Drª Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
 Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
 Profª Drª Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
 Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
 Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
 Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
 Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
 Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
 Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
 Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
 Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
 Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
 Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
 Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
 Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
 Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
 Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
 Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
 Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
 Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
 Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
 Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
 Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
 Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
 Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
 Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
 Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
 Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
 Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
 Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
 Prof. Dr. Elói Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro
 Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
 Profª Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
 Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
 Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Profª Drª Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Linguística, Letras e Artes

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Drª Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará
 Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná
 Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
 Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste
 Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
 Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
 Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
 Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí
 Prof. Me. Alexsandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional
 Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
 Profª Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa
 Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia
 Profª Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá
 Profª Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
 Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
 Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
 Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
 Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
 Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
 Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa
 Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
 Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia
 Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
 Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás
 Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás
 Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Me. Gustavo Krahel – Universidade do Oeste de Santa Catarina
 Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
 Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Me. Javier Antonio Alborno – University of Miami and Miami Dade College
 Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
 Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social
 Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFGA
 Prof. Dr. Kápio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos
 Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior

Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo

Profª Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará

Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco

Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal

Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba

Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profª Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão

Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo

Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana

Profª Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí

Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo

Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
 Bibliotecária: Janaina Ramos
 Diagramação: Maria Alice Pinheiro
 Correção: Mariane Aparecida Freitas
 Edição de Arte: Luiza Alves Batista
 Revisão: Os Autores
 Organizador: Benedito Rodrigues da Silva Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
P964	Projetos inovadores e produção intelectual na microbiologia / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2020. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-574-7 DOI 10.22533/at.ed.747201711 1. Microbiologia. 2. Projetos. 3. Produção. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da (Organizador). II. Título. CDD 579
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná – Brasil
 Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos.

APRESENTAÇÃO

Amicrobiologia tem sido um assunto recorrente nos últimos anos, desde os corredores universitários aos locais informais, as conversas vão desde as bactérias multirresistentes, passando por novas espécies de fungos descobertos até chegar no atual momento de pandemia viral que marcará na história o ano de 2020. Esse campo de estudo amplo inclui o estudo dos seres vivos microscópicos nos seus mais variados aspectos como morfologia, estrutura, fisiologia, reprodução, genética, taxonomia, interação com outros organismos e com o ambiente além de aplicações biotecnológicas.

Como ciência, a microbiologia iniciou a cerca de duzentos anos atrás, e tem passado por constantes avanços graças a descobertas e inovações tecnológicas. Sabemos que os microrganismos são encontrados em praticamente todos os lugares, e a falta de conhecimento que havia antes da invenção do microscópio hoje não é mais um problema no estudo, principalmente das enfermidades relacionadas aos agentes como bactérias, vírus, fungos e protozoários.

A grande importância dessa temática se reflete no material de qualidade já publicado na Atena Editora e mais uma vez recebe os nossos holofotes com o tema “Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia” contendo trabalhos e pesquisas desenvolvidas em diversos institutos do território nacional contendo análises de processos biológicos embasados em células microbianas ou estudos científicos na fundamentação de atividades microbianas com capacidade de interferir nos processos de saúde/doença.

Temas ligados à inovação e tecnologia microbiana são, deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de acadêmicos, mestres e todos aqueles que de alguma forma se interessam pela saúde em seus aspectos microbiológicos. Deste modo, propomos aqui uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos em diferentes campos da microbiologia, abrindo perspectivas futuras para os demais pesquisadores de outras subáreas da microbiologia.

Desejamos a todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

CAPÍTULO 9

INDUSTRIAL YEAST STRAINS RESISTANCE TO NATURAL BIOACTIVE COMPOUNDS

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 16/09/2020

Patrícia Regina Kitaka

Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Paulínia - SP,
Brazil

<http://lattes.cnpq.br/8916720523524200>

Marta Cristina Teixeira Duarte

Divisão de Microbiologia - Centro
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP,
Paulínia - SP, Brazil

<http://lattes.cnpq.br/6011782448349535>

Valéria Maia de Oliveira

Divisão de Recursos Microbianos - Centro
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP
<http://lattes.cnpq.br/3886687872358496>

Maria da Graça S. Andrietta

Divisão de Bioprocessos - Centro
Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas
Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP
<http://lattes.cnpq.br/3835309163911239>

ABSTRACT: This chapter briefly provides an overview about industrial yeast strains, more specifically about yeast strains applied in the fermentation processes in Brazilian fuel-ethanol production industry. In the first section, historical aspects of fermentation and the use of yeast

strains in Brazil are discussed and the concepts about selected yeast and native autochthonous, yeast strains are lightly addressed. Subsequent sections present the molecular differentiation among yeast strains and a brief explanation about the industrial application of natural bioactives, especially essential oils. Finally, the resistance profile of 20 industrial yeast strains is reported for 40 plant-derived essential oils, extracted from Brazilian and exotic medicinal and aromatic plants.

KEYWORDS: *Saccharomyces sensu stricto* group; yeast strains; Essential Oils; Industrial applications

RESISTÊNCIA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS A COMPOSTOS BIOATIVOS NATURAIS

RESUMO: Este capítulo fornece resumidamente uma visão geral sobre cepas de leveduras industriais, mais especificamente sobre cepas de leveduras aplicadas nos processos de fermentação na indústria brasileira de produção de etanol-combustível. Na primeira seção, aspectos históricos da fermentação e do uso de cepas de levedura no Brasil são discutidos e os conceitos sobre leveduras selecionadas e cepas de leveduras autóctones nativas são levemente abordadas. As seções subsequentes apresentam a diferenciação molecular entre cepas de leveduras e uma breve explicação sobre a aplicação industrial de bioativos naturais, especialmente óleos essenciais. Finalmente, é relatado o perfil de resistência de 20 cepas de leveduras industriais para 40 óleos essenciais de origem vegetal, extraídos de plantas medicinais e

aromáticas brasileiras e exóticas.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharomyces sensu stricto*; linhagens de levedura; Óleos essenciais; Aplicações industriais.

1 | FERMENTATION AND YEASTS – HISTORY AND BRIEF OVERVIEW

Humans have adopted fermentation practices to produce fermented foods and alcoholic beverages since ancient times, although the protagonist of this process stayed “invisible” for centuries, being used through empirical observations without knowing their chemical and microbiological bases (AMORIM et al., 2005).

Inventions and innovations using fermentation and yeasts were done along the history based on observations and almost no knowledge about microorganisms, including the presence of yeasts as the main element in the fermentation processes. As a matter of fact, it would be several centuries of years before it was even known that microscopic organisms existed.

Antonie van Leeuwenhoek was the first to observe cells using a primitive microscope in 1680, when the seeds of Microbiology were sown.

Since then, scientific information has grown at an exponential rate. In some fields such as Chemistry and Biology, especially in Microbiology and Biotechnology this explosion of knowledge is more evident. This progress has been impacted by some of the most significant names in the history of sciences, including van Leeuwenhoek, Lavoisier, Gay-Lussac, Pasteur, Buchner and Koch.

More recently, important names in modern science argued that “*the most important test tube in the birth and growth of the modern life sciences is the fermenter*”, and “*the most important model organism has been the yeast *Saccharomyces cerevisiae**”, commonly known as baking yeast, brewing or wine yeast (CHAMBERS; PRETORIUS 2010).

2 | YEASTS

Yeasts have been widely studied and used to produce value-added products by different industrial segments. One clear example is the origin of the word enzyme - ‘en’ meaning within and ‘zyme’ meaning leaven. Yeasts have been an important part of pioneer works in several fields, particularly in life sciences as Microbiology and Enzymology (BARNETT, 1998, 2000; BARNET & LICHTENTHALER, 2001).

Among the yeasts, *Saccharomyces* genus should be highlighted because microorganisms inside this group were the first domesticated microorganisms. Besides that, they usually are related to several fermentation processes for industrial purposes.

In Brazil, as much as all over the world, the relevance of *Saccharomyces* genus covers most important biological systems, since it is highly employed as an eukaryotic organism model as well as widely used in industrial processes like bakery, wine industry

and brewery due to its key role in fermentative process.

However, in Brazil these yeasts go beyond the application in conventional industrial segments and have a very important role in the biofuels industry. That is the reason why it is so necessary to know the characteristics of these microorganisms and their behavior in different situations.

3 | YEASTS AND FERMENTATION PROCESSES IN BRAZILIAN FUEL-ETHANOL PRODUCTION INDUSTRY

Brazil has taken a notorious place in the biofuels worldwide scenario.

Nowadays, Brazil is the largest sugarcane's bioethanol producer in the world, producing over 30 billion liters in 2019 (UNICA, 2019; UDOP, 2020).

Although this country has been producing ethanol since the 1930s through fermentation processes, at that time serendipity presumably played an important role in the process since fermentations resulted from empirical observations of natural events. Indeed, the experience with the processes were generated in harnessing repeat 'experiments' in which the improvements were made by trialling modifications to practices and were communicated down through the generations, retaining the results that were beneficial and discarding those that failed (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

It was just in the 1990s that Brazilian distilleries started to use yeasts referred to as pure, purchased by manufacturers with required characteristics for the fermentation processes to industrial production of fuel-ethanol (AMORIM et al., 2011).

One might argue that the early use of yeasts in bioethanol production was based on little or no knowledge of microbiology that drives fermentation. In fact, it would be several decades before it was even known population dynamics of microorganisms in the fermentative processes.

Since then, several scientific groups have dedicated efforts to unravel the fermentation process in order to understand the major actor in this process - the yeasts.

The power of change which the understanding about these simple, unicellular microorganisms have caused in life science related to the fuel-ethanol industry could be described as a revolution.

This scientific revolution in bioethanol industry, range from prospection and identification methods, as done by Basso et al. (2008) until the potential modification for different applications described by Argueso et al. (2009) and Gu and Oliver (2009), passing through the characterization of the biodiversity of strains, as studied by Steckelberg (2001), Basso et al. (2004) and Tosetto (2008).

Nevertheless, until nowadays it is a challenge to understand completely the fermentation processes and all the dynamics related to this useful microorganism which has played a pivotal role in this process - *Saccharomyces cerevisiae*.

One of the reasons why it is difficult to reveal all the answers regarding the difficulties to be overcome in Brazilian fermentation processes could be explained by the operational conditions.

Most industrial processes installed for biofuel production in that country, use yeast cell recycling. However, this strategy promotes operations with high cell concentration, and dynamizes the fermentation, making it faster. On the other hand, these choices allow conditions favorable to grow contaminating bacteria and yeasts.

Besides that, fuel-ethanol industrial fermentations processes are subject to huge selective pressure considering oscillation in several attributes as temperature, pH, ethanol and sugar concentrations along all the process and also during the harvest season period, resulting in the growth and persistence of yeasts adapted to stress conditions.

For this reason, the fuel-ethanol industry has been incessantly trying to overcome the problems with the main bottleneck in the process – fermentation and, consequently, yeasts.

Saccharomyces cerevisiae has shown remarkable attributes and plays an important role in fermentation processes due to its versatility and capacity to act in different kinds of substrates (STRATFORD, 2006).

However, there are many differences inside the universe of *Saccharomyces* sp. This understanding just surfaced because of the explosion of knowledge sparked by the advent of gene technology which drove a convergence of several fields of life sciences, under the banner of molecular biology (CHAMBERS; PRETORIUS 2010).

Molecular biology brought light to several parts of biology, clarifying several processes and explaining the development of some microorganisms, including the yeasts. This newest approach enabled us to understand them and explain why yeasts inside of the same species might present a completely different characteristics and behavior in fermentation. So, the molecular biology tools allowed us to know different strains inside the group of *Saccharomyces sensu stricto*.

Therefore in the transition from the 20th to 21st century, researchers dedicated to unveil the Brazilian fermentation processes on fuel-ethanol production and selected some yeast strains, belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, from different industrial units. From that, five strains (BG1; CAT1; FT858; PE2 and SA1) are being produced and commercialized to be used as starter yeast inoculum at the beginning of the harvest season period.

According to Andrietta et al. (2011) the names of these strains are related to their original industrial unit from which they were isolated. Thereby, BG1 strain correspond to a yeast strains isolated from Usina Barra Grande de Lençóis S/A; whereas CAT1 strain was isolated from Catanduva unit, belonging to Virgolino de Oliveira S/A Açúcar e Alcool Group; PE2 strain was selected from Pedra Agroindustrial S/A unit and SA1 strain was originally isolated from Usina Santa Adélia S/A unit. Differently from these four strains, FT858 strain

was named after its isolation by Fermentec Ltda, a biotechnology Brazilian company. All these industrial units, as well as Fermentec, are located in the state of São Paulo in Brazil.

Thus, Brazilian distilleries, in the early 2000s, started to use these selected industrial yeast strains in their fermentation processes.

In 2006, on the study presented by Basso et al. (2008), it was mentioned that 190 bioethanol plants among the 329 Brazilian distilleries were using industrial selected yeast strains.

In the last decade, our group compiled the information about the yeast strains used as inoculum to start up the alcoholic fermentation at the beginning of harvest season by 125 Brazilian industrial units, from 2011 to 2018, as shown in Figure 1.

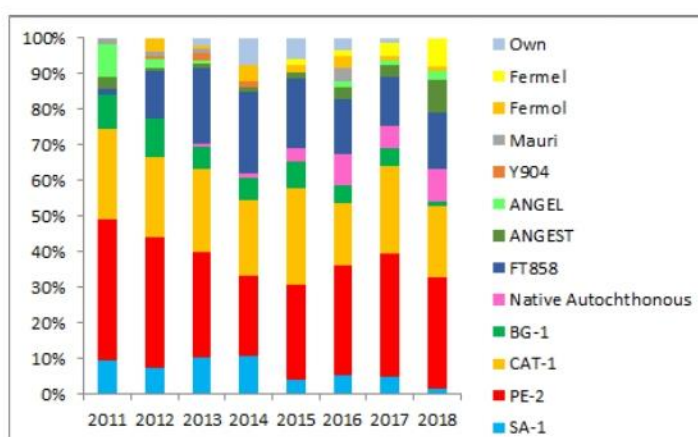


Fig.1 Historical use of starter yeasts strains in Brazilian fuel-ethanol production processes in the harvest season periods from 2011 to 2018. All the terms used to refer to the yeasts are abbreviations or commercial names, except to “Native autochthonous” and “Own”. The expression “own” yeast is used to refer to a mixture of yeasts stored at the end of one harvest period and used in the next harvest season period as inoculum, without any identification or characterization. All these information was sourced by personal communication with 125 the Brazilian distilleries during the period evaluated.

Figure 1 shows the historical use of yeast strains to start up the alcoholic fermentation in 125 Brazilian fuel-ethanol production processes, along the harvest season periods from 2011 to 2018. The names of the yeasts inside the figure refer to its commercial names. We referred to “Native autochthonous”, yeasts which were isolated from each industrial fermentation process, identified and characterized previously. The expression “Own” is used to refer to a mixture of yeasts stored at the end of one harvest period and used in the next harvest season period as inoculum without any identification or characterization. In this way “own” does not refer to one specific strain, it is a mixture of undetermined strains. All this information was based on personal communication with 125 the Brazilian distilleries

during the period evaluated.

As mentioned above, generally, the hard conditions in fermentation processes in the industrial context lead to a huge selective pressure over the microorganisms, especially yeasts, originating a driven natural selection of strains.

Despite of the continuous use of selected yeast strains in the industry, several researches related to yeasts population dynamics in Brazilian fermentation processes along the harvest season, have shown the replacement of these strains, as put forth by Steckelberg et al. (2017).

New approaches of yeast strains use have arisen from this deeper knowledge about the yeast strains population dynamics.

Recently, indigenous yeast strains, previously considered as a problem in the fermentation processes, once they replaced selected yeast strains during the harvest season period, were reclassified as native autochthonous yeast lineages with high potential to be used after identification and characterization analysis.

So the fermentation processes became a huge source of biodiversity and possible solutions to improve their own processes.

For this reason, in this study we used twenty yeast strains with three different profiles: 6 baker's yeast strains; 6 selected yeast strains and 7 native autochthonous yeast strains in order to evaluate, comparatively, their resistance profile under the action of 40 different essential oils. We also evaluated one yeast strain named CLE isolated from one Brazilian industrial unit more than 20 years ago, characterized, stored in the Bioprocess laboratory and used as a fermentation standard.

All the strains were previously evaluated considering their genetic identification in a sub specific level using molecular fingerprint tools. In the next session we will present the yeast strains differentiation.

4 | YEAST STRAINS DIFFERENTIATION

Our study involved twenty microorganisms belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, divided into three different classes: 1) baker's yeast strains, which were used exclusively in the beginnings but they are also used nowadays; 2) commercial yeast strains (named and described above as selected yeast) including ANGEL yeast strain, which is a Chinese strain popularly used in Brazil as inoculum and 3) native autochthonous yeast strains.

The baker's yeasts strains were isolated from baker's yeast samples commercially used in Brazil. Likewise, the commercially selected yeast strains were isolated from commercial yeast samples produced in large scale and commercialized in Brazil.

On the other hand, the native autochthonous yeast strains were isolated from yeast samples from fermentation processes in different industrial units in Brazil. The fuel-ethanol

production industrial plants which provided the samples are located in four Brazilian states: São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Tocantins, the former three belonging to the main Brazilian biofuel production axis.

The ARO and CVG strains were isolated from two different industrial units, located in Minas Gerais; whereas the SM strain and RV strain were isolated from two different industrial units located in São Paulo; SF and TFT strains were isolated from fermentation processes located in Mato Grosso do Sul and finally BPA strain were isolated from fuel-ethanol production industry located in Tocantins. All of these yeast strains were previously evaluated in fermentation assays by the Bioprocess Laboratory team at Unicamp and were classified as satisfactory or superior performance in fermentation tests.

To proceed the differentiation protocols, firstly all yeast strains were grown using spread-plating technique, in which a small sample is spread over the surface of an agar plate in order to evaluate the biotypes, i.e., we evaluated the morphology of discrete colonies formed across the surface of the WL Nutrient medium agar (WLN, DIFCO 242420).

After that, we used a streak-plating technique to check the purity of the culture of yeast. Then, single colonies, which are comprised of millions of cells growing in a cluster on an agar plate, were transferred to another plate using spread-plate technique. Thus, the pure microorganisms were grown in petri dishes with Potato Dextrose Agar medium (PDA, DIFCO 213400) to be submitted to DNA extraction protocol (BIDENNE et al., 1992 modified; OAKLEY-GUTOWSKI et al., 1992 modified; ARGUESO, et al. 2008).

All isolates were distinguished by electrophoretic karyotyping profile obtained from pulsed field gel electrophoresis (PFGE). This technique consists in the separation of intact chromosomal DNA according to its size on a gel matrix of agarose. According to the number and size of the chromosomes present in each strain, specific banding patterns were obtained.

In a different approach, considering conventional DNA electrophoresis which is able to separate molecules of up to 50 kilobases, PFGE is able to do the separation of large DNA molecules, as yeast chromosomes, which range from several hundred to several thousand kilobases (ZIMMERMAN; FOURNIER, 1996). This separation is possible because this technique uses an electric field that periodically changes direction in a gel matrix of agarose.

Unquestionably, nowadays there is an immense variety of molecular techniques for the identification of microorganisms. Nonetheless, not all of them are able to have sufficient sensitivity to distinguish some microorganisms at the sub-specific level, i.e., by distinguishing among different strains.

According to VILANOVA et al. (2007), PFGE has a greater discriminatory power when compared to mtDNA restriction analysis for *Saccharomyces cerevisiae* yeast clones. Therefore, this greater resolution in the power of differentiation among strains makes it better suited for the detection of genetic diversity in yeasts.

For this reason, we used PFGE to do the differentiation of all yeast strains. Below

we present the DNA electrophoretic profile for two groups of yeast strains evaluated: commercial selected yeast strains and native autochthonous yeast strains (Figure 2). The terms used to name commercially selected yeast strains were discussed above. The native autochthonous strains were named according to the protocol used in Bioprocess Laboratory, at Unicamp, which names yeast strains considering their original place of isolation.

The DNA electrophoretic profiles of all baker's yeast strains evaluated were presented by Kitaka et al. (2020) in the study "*Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds*". The expressions used to name the baker's yeast groups were established based on the commercial description: (ADY: Active dry baker's yeast; SDY Sweet dough baker's yeast; SY strong baker's yeast).

The Figure 2 presents the genomic DNA electrophoretic profile of all industrial yeast strains, which allows the differentiation among yeast strains belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group. From the (A) to (F) were demonstrated the genomic DNA profiles of commercially selected yeast strains, whereas from (G) to (M) present DNA profiles of native autochthonous yeast strains and in (N) the DNA profile of CLE standard strain, stored in laboratory for more than 20 years.

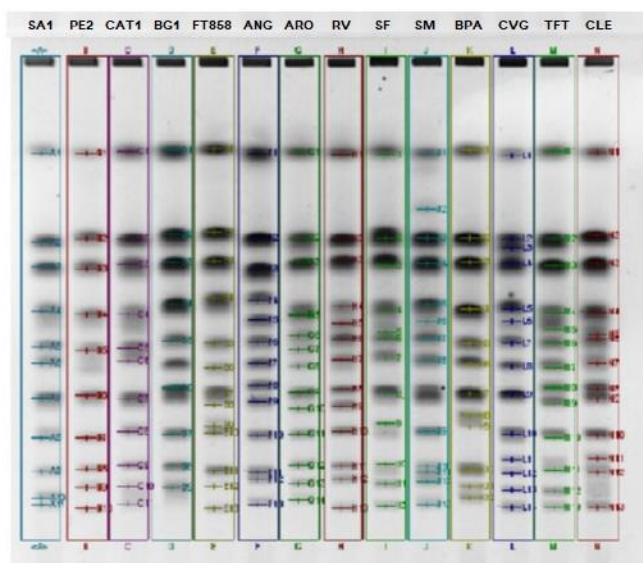


Figure 2: Genomic DNA electrophoretic profile of yeast strains. Differentiation among yeast strains (*Saccharomyces sensu stricto* group) obtained using PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) in agarose gel 0.8%. Image acquisition by UVP Vision Works LS system. (A) SA1 strain; (B) PE2 strain; (C) CAT1 strain; (D) BG1 strain; (E) FT858 strain; (F) ANG strain; (G) ARO strain; (H) RV strain; (I) SF strain; (J) SM strain; (K) BPA strain; (L) CVG strain; (M) TFT strain; (N) CLE strain.

After the molecular differentiation test using PFGE analysis, twenty strains were

established as different yeast strains. All of them were tried with 40 plant-derived essential oils. The subsequent sessions explain why evaluate industrial yeasts strains in the face of essential oils. They also summarize some findings from our studies with yeast strains' resistance to these compounds.

5 | WHY NATURAL PRODUCTS AND INDUSTRIAL YEAST STRAINS

As mentioned above, yeasts, particularly yeasts strains belonging to *Saccharomyces sensu stricto* group, are widely used in different industrial segments.

Fuel-ethanol production industry, as well as other industrial segments, has positioned itself in the context of a more modern approach, generating a demand for natural products solutions and the development of eco-friendly technologies.

Throughout the history of Brazilian fuel-ethanol production, this industrial segment has been continuously using antibiotics in order to control bacterial contamination in their fermentation processes. Some of these antibiotics are the same consumed by humans and are posing a serious problem, since the promiscuous use of antibiotics increases the selective pressure over antibiotic resistance genes. This selective pressure caused by this practice facilitates the transference antibiotic resistance genes to pathogenic organisms and explains the growing concern about the effects of the indiscriminate use of antibiotics in human health (ALLEN et al., 2010).

In addition, traces of these antibiotics may be found in ethanol byproducts. Dry yeast is sold as a source of protein for animal feed preparation. Brazil, as a leading exporter of this protein, faces the customary rejection of this product by the European Community. This is because of antibiotics traces which are found in dry yeasts (GORDON, 2009).

Therefore, the replacement of antibiotics' use in the fermentation processes for bioethanol production is paramount. Hence, the replacement should entail the use of substances that do not turn into harmful residue to the environment and, as a consequence, a hazard to human health.

Essential oils (EO) are considered an important natural source of substances with antimicrobial activity, some of them are discussed by Burt (2004) and Kitaka et al. (2019).

Besides the antimicrobial activity, the fact that some EO are used commercially in several industrial segments, as food industry, pharmaceutical and / or cosmetic, demonstrates interesting technological characteristics of essential oils, as they do not become harmful residues to the environment and human health (BAKKALI et al., 2008). Thus, these oils may become a solution to do this replacement.

These facts motivated the investigation of *Saccharomyces sensu stricto* resistance in the face of EO, as a screening evaluation test in yeasts, in order to develop a technology to serve as an alternative solution to replace antibiotics to control contamination in alcoholic fermentation processes.

6 | RESISTANCE OF YEAST STRAINS TO ESSENTIAL OILS

This session presents some concepts about plant-derived essential oils and summarizes some findings from our studies about the resistance of industrial yeast strains to these compounds.

According to Roller (2003), plants produce a range of antimicrobial compounds. Some of them are always present in the plants, while others are produced as a response against microorganisms and physical injuries. The production of these phytochemicals as a stress condition response to combat pathogenic infections is mentioned by several authors (THEIS; LERDAU, 2003). Inside of this phytochemicals group are the essential oils (EO).

Essential oils are a mixture of several compounds, with different chemical origin. Their composition varies and could include terpenes, alcohols, acids, esters, epoxides, aldehydes, ketones, amines and sulfides. These complex aromatic and volatile mixtures could be obtained from different plant materials such as leaves; flowers; buds; roots and barks (GUENTHER, 1948; BURT, 2004).

In this study, 40 plant-derived essential oils were used, which were described by Kitaka (2018; 2019). These essential oils were extracted from plants belonging to the Medicinal and Aromatic Plant Collection (CPMA) of Chemical, Biological and Agricultural Multidisciplinary Research Center (CPQBA) at University of Campinas (UNICAMP), in Brazil.

The resistance of the 20 different industrial yeast strains, previously identified and differentiated, was established considering their ability to grow in the face of different essential oils, in all concentrations evaluated.

The resistance was inferred from the growing ability considering the inhibitory effect of the essential oils (EOs) using the microdilution test and determining Minimal Inhibitory Concentration - MIC (NCCLS, 2002) for each of the 40 essential oils. The Figure 3 summarizes the results from the experiments with the 40 EOs in different concentrations, ranged from 2mg/mL to 1µg/mL in which we catalogue the resistance profiles of all yeast strains studied.

#EO	Scientific name	Baker's Yeast Strains						Industrial Yeast Strains															
		DYS	BMD	FMD	IMO	FFF	RES	SA	PE	CAT	RO	FTS08	ANGEL	ARO	RV	SP	SM	BPA	CVG	TFT	LSV		
		ADY				SDY						Commercially Selected Yeast Strains (C-SY)						Native Autochthonous Yeast Strains (NAY)					
1	<i>Allopora gracilicornis</i>																						
2	<i>Allopora pipitylis</i>																						
3	<i>Atterma amara</i>																						
4	<i>Vernonia crassicaulis</i>																						
5	<i>Cymbopogon strobilaceus</i>																						
6	<i>Lippia alba</i>																						
7	<i>Coccoloba griseoalba</i>																						
8	<i>Origanum vulgare</i>																						
9	<i>Piper abutilifolium</i>																						
10	<i>Piper aduncum</i>																						
11	<i>Thymus vulgaris</i>																						
12	<i>Veronica sparsocarpa</i>																						
13	<i>Aspeltrocline eburneocarpa</i>																						
14	<i>Alpinia</i>																						
15	<i>Dischidanthus dactylocephalus</i>																						
16	<i>Cakea jamaicensis</i>																						
17	<i>Cymbopogon citratus</i>																						
18	<i>Cymbopogon martinii</i>																						
19	<i>Cymbopogon amabilis</i>																						
20	<i>Chenopodium muricatum</i>																						
21	<i>Chenopodium ambrosioides</i>																						
22	<i>Eragrostis amabilis</i>																						
23	<i>Lippia alba</i>																						
24	<i>Leucaena leucostachya</i>																						
25	<i>Eleutheria aquatica</i>																						
26	<i>Eleutheria pumila</i>																						
27	<i>Coccoloba alba</i>																						
28	<i>Piscaparus microphyllus</i>																						
29	<i>Piscaparus peruvianus</i>																						
30	<i>Pimenta officinalis</i>																						
31	<i>Schinus molle</i>																						
32	<i>Scilla gracilis</i>																						
33	<i>Tagetes patula</i>																						
34	<i>Piper caldasense</i>																						
35	<i>Piper caribaeum</i>																						
36	<i>Piper magnum</i>																						
37	<i>Piper molle</i>																						
38	<i>Piper ornatissimum</i>																						
39	<i>Piper reginae</i>																						
40	<i>Polychaeta umbellata</i>																						

Inhibitory Concentration of Essential Oils (mg/mL)

NA

0.00

0.05

0.10

0.15

0.20

0.25

0.30

0.35

0.40

0.45

0.50

0.55

0.60

0.65

0.70

0.75

0.80

0.85

0.90

0.95

1.00

NA - No inhibitory activity in all concentration tested

EO - Essential Oils

LSV - Yeast strain stored in laboratory conditions for 20 years

Matrices according to commercial description

ADY - Active Dry Baker's Yeast

SDY - Sweet Dough Baker's Yeast

SV - Strong Baker's Yeast

Figure 3 Minimal inhibitory concentration (MIC) - Effect of plant-derived essential oil on yeast strains growth

Considering all of the 20 yeast strains, they presented an average resistance of 57.7% to all oils tested. The Figure 4 illustrates the resistance profile of all the yeast strains evaluated. In (A) the profile of strains referred as baker's yeast strains shows an average resistance of 51.7%, the worst in comparison to the other groups of yeast strains. The lowest resistance inside this group achieved 45% in DYS strain. The comparative study in this group of yeast strains were discussed by Kitaka et al. (2020).

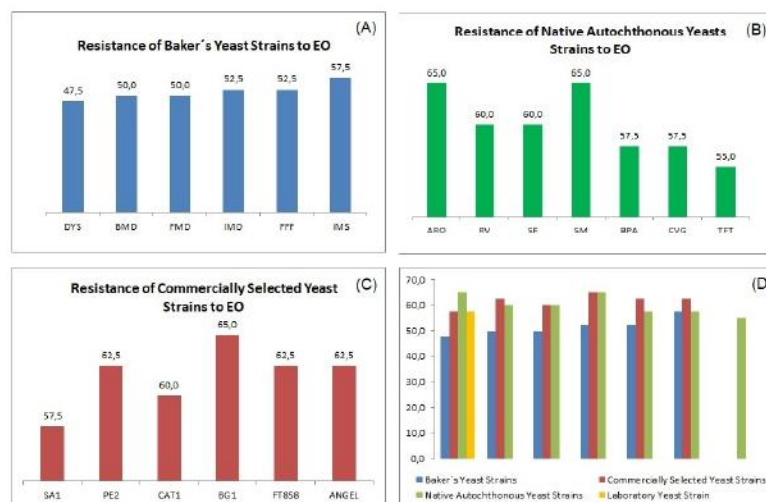


Figure 4: (A) Resistance of Baker's Yeast Strains to EO; (B) Resistance of Native Autochthonous Yeast Strains to EO; (C) Resistance of Commercially Selected Yeast Strains to EO; (D) Comparison of resistance profile to EO among all yeast strains evaluated.

Contrasting the baker's yeast strains group, for the other two groups, (commercially selected yeast strains (C) and native autochthonous yeasts strains (B)), there was no convergence among resistance or susceptibility profile, comparing the strains inside each group. For both groups the average resistance was similar, 61.7% and 60.0% respectively.

In the native autochthonous yeasts strains group (B), we should highlight ARO strain (isolated from fermentation process located in Minas Gerais) and SM strain (isolated from fermentation process located in São Paulo), both presenting 65% of resistance to all essential oils evaluated. Inside this group, the strain with the worst resistance performance was TFT, isolated from fermentation process located in Mato Grosso do Sul, which is resistant to 55% of all EO studied.

Similarly, in the group of commercially selected yeast strains (C), there was no uniformity with the resistance profile of the strains, although all of them have shown higher resistance profile. In this group BG1 strain should be highlighted with 65% of resistance, followed by PE2, ANGEL and FT858, all with 62.5% of resistance.

In Figure 4 (D) it is possible to notice the resistance performance of one laboratory yeast strain, named CLE. It was resistant to 57.5% of all essential oils tested. Despite of the fact that this yeast strain has been stored in laboratory conditions for more than 20 years, it seems to have kept, in general, the pattern of resistance observed in native yeast strains, since it was also isolated at one Brazilian industrial unit and characterized (in the same way of native autochthonous yeast strains).

Taking into consideration the activity of all EOs over yeast strains, as shown in the pie chart (Figure 5), it is possible to notice that, for 52% of the EO, there was no antimicrobial activity for all yeast strains tested.

Contrastingly, the remaining 48% EOs have shown activity on the yeast strains. Among these EOs, 35% presented activity for all strains while 13% acted differentially, presenting activity for certain strains.

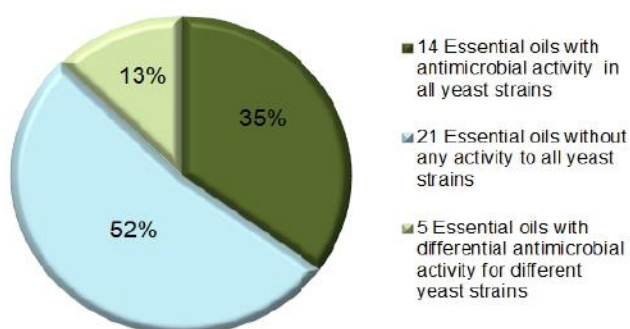


Figure 5: Antimicrobial activity of essential oils in industrial yeast strains

As the baker's yeast strains' robustness were previously discussed by Kitaka et al. (2020), herein, we will discuss the effect of the essential oils in the other strains, referred to as industrial strains. All these strains were affected by EO of *Aloysia tryphylla*; *Cymbopogon winterianus*; *Lippia sidoides*; *Ocimum gratissimum*; *Origanum vulgare*; *Cymbopogon citratus*; *Cymbopogon martini*; *Cyperus articulatus*; *Elyonurus muticus*; *Dysphania ambrosioides*; *Eugenia uniflora*; *Mentha aquatica* and *Pimenta dióica*.

Distinctly, most of the industrial yeast strains have presented slight inhibitory growth pattern in the face of *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Tagetes patula* essential oils, in which concentrations can reach 0,5mg/mL.

The EOs under which all the industrial yeasts strains have shown resistance, were presented by Kitaka et al. (2018) and were screened to be evaluated in other microorganisms isolated from fuel-ethanol fermentation processes.

Comparison among the three groups of yeast strains shows that baker's yeast group presented the lowest resistance and the major uniformity in the resistance profile.

Both selected yeast group and native autochthonous yeast strains group presented strains highly resistant to most of the essential oils. As the strains inhabiting the fermentation processes are mainly composed of selected yeast strains and native autochthonous yeast strains, the use of some EOs could be a possibility, considering the previous screening, as we showed here.

7 | FINAL CONSIDERATIONS

This chapter provided the characterization of several yeast strains used as inoculum in Brazilian fermentation processes in the fuel-ethanol production industry. These strains include: baker's yeast strains; commercially selected yeast strains and native autochthonous yeasts. The characterization involved the genetic differentiation among strains and the establishment of resistance profile using essential oils obtained from native Brazilian plants and exotic ones.

However there are uncountable studies using essential oils as potential antimicrobials and antioxidant, extremely few show their application in processes using *Saccharomyces sensu stricto* as fermentation platforms.

This chapter discussed both the resistance of different yeast strains groups in the face of several EOs and the comparison among them.

Overall, the results of yeast strains resistance presented a convergence, i.e., the same EO inhibitory effect was observed in different strains for one specific essential oil.

Although there is not a general convergence of results regarding the resistance of all the strains to all the EO, it was possible to observe the convergence of findings in the resistant profile by the strains against one specific EO.

Furthermore, for some EO, the results of yeast strains resistance point toward a

similar pattern. This similarity might allow a prediction of the effect of EOs extracted from plants belonging to the same plant family or genus. Some convergent examples are related to the sensitivity profile of yeast strains in the face of the essential oils in which there was a high harmful effect.

One example is observed in the inhibitory effect of EOs 17 and 18, extracted from plants belonging to the *Cymbopogon* spp. genus (Poaceae family) which presented similar harmful effects against all the yeast strains.

In other cases, as *Elyonurus muticus*; (20); *Dysphania ambrosioides* (21) and *Eugenia uniflora* (22), although essential oils were not extracted from plants belonging to the same family or genus, the harmful effect in one specific strain could give us a clue about the higher toxicity effect for all the industrial yeast strains.

In short, not only the findings of resistance in industrial yeast strains but also the essential oils inhibitory effect has implications on technological applications for industrial segments that use *Saccharomyces sensu stricto* strains. Finally, these results open new perspectives for applications of bioactives as plant-derived essential oils, especially in the industrial context.

ACKNOWLEDGMENT

CAPES /PROEX; CPQBA/UNICAMP for financial support.

Genetics and Molecular Biology Graduate Program at Biology Institute, UNICAMP.

Bioprocess, Microbiology, Agrotechnology, Organic Chemistry/ Pharmaceuticals and Microbial Resources Divisions at CPQBA Research Center teams by the technical support.

REFERENCES

- ALBA-LOIS, I. SEGAL- KISCHINEVZKY, C. Yeast fermentation and the making beer and wine. Nature Education, v3, n.9, p17, 2010.
- ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J. HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat. Rev. Microbiol.. 8:251-259. doi.10.1038/nrmicro2312. 2010.
- AMORIM, H.V.; LEÃO R.M. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. 1ª ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora Comercio de Livros Ltda, v.3000, 433p., 2005.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.91, n.5, p.1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? 2011 Biofuel Production Recent Developments and Prospects, Dr Marco Aurélio dos Santos Bernardes (Ed.) ISBN:978-953-307-478-8, In-Tech.E-book (PDF) ISBN 978-953-51-4435-9. DOI:10.5772/959. 2011.

ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **PNAS** 105 (33) 11845-11850; 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>

ARGUESO, J.L.; CARAZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S. MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D. PEREIRA, G.A.C. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research** 19:2258-2270. 2009

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p.446-475, 2008.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Work by chemistry and biologists, 1789-1850. **Yeast** 14:1439-145, 1998.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast** 16:755-771, 2000.

BARNETT, J.; LICHTENTHALER, F. A history of research on yeasts: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. **Yeast** 18:363-388, 2001.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** 8: 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C. PAULILLO, S.C.L. RODRIGUES, D.A. BASSO, T.O. AMORIM, H.V. WALKER, G.M. Aluminium toxicity toward yeast fermentation and protective effect of magnesium. International Congress on Yeasts – Yeasts in: **Science and Biotechnology. The Quest for Sustainable Development**, Book of Abstracts, Rio de Janeiro, p.PB-14, 2004.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet** 22, 1-7. 1992.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Fermentation Knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **European Molecular Biology Organization Reports**. Vol.11 (12), p.914-920, 2010.

GORDON, C. R. 2009 FDA Sampling detects Antibiotics Residues in Ethanol Distillers Products. **National Grain and Feed Association Newsletter**, January 29, 2009. Disponível em <http://www.ngfa.org/files/misc/News1-29.pdf> (Acessado em 15 Outubro 2016).

GU, Z.; OLIVER, S. Yeasts as models in evolutionary biology. **Genome Biology** London, v.10, p.304, 2009.

GUENTHER, E. The essential Oils D. Van Nostrand, New York. 1948

KITAKA, Patrícia Regina; ANDRIETTA, Maria da Graça Stupiello; MERZEL, Valéria Maia; DUARTE, Marta Cristina Teixeira; FIGUEIRA, Glyn Mara. **Composições e seu uso**. Depositante: Universidade

Estadual de Campinas. Procurador: Ciro de la Cerda BR nº1020180168045. Depósito 16 de agosto de 2018.

KITAKA, P.R.; DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; STECKELBERG, C. DELARMELINA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Potential use of essential oils in baker's yeast. In **Pesquisa na Cadeia de Plantas Aromáticas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap.1. p.1-12. DOI 10.22533/at.ed.6219130091.

KITAKA, P.R.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; STECKELBERG, C. DELARMELINA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Sturdiness of baker's yeasts strains to natural bioactive compounds. In **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. Cap.14. p.143-153. DOI 10.22533/at.ed.39420220114.

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. **Am. Soc. Brew. Chem.** v.50, p. 48-52, 1992.

NCCLS 2002. M27-A2. In National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 2002.

ROLLER, S. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited. 2003.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química). [*Characterization of yeasts from alcoholic fermentation processes using cell composition and attributes and kinetic characteristics*.Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STECKELBERG, C.; KITAKA, P.R.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. Dominance and Persistence of PE strains (*Saccharomyces Sensu Stricto*) in Brazilian Bioethanol Fermentation Tanks (One Unit Four Seasons). **International Journal of New Technology and Research** 3 (6) 2017.

STRATFORD M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol A., Fleet G. (eds) **Yeasts in Food and Beverages**. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences** 164(S3):93-102, 2003.

TOSETTO, G.M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. 2008 Tese (Doutorado em Engenharia Química). [*Behavior of *Saccharomyces* industrial strains before inhibiting compounds present in sugarcane molasses in bioethanol production*.Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UDOP - UNIÃO NACIONAL DA BIOENERGIA Produção Brasileira de Etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Política Agrícola - Departamento de Comercialização e Abastecimento DCAA / SPAE/ MAPA

Disponível em: https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/12ago20_producao_brasileira_etanol.pdf, 2020. Acessado em 25/08/2020.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR (2019) Produção de etanol total na Safra2019/2020. Disponível em: <https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.%20CPB%20CRN%20CCE%20CPI%20CMA%20CTO%20CPA%20CAP%20CRO%20CAM%20CAC%20CRR,2019>. Acessado em 25/08/2020.

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* J. **Int. Sci. Vigne Vin**, 41, n°3, n°3, 155-159, 2007.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: **Nonconventional Yeasts in Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3

3.4 CONCLUSÕES

A avaliação da atividade antimicrobiana dos OE em linhagens de leveduras isoladas a partir de unidades industriais e diferenciadas por PFGE foi conduzida com a finalidade de determinar quais OE possuíam perfil adequado desejável (inertes para todas as linhagens de *Saccharomyces sensu stricto* em todas as concentrações testadas), para serem avaliados posteriormente frente às bactérias contaminantes (*Lactic Acid Bacteria* – LAB) em relação à atividade antimicrobiana.

Tendo em vista que os resultados das avaliações contra linhagens de leveduras de panificação mostraram que este grupo é mais susceptível à ação dos OE, e pelo fato de permanecerem por um período muito breve nos processos de fermentação, a triagem dos OE para as avaliações subsequentes basearam-se nos resultados da atividade antimicrobiana dos OE contra as linhagens industriais, ou seja, aquelas dos grupos de linhagens de padrões comerciais e linhagens nativas.

A avaliação do potencial inibitório dos 40 óleos essenciais em linhagens de leveduras industriais mostrou que 14 (35%) OE apresentaram atividade para todas as linhagens de leveduras testadas em pelo menos uma das concentrações avaliadas; 5 (12,5%) OE apresentaram atividade diferencial para as linhagens de leveduras testadas, ou seja, tiveram efeito inibitório para algumas linhagens de leveduras e foram inertes para outras. Por outro lado, 21 (52,5%) OE apresentaram o perfil desejável para ensaios posteriores com bactérias lácticas, isto é, não apresentaram atividade inibitória para nenhuma das linhagens de leveduras testadas para todas as concentrações avaliadas (Tabela 2).

Os 21 óleos inertes nos ensaios de atividade antimicrobiana para leveduras em todas as concentrações avaliadas foram selecionados para prosseguir com as etapas subsequentes do trabalho.

3.5 REFERÊNCIAS

ALBA-LOIS, I. SEGAL- KISCHINEVZKY, C. Yeast fermentation and the making beer and wine. *Nature Education*, v3, n.9, p17, 2010.

ALLEN, H.K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J. HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:251- 259. doi.10.1038/nrmicro2312. 2010.

AMORIM, H.V.; LEÃO R.M. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*. 1ª ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora Comercio de Livros Ltda, v.3000, 433p., 2005.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.91, n.5, p.1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? 2011Biofuel Production Recent Developments and Prospects, Dr Marco Aurélio dos Santos Bernardes (Ed.) ISBN:978-953-307-478-8, In-Tech.E-book (PDF) ISBN 978-953-51-4435-9. DOI:10.5772/959. 2011.

ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **PNAS** 105 (33) 11845-11850; 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>

ARGUESO, J.L.; CARAZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S. MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D. PEREIRA, G.A.C. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research** 19:2258-2270. 2009

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p.446-475, 2008.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Work by chemistry and biologists,1789-1850. **Yeast** 14:1439-145, 1998.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast** 16:755-771, 2000.

BARNETT, J.; LICHTENTHALER, F. A history of research on yeasts: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. **Yeast** 18:363-388, 2001.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research** 8: 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C. PAULILLO, S.C.L. RODRIGUES, D.A. BASSO, T.O. AMORIM, H.V. WALKER, G.M. Aluminium toxicity toward yeast fermentation and protective effect of magnesium. International Congress on Yeasts – Yeasts in: **Science and Biotechnology. The Quest for Sustainable Development**, Book of Abstracts, Rio de Janeiro, p.PB-14, 2004.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet** 22, 1-7. 1992.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004.

CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Fermentation Knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **European Molecular Biology Organization Reports**. Vol.11 (12), p.914-920, 2010.

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In Antimicrobials in Foods; Davidson, P. M., Branen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; pp 441-468.

DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal Food Microbiology* 1987, 5, 165-180.

GORDON. C. R. 2009 FDA Sampling detects Antibiotics Residues in Ethanol Distillers Products. **National Grain and Feed Association Newsletter**, January 29, 2009. Disponível em <http://www.ngfa.org/files/misc/News1-29.pdf> (Acessado em 15 Outubro 2016).

GU, Z.; OLIVER, S. Yeasts as models in evolutionary biology. **Genome Biology** London, v.10,.p304, 2009.

GUENTHER, E. The essential Oils D. Van Nostrand, New York. 1948.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine* n6, p1- 93, 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns Ann. Epidemiol. 15 686-699, 2005.

HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl. Microbiol., 86, 985-990, 1999

JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. J Herbmed Pharmacol. 2018;7(1):1-7. doi: 10.15171

KITAKA, Patrícia Regina; ANDRIETTA, Maria da Graça Stupiello; MERZEL, Valéria Maia; DUARTE, Marta Cristina Teixeira; FIGUEIRA, Glyn Mara. **Composições e seu uso**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. Procurador: Ciro de la Cerda BR nº1020180168045. Depósito 16 de agosto de 2018.

KITAKA, P.R.; DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; STECKELBERG, C. DELARMELENA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Potential use of essential oils in baker's yeast. In **Pesquisa na Cadeia de Plantas Aromáticas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap.1. p.1-12. DOI 10.22533/at.ed.6219130091.

KITAKA, P.R.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; STECKELBERG, C. DELARMELENA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Sturdiness of baker's yeasts strains to natural bioactive compounds. In **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. Cap.14. p.143-153. DOI 10.22533/at.ed.39420220114.

KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. J. Food. Sci. 2011, 76, R164–R177.

MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. Foods 2016, 5, 18.

NCCLS 2002. M27-A2. In National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. 2002.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int. J. Food Microbiol. 2012, 156, 7–17.

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. **Am. Soc. Brew. Chem.** v.50, p. 48–52, 1992.

ROLLER, S. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited. 2003.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62, 250–264, 2014.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil.. *Brazilian Journal of Microbiology*, Brasil, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, *Foods*,5:43, 1-3, 2016.

STECKELBERG, C.; KITAKA, P.R.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. Dominance and Persistence of PE strains (*Saccharomyces Sensu Stricto*) in Brazilian Bioethanol Fermentation Tanks (One Unit Four Seasons). **International Journal of New Technology and Research** 3 (6) 2017.

STEFANAZZI, N. STADLER, T. FERRERO, A. *Pest Manag. Sci.* 2011, **67**, 639-646

STRATFORD M. Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Querol A., Fleet G. (eds) **Yeasts in Food and Beverages**. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164(S3):93-102, 2003.

TOSETTO, G.M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. 2008 Tese (Doutorado em Engenharia Química). [Behavior os *Saccharomyces industrial strains before inhibiting compounds present in sugarcane molasses in bioethanol production*.Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UDOP - UNIÃO NACIONAL DA BIOENERGIA Produção Brasileira de Etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Política Agrícola - Departamento de Comercialização e Abastecimento DCAA / SPAE/MAPA Disponível em: https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/12ago20_producao_brasileira_etanol.pdf ,2020.Acessado em 25/08/2020.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR (2019) Produção de etanol total na Safra2019/2020. Disponível em: https://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=2448&produto=etanol_total&safralni=2019%2F2020&safraFim=2019%2F2020&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR,2019. Acessado em 25/08/2020.

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* **J. Int. Sci. Vigne Vin**, 41, nº3, nº3, 155-159, 2007.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: Nonconventional Yeasts in Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3.

Capítulo 4

Bactérias Contaminantes de Processos Fermentativos para Produção de Bioetanol

e

Óleos Essenciais

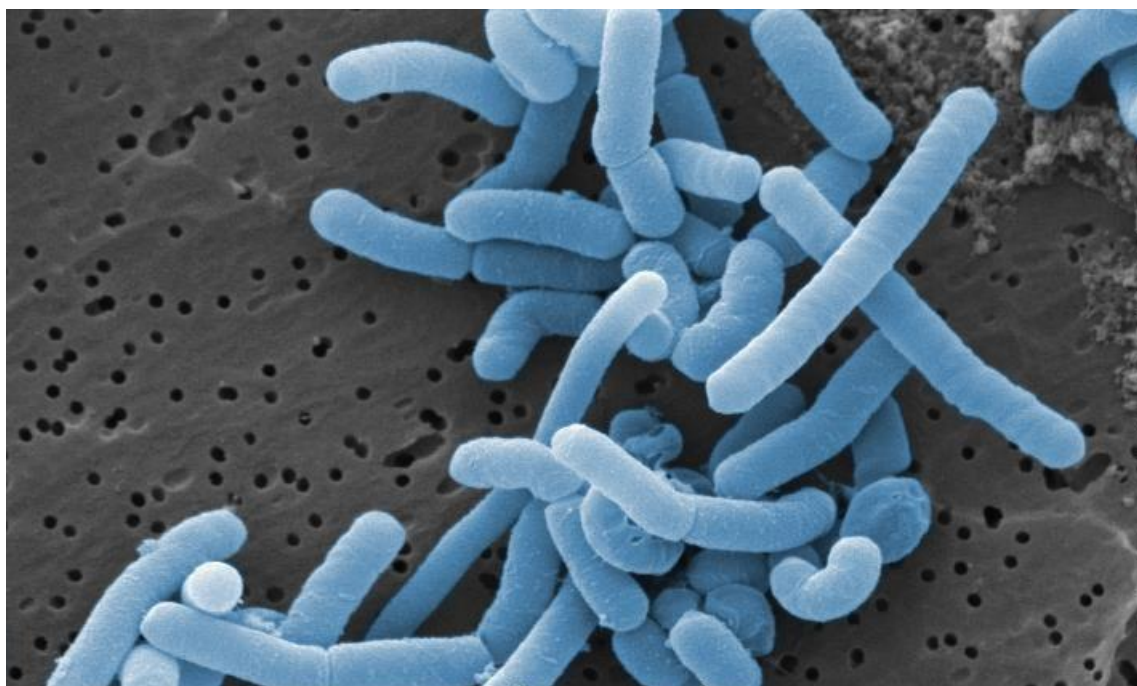


Figura 9: *Lactobacillus paracasei*

Fonte imagética: Dr. Horst Neve, Max Rubner-Institut / CC BY-SA 3.0 DE (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/deed.en>)

APRESENTAÇÃO

No presente capítulo são discutidos os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente a contaminantes bacterianos presentes em processos fermentativos de unidades industriais produtoras de bioetanol em diferentes partes do Brasil. Além disso, o capítulo traz a caracterização taxonômica destes contaminantes bacterianos, realizada com ferramentas de biologia molecular utilizando sequências parciais do gene RNAr 16S. As metodologias de isolamento e de armazenamento dos contaminantes são também brevemente descritas. Por fim, são apresentados os resultados da análise de atividade dos óleos essenciais nestes micro-organismos.

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. O processo produtivo é pautado na fermentação de açúcares provenientes da cana-de-açúcar por leveduras. Este processo de fermentação ocorre em tanques, denominados dornas de fermentação, que promovem um ambiente adequado ao crescimento também de bactérias contaminantes (AMORIM et al, 2011).

A principal consequência da presença de micro-organismos contaminantes nas dornas de fermentação é a redução da eficiência fermentativa, acompanhada de uma menor produção de etanol, causando prejuízos consideráveis (LUDWIG, OLIVA-NETO, ANGELIS, 2001). Desta forma, o monitoramento e o controle de contaminantes nestes tanques são fundamentais para a melhora na eficiência e no rendimento da produção de etanol.

Dentre os fatores que afetam a fermentação alcoólica, destaca-se a contaminação bacteriana. Assim, a fim de contornar esse problema, muitas unidades industriais fazem uso de antibióticos, especialmente quando os níveis de contaminação atingem valores acima de 10^7 células/mL de mosto e, por consequência, há uma queda significativa no rendimento alcoólico.

A incidência de micro-organismos contaminantes nas dornas de fermentação é, em sua maioria, composta por bactérias Gram-positivas

denominadas bactérias lácticas (LAB). Estas bactérias competem diretamente com as leveduras pelo substrato presente no mosto, que seria convertido em etanol, desviando assim a síntese para outras moléculas. Além disso, estes contaminantes podem produzir compostos inibitórios que afetam as leveduras e, conseqüentemente, reduzem a produtividade industrial do etanol.

Desta forma, para que as perdas sejam reduzidas ou minimizadas, as unidades fazem uso de antibióticos. Os antibióticos comerciais mais utilizados para o controle de contaminantes bacterianos nos processos de fermentação para produção de etanol são: cloranfenicol, tetraciclina, virginamicina, penicilina e monensina sódica, sendo este último o de maior destaque por sua atuação sobre bactérias Gram-positivas, relatadas como o principal grupo de contaminantes.

Entretanto, esses produtos ficam como resíduos no creme de levedura, impossibilitando o reaproveitamento deste sub-produto da fermentação como matéria-prima destinada à nutrição animal, uma vez que este é rico em proteínas e outros compostos nutracêuticos. Além disso, a exigência do mercado, especialmente o europeu, que banuiu o uso de antibióticos e promotores de crescimento na nutrição animal, agravam ainda mais o cenário, tornando ainda mais urgente a necessidade de estratégias de substituição do uso de antibióticos nos processos de fermentação.

Segundo Lucena et al. (2010), Bischoff (2007) e Skinner e Leathers (2004), os principais contaminantes pertencem ao gênero *Lactobacillus*. A seguir são apresentados a metodologia e os resultados das análises de identificação das bactérias contaminantes que foram utilizadas posteriormente para avaliar a atividade dos óleos essenciais sobre micro-organismos contaminantes provenientes de processos de fermentação alcoólica. Na sequência são apresentados os resultados da avaliação da atividade dos óleos essenciais nestes contaminantes.

4.2 BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL: QUEM SÃO?

4.2.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1.1 Isolamento das linhagens

Foram isoladas 195 cepas de LAB a partir de 57 amostras diferentes de fermento (32 unidades industriais diferentes) ao longo de 2 safras consecutivas (2015/2016 e 2016/2017): 41 isolados da safra 2015/2016 e 154 isolados da safra 2016/2017. Para realizar a seleção e isolamento de cepas de LAB contaminantes foram realizados plaqueamentos de amostras de fermento provenientes de usinas produtoras de bioetanol utilizando o meio de cultivo MRS (Agar Lactobacilli MRS - DIFCO® Ref.288210 – Tabela 4), adequado para o crescimento de bactérias lácticas contendo 100 ppm de actidiona (ciclohexamida), agente seletivo inibitório para o crescimento de leveduras. Após o isolamento e purificação das cepas de bactérias lácticas em placas contendo meio MRS acima descrito, foi realizado procedimento para criopreservação das cepas.

Tabela 4: Meios de cultivo e manutenção dos micro-organismos.

Condições de Crescimento	Linhagens de <i>Saccharomyces sensu Stricto</i>	Linhagens de LAB**
Meio de Cultivo para Isolamento	WL Nutrient Medium ¹	MRS Agar Medium ²
Meio de Cultivo para Manutenção	YEPD Agar ³	MRS Agar Medium ²
Meio de Cultivo MIC	Caldo YEPD ⁴	Caldo MRS ⁵
Meio de Cultivo MBC	-	MRS Agar Medium ²
Meio de Cultivo para Preservação	Caldo YEPD ⁴ + Glicerol 10%	Caldo MRS ⁵ + Glicerol 10%
Temperatura de Crescimento	32°C	32°C
Temperatura de Preservação	4 a 8°C	4 a 8°C
Temperatura de Estocagem em Criotubos	-80°C	-80°C
Microaerofilia **	Não	Dependente da linhagem

¹WLN (Wallerstein Nutrient Medium DIFCO® Ref 242420) com 100 ppm de monensina sódica.

²MRS Agar (Lactobacilli MRS - DIFCO® Ref.288210) com 100 ppm de actidiona (ciclohexamida).

³YEPD Agar (Extrato de levedura 10 g/L; Glicose 20 g/L; Peptona Bacteriológica 20 g/L; Agar 15 g/L)

⁴Caldo YEPD (Extrato de levedura 10 g/L; Glicose 20 g/L; Peptona Bacteriológica 20 g/L)

⁵Caldo MRS (Lactobacilli MRS Broth - DIFCO® Ref.288130)

** Alguns micro-organismos precisaram de ambiente microaerófilo para crescimento, para tais micro-organismos foi utilizada jarra de anaerobiose com gerador de anaerobiose *AnaeroGen* (Atmosphere Generation System) Thermo Scientific -OXOID.

4.2.1.2 Estoque e manutenção das linhagens

Para a manutenção das cepas de bactérias lácticas para posterior identificação e realização de ensaios de susceptibilidade aos OE, foi realizado procedimento de criopreservação das cepas, após o isolamento e purificação destas.

As LAB foram cultivadas em caldo MRS (Lactobacilli MRS Broth - DIFCO® Ref.288130 – Tabela 4) por 24 h a 32°C, com subsequente congelamento (-80°C) em criotubos contendo caldo MRS com crioprotetor (solução de glicerol a 10%), para posterior identificação molecular. Os criotubos foram mantidos em ultrafreezer (-80°C) até o momento da reativação para identificação molecular dos isolados e/ou avaliação da atividade antimicrobiana.

4.2.1.3 Identificação das linhagens

4.2.1.3.1 Reativação das linhagens

Para reativação dos isolados de LAB visando subsequente identificação molecular, 40 cepas previamente isoladas e mantidas em ultrafreezer (-80°C) foram reativadas utilizando caldo MRS (Lactobacilli MRS Broth - DIFCO® Ref.288130 – Tabela 4) incubadas a 32°C. Após 48 h de crescimento, uma alíquota de 100 µL da suspensão de células foi plaqueada em meio Agar MRS (Lactobacilli MRS Agar - DIFCO® Ref.288210 – Tabela 4) para crescimento por confluência.

4.2.1.3.2 Extração de DNA genômico

Para extração de DNA dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de fermentação alcoólica, foi utilizado o protocolo descrito por Van Soolinger *et al.* (1993). A integridade e concentração do DNA foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR SafeTM DNA Gel Stain 10.000X in DMS (InvitrogenTM), usando como padrão de concentração o DNA do fago lambda (λ).

4.2.1.3.3 Amplificação e purificação de genes RNAr 16S

O DNA obtido a partir de cada isolado foi submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) do gene RNA ribossomal 16S utilizando *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) p10f (5'-GAG TTT GAT TCA GGC CCT G-3') e p1100r (5'-GTT GTG AGG GTT GGG G-3'), complementares às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.

O programa de amplificação de PCR consistiu em um ciclo a 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 3 minutos além de 1 ciclo final de extensão a 72 °C por 3 minutos. Cada reação continha: 2,0 U de *Taq* DNA polimerase (InvitrogenTM); tampão de PCR (InvitrogenTM) 1 X; 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,2 µM dNTP mix (InvitrogenTM), 0,5 µM de cada *primer* e 5,0 µL (~50 ng) da amostra de DNA genômico, totalizando um volume final de reação de 25 µL. Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene RNAr 16S foram confirmados usando gel de agarose 1% corados com 0,02 µL/mL SYBR SafeTM 10.000X in DMSO (InvitrogenTM). Os produtos das amplificações foram então purificados utilizando mini colunas (*GFX PCR DNA e gel band purification kit*, GE Healthcare).

4.2.1.3.4 Sequenciamento dos genes RNAr 16S dos isolados

O sequenciamento dos fragmentos de DNAr 16S provenientes dos isolados foi realizado em sequenciador automático ABI 3500XL (Life TechnologiesTM). A reação de sequenciamento utilizou de 1 µL de DNA (aproximadamente 10 ng de DNA) dos isolados previamente purificado, 0,5 µL de um único *primer* (forward ou reverse) (5 mM), 2 µL de tampão *Save Money* (500 µL de MgCl₂ 50 mM e 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 9,0), 2 µL do reagente *Big Dye* (Applied BiosystemsTM) e 10 µL de água ultrapura q.s.p. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 96°C durante 2 minutos, seguida de 26 ciclos, sendo cada ciclo constituído das etapas de desnaturação (96°C por 45 segundos), pareamento (50°C por 30 segundos)

e extensão (60°C por 4 minutos). As reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler Gradient* (EppendorfTM). Posteriormente, as reações de sequenciamento foram precipitadas, suspensas em formamida e então aplicadas no respectivo sequenciador automático.

4.2.1.3.5 Análise filogenética

A análise filogenética que possibilita a identificação das linhagens de LAB foi realizada utilizando as sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas com cada primer. Estas foram montadas em uma única sequência consenso (contig), combinando os diferentes fragmentos obtidos com ajuda do programa phredPhrap (EWING et al., 1998). Após a montagem do contig correspondente ao organismo alvo, este foi comparado com sequências de RNAr 16S de organismos representados nas bases de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), usando as rotinas BLASTn e SequenceMatch, respectivamente. Foram, então, selecionadas sequências de organismos tipo relacionados ao organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e analisadas com o software MEGA v. 7 (TAMURA et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura 2 p (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU, NEI, 1987), com valores de “bootstrap” calculados a partir de 1000 replicatas, utilizando as rotinas incluídas no software MEGA. As afiliações filogenéticas foram determinadas com a utilização da rotina Classifier (RDP – Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), sendo confirmadas através da rotina BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009) foi utilizado para definição das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) distintas de bactérias, utilizando o *cutoff* de 97% de similaridade de sequência, as quais foram representadas nas árvores filogenéticas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS LAB

Dos 40 isolados inicialmente propostos para reativação e avaliação subsequente, 5 não puderam ser identificados, sendo que 3 deles não apresentaram estabilidade de crescimento, mesmo após 3 tentativas de cultivo em diferentes condições de meios de cultivo e aeração, e 2 dos isolados não apresentaram sequências adequadas para identificação por problemas no sequenciamento, mesmo após duas tentativas de repetições. Deste modo, apenas 35 cepas de LAB foram identificadas. Essas 35 cepas foram isoladas a partir de amostras de fermento provenientes de unidades industriais situadas em cinco estados brasileiros: São Paulo (71,4% dos isolados), Minas Gerais (5,7% dos isolados), Mato Grosso (8,6% dos isolados), Mato Grosso do Sul (5,7% dos isolados) e Goiás (8,7% dos isolados) (Figura 10). Estes estados fazem parte do principal eixo produtivo de etanol do Centro-Sul do Brasil.



Figura 10: Mapa de localização dos estados brasileiros onde estão situadas as unidades industriais nas quais os contaminantes bacterianos foram isolados.

O DNA destes isolados foi extraído com sucesso (Figura 11), e submetido a reações de PCR para amplificação do gene RNAr 16S, purificação e sequenciamento.

O sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S relevou a presença de 9 OTUs distintas (Unidades Taxonômicas Operacionais) dentre as 35 bactérias sequenciadas (Figura 12 a Figura 14), distribuídas em 4 principais grupos: *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Staphylococcus* sp. e micro-organismos da família Leuconostocaceae, sendo o grupo de *Lactobacillus* o mais abundante, que incluiu as espécies *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. ferruginis*, *L. amylovorus* e *L. harbinensis*.

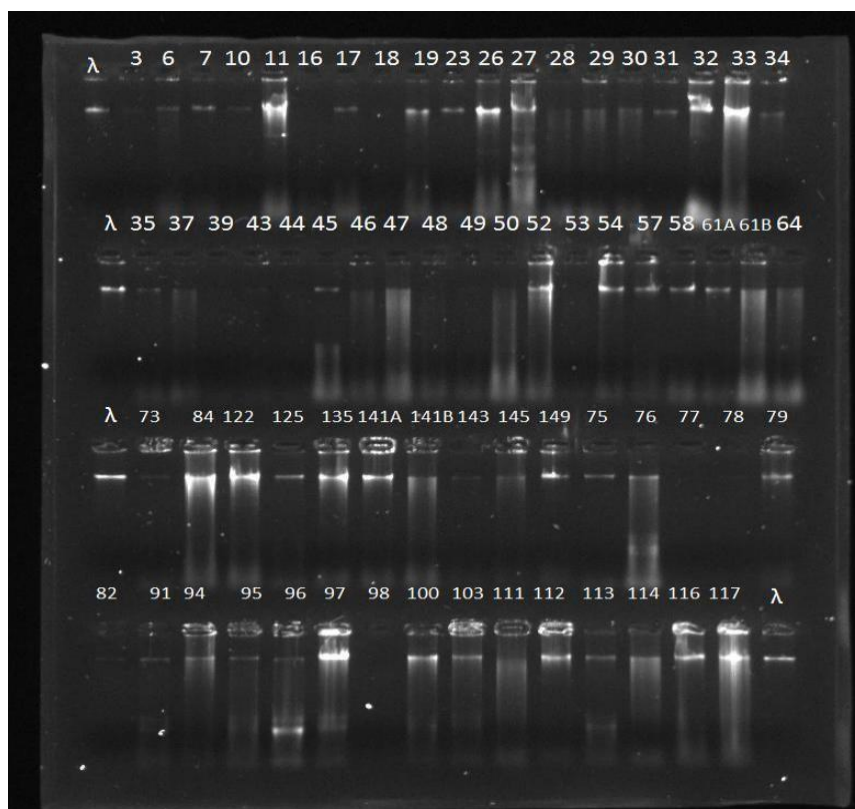


Figura 11: Estimativa da concentração do DNA genômico das linhagens de LAB em gel de agarose 0,8%

Dos 35 isolados identificados, 91,4% pertencem ao gênero *Lactobacillus* (Figura 12); 2,9% ao gênero *Acetobacter* (Figura 14); 2,9% à família Leuconostocaceae e 2,9% ao gênero *Staphylococcus* (Figura 13).

Dentre os micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, foi possível notar uma predominância da espécie *L. paracasei*, que corresponde a 62,9% da população de LAB avaliada. Dentre os micro-organismos que foram afiliados ao grupo dos *Lactobacillus*, 12,5% foram identificados em nível de gênero apenas. Também foram identificados micro-organismos das espécies *L. fermentum* (8,5%), *L. ferruginis* (8,5%), *L. amylovorus* (2,9%) e *L. harbinensis* (2,9%) (Figura 12).

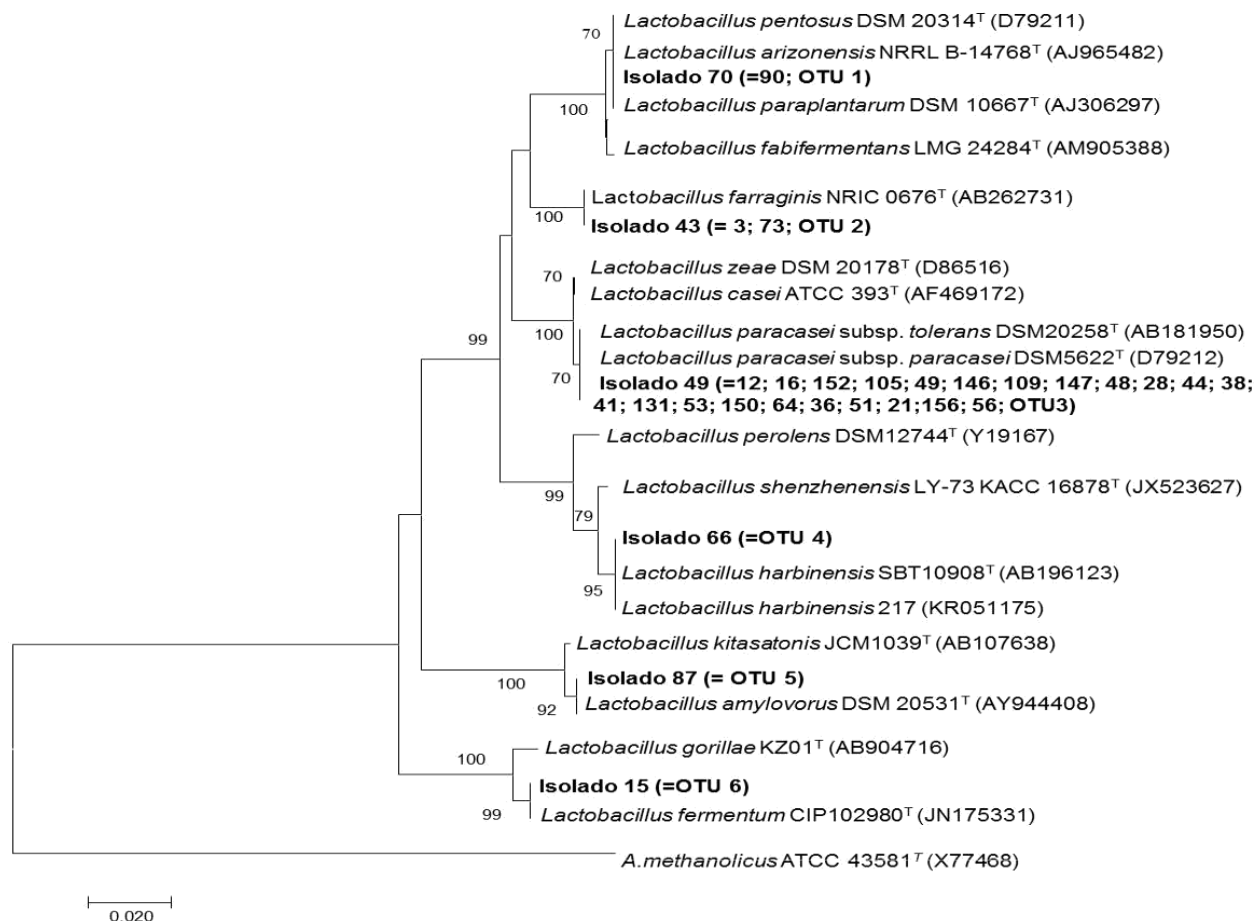


Figura 12: Análise filogenética das sequências parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação para produção de bioetanol afiliados ao gênero *Lactobacillus* e micro-organismos recuperados da base de dados Genbank.

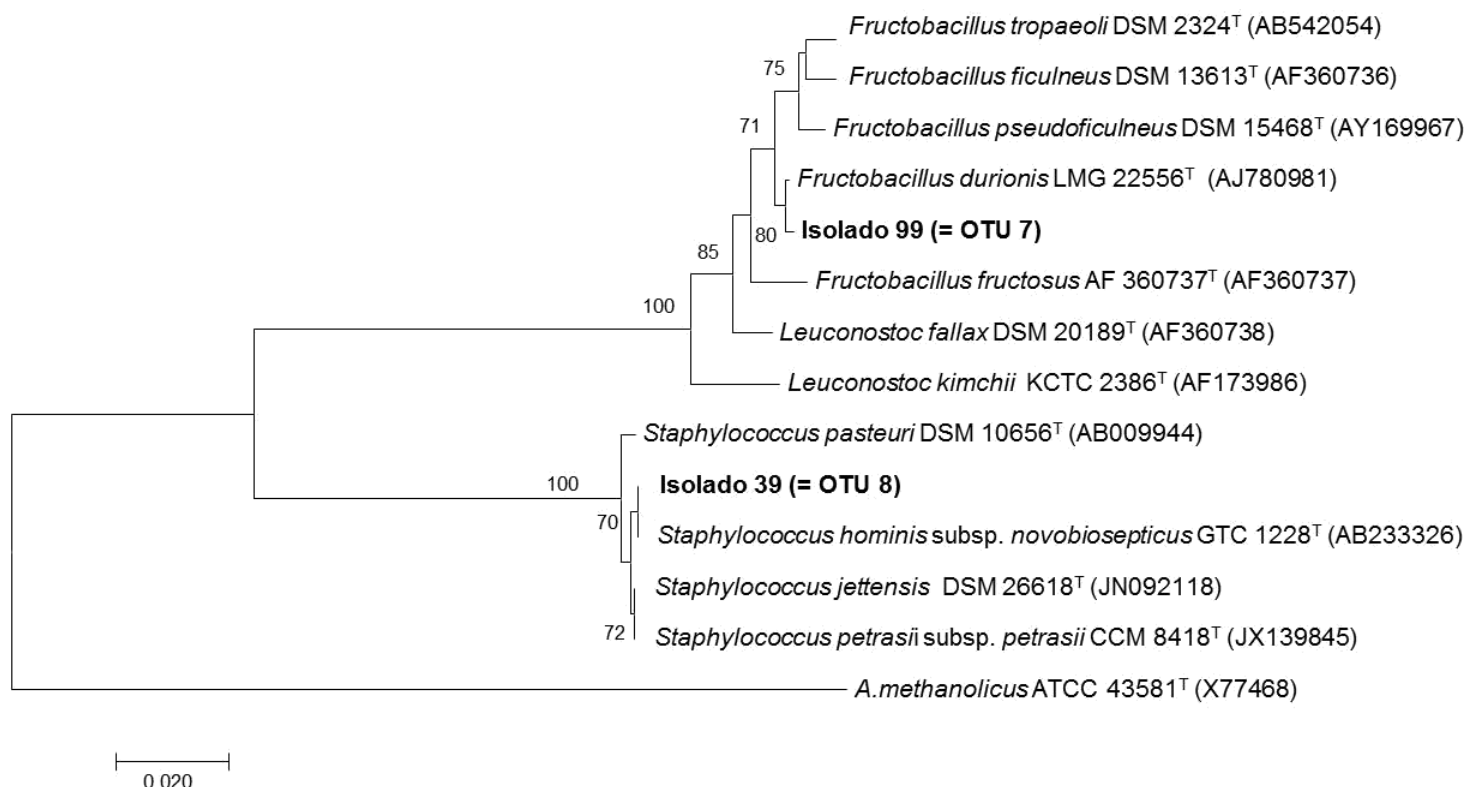


Figura 13: Análise filogenética das sequências parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação alcoólica afiliados aos gêneros *Staphylococcus* e à família *Leuconostocaceae*, juntamente com micro-organismos rec recuperados da base de dados Genbank.

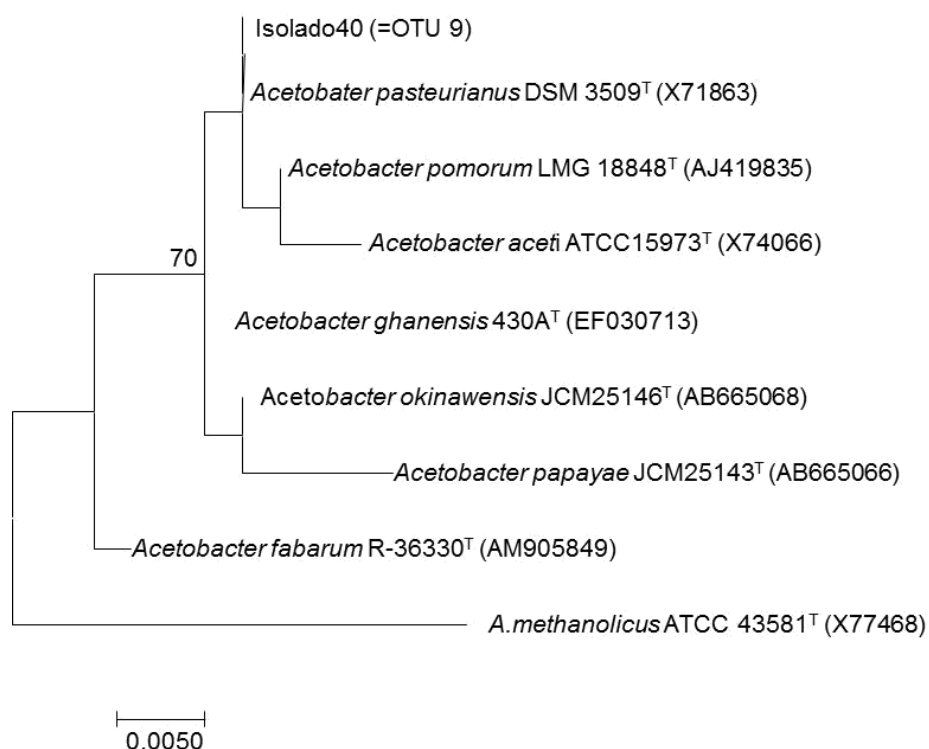


Figura 14: Análise filogenética das sequências parciais do gene RNA16S (~600 pb) obtidas a partir dos isolados provenientes de processo de fermentação alcoólica afiliados ao gênero *Acetobacter* e micro-organismos relacionados recuperados da base de dados Genbank.

A partir da análise dos resultados de identificação das LAB isoladas de processos fermentativos brasileiros é possível afirmar que o perfil de maior incidência das bactérias do gênero *Lactobacillus* corrobora os achados da literatura descritos para processos fermentativos de produção de etanol no geral.

Os dados apresentados por trabalhos anteriores que tratam de prevalência e distribuição de contaminantes em processos fermentativos para produção de bioetanol, sejam eles brasileiros, como estudado por Lucena et al. (2010), ou processos de produção americanos, apresentados por Skinner e Leathers (2004), apontam a predominância do gênero *Lactobacillus* de forma uníssona.

No entanto, a prevalência de espécies dentro deste gênero nos processos fermentativos parece não seguir um padrão. A identificação de espécies dos contaminantes com maior incidência encontrada mostrou a prevalência de *L. paracasei*, diferindo dos padrões apontados por Lucena et al. (2010) e Skinner e Leathers (2004), que indicam *L. fermentum* e *L. delbrueckii* respectivamente, como os contaminantes bacterianos mais abundante nos processos fermentativos.

Embora Lucena e colaboradores (2010) tenham avaliado amostras contaminantes oriundas de quatro destilarias brasileiras, no período de 2007 e 2008, vale ressaltar a diferença de localização das unidades industriais avaliadas quando comparadas com o presente trabalho, uma vez que as quatro destilarias estão localizadas no nordeste brasileiro enquanto que o presente trabalho avaliou unidades industriais do eixo centro-sul do Brasil.

No estudo conduzido por Skinner e Leathers (2004), a avaliação dos contaminantes foi realizada tendo como base amostragens a partir de processos fermentativos de usinas americanas no período de 2002 e 2003. Este trabalho mostra a incidência de 44 a 60% do grupo *Lactobacillus*, sendo que a espécie prevalente é *L. delbrueckii*, correspondendo a 21-45% dos isolados pertencentes a este gênero. É importante ressaltar que o modelo americano de processo de fermentação utiliza como matéria-prima principal o milho e, por esta razão, não apenas as etapas, mas o processo fermentativo como um todo são bem distintos daqueles encontrados no cenário brasileiro.

Embora haja diferença na prevalência das espécies de *Lactobacillus* encontradas em diferentes trabalhos, e em diferentes unidades industriais, os efeitos associados a diferentes espécies deste gênero nos processos de fermentação confluem para problemas na viabilidade celular de leveduras nos processos, com consequente decréscimo na produção de etanol.

Além disso, metabólitos produzidos por estes micro-organismos também atuam indiretamente nas leveduras e, consequentemente, no processo fermentativo. Segundo Nobre et al. (2007), o decréscimo da viabilidade celular de leveduras é também induzido por células inativas de *L. fermentum*, sugerindo que metabólitos bacterianos podem interferir na população de leveduras.

Narendranath et al. (1994) relataram que *L. paracasei* afeta a viabilidade celular de leveduras quando a concentração do ácido láctico no processo ultrapassa 8 g/L, sendo que este efeito é mais pronunciado quando há combinação com a presença de ácido acético.

Estudo recentes empregando modelos de laboratório com culturas puras de leveduras e uma bactéria específica ou seus produtos inibitórios têm demonstrado que células de *S. cerevisiae* são claramente afetadas com a adição de ácido láctico e ácido acético, resultando no decréscimo de

crescimento e de produção de etanol (MAIORELLA et al.1983; NARENDRANATH 2001; THOMAS et al 2002).

Deste modo, mesmo sem uma concordância entre as espécies de contaminantes bacterianos encontradas nos diferentes processos fermentativos, é notável a importância do gênero *Lactobacillus* como contaminante.

Além disso, é possível afirmar que nos processos fermentativos brasileiros de produção de bioetanol, o gênero *Lactobacillus* sp. é o prevalece dentre os contaminantes, assim como afirmou Bischoff et al. (2007) para os contaminantes oriundos de processos fermentativos de produção de etanol combustível a partir de milho.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EM BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS INDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

4.4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais em contaminantes bacterianos (LAB)

Após a triagem inicial dos óleos essenciais (OE) em linhagens de leveduras, foram selecionados os OE que apresentaram perfil inerte para leveduras, ou seja, que não apresentaram atividade inibitória para as linhagens de leveduras isoladas de processo industrial. Estes OE selecionados, previamente discutidos no Capítulo 2, foram testados para avaliar o potencial inibitório e microbicida frente às linhagens de bactérias lácticas (LAB) isoladas de amostras de fermentação alcoólica de diferentes unidades industriais.

Os ensaios para determinação de atividade inibitória (MIC) e os ensaios para determinação de atividade bactericida (MBC) foram realizados de acordo com os protocolos descritos nos métodos de referência para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos descritos em CLSI (2005).

4.4.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos óleos essenciais frente às linhagens de LAB foram realizados utilizando os óleos essenciais (OE) inertes nos ensaios de atividade antimicrobiana para todas as leveduras industriais avaliadas (Tabela 2).

Para estes ensaios, o preparo dos inóculos de 37 cepas de LAB provenientes de amostras de unidades industriais distintas foi realizado segundo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLSI, 2005). Os isolados armazenados conforme descrito no item 4.2.1.2 foram reativados a partir dos criotubos e foram cultivados em caldo MRS por 48 h a 32°C, com repique subsequente para placas contendo meio de cultivo MRS, com 100 ppm de actidiona (ciclohexamida) e mantidas em estufa a 32 °C por 24 h (Tabela 4).

Após o crescimento por confluência das linhagens nas placas, alíquotas da cultura foram retiradas com alça de platina e transferidas para tubo de ensaio contendo 4,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. As suspensões de LAB foram homogeneizadas em agitador vórtex e uma alíquota (2 mL) desta suspensão foi utilizada para leitura em espectrofotômetro (FEMTO 600S) a 625 nm, ajustando-se com solução salina 0,9% para uma densidade óptica (DO) de 0,08 a 0,10, correspondente à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Aos 2 mL remanescentes das suspensões de bactérias, foram adicionadas as mesmas quantidades de solução salina 0,9% esterilizada, utilizada no ajuste em espectrofotômetro. A partir das soluções padronizadas, foi realizada diluição seriada de forma a se obter, ao final da mesma, a concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e, destas últimas soluções, 6 mL foram transferidos para tubos contendo 3 mL de meio de cultura MRS (Tabela 4), estabelecendo-se uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ ou $1,0 \times 10^5$ em 100 µL. Desta forma, os poços das microplacas inoculados resultaram em concentrações de 5×10^5 UFC.mL⁻¹ (CLSI, 2005).

Para cada isolado de LAB, foram avaliados 21 óleos essenciais distintos (listados na Tabela 2) em testes de microdiluição. As amostras de OE foram diluídas em caldo MRS, para uma concentração de 8 mg.mL⁻¹, correspondendo a 2 mg.mL⁻¹ no primeiro compartimento da placa de

microdiluição.

Os testes de microdiluição foram realizados em microplacas esterilizadas de 96 orifícios ou poços (8 linhas A-H/1-12 colunas) onde foram adicionados 100 μL de caldo MRS (Tabela 4). Na primeira coluna foram depositados 50 μL da solução de cada OE diluído (controle de esterilidade). Na segunda coluna não foi adicionada nenhuma solução (controle positivo do inóculo). Na terceira coluna foram depositados 100 μL de cada solução de OE diluído em duplicata. O conteúdo dos poços (caldo MRS + solução de OE) foi homogeneizado e 100 μL foram transferidos para os poços da coluna seguinte, repetindo-se o procedimento até a coluna 12, sendo os 100 μL finais excedentes desprezados. As concentrações avaliadas variaram entre 2000 e 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Posteriormente, da coluna 2 a 12 foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado de cada uma das diferentes linhagens de bactérias.

Após a adição do inóculo, as placas foram incubadas em estufa a 32 °C por 24 h. Decorrido o período de incubação, foram adicionados, em todos os poços, 50 μL de solução 0,1% de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC), seguido de re-incubação das placas por um período de 3 h. A concentração inibitória mínima (MIC) é definida como a menor concentração dos óleos essenciais capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos, impedindo o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória (CLSI, 2005).

4.4.1.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)

Os ensaios para determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) dos óleos essenciais frente às LAB foram realizados por meio de subcultivo em placas de MRS, utilizando 10 μL aliqüotados a partir dos poços onde foi determinada a MIC, com posterior incubação por 24 h a 32°C.

4.4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.2.1 Atividade antimicrobiana dos OE (MIC /MBC) em LAB

Dos 40 OE testados em ensaios para avaliação da atividade inibitória em leveduras, apenas 21 OE apresentaram o perfil desejável, ou seja, não inibiram nenhuma das linhagens de leveduras avaliadas em todas as concentrações testadas. Estes OE (Tabela 2) foram selecionados para ensaios subsequentes de avaliação de atividade antimicrobiana e determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) em LAB.

Dentre as LAB reativadas, 37 apresentaram crescimento satisfatório e, portanto, mostraram-se aptas para avaliação da atividade antimicrobiana dos 21 OE selecionados e previamente triados em linhagens de leveduras *Saccharomyces sensu stricto*, cujos resultados são mostrados no Quadro 3.

Quadro 3: Atividade antimicrobiana de OE em bactérias lácticas (LAB) isoladas de processo industrial de produção de bioetanol.

OE: 1 = *Aloysia gratissima*; 3 = *Artemisia annua*; 4= *Varronia curassavica*; 9= *Piper abutiloides*; 10= *Piper aduncum*; 12= *Vetiveria zizanioides* ; 13= *Achyrocline satuireioides*; 14= *Alpinia*; 15= *Baccharis dracunculifolia*; 27= *Ocimum selloi*; 28= *Pilocarpus microphyllus*; 31= *Pimenta rosa*; 32= *Ruta graveolens*; 34= *Piper caldense*; 35= *Piper cernum*; 36= *Piper marginatum* ; 37= *Piper molicomum*; 38= *Piper ovatum*; 39= *Piper regnellii* ; 40= *Photomorphe umbellata*. Escala de cores correspondente à MIC (mg/mL), ou seja, à intensidade da atividade antimicrobiana dos OE.

sem atividade		2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	mg/mL									
# Isolado	Óleos essenciais		1	3	4	9	10	12	13	14	15	27	28	29	31	32	34	35	36	37	38	39	40
	Isolado	Origem																					
2	DBP_BV-2015	GO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	DBP_SM-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	DBP_RBN-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	DBP_GOI-2015	GO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	DBP_OCP-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	DBP_SAP-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	DBP_NAR-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	DBP_VOC-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	DBP_VOM-2015	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	DBP_VOM-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	DBP_VOM-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	DBP_ARP-2016	MG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	DBP_NAR-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	DBP_SAP-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	DBP_SAJ-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	DBP_VP-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	DBP_OCP-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	DBP_SM-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	DBP_ARO-2016	MG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	DBP_BMB-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	DBP_RV-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	DBP_BVR-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	DBP_ORC-2016	MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	DBP_ORCM-2016	MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	DBP_VCJB-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	DBP_COP-2016	MT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	DBP_REV-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	DBP_REN-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	DBP_CPT-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	DBP_CME-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	DBP_BV-2016	GO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	DBP_VOIT-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
146	DBP_TVA-2016	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
147	DBP_TVA-2016	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	DBP_BAL-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	DBP_BAL-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156	DBP_VOJB-2016	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com os resultados obtidos, a eficácia (Figura 15), o perfil bacteriostático (Figura 16) e o perfil bactericida (Figura 17) dos óleos essenciais avaliados variaram de acordo com cada OE.

A eficácia dos 21 OE perante os isolados de LAB variou de 3,7% a 97%, conforme pode ser notado na Figura 15. Dos 21 óleos essenciais testados para LAB, 9 (45%) apresentaram eficácia superior a 60%, demonstrando perfil interessante para a finalidade que está sendo proposta neste trabalho. Dentre eles, podemos destacar os OE de: *Aloysia gratissima* (1); *Vetiveria zizanioides* (12), *Baccharis dracunculifolia* (15), *Piper caldense* (34), *Piper cernum* (35) e

Piper ovatum (38), que apresentaram melhores perfis antimicrobianos com eficácias superiores a 70%, variando entre 70% e 97%, conforme mostra a Figura 15. Tais resultados indicaram que estes OE possuem perfil adequado para serem investigados quanto à utilização como potenciais antimicrobianos para o controle de contaminação de bactérias lácticas (LAB) em fermentação para produção de bioetanol.

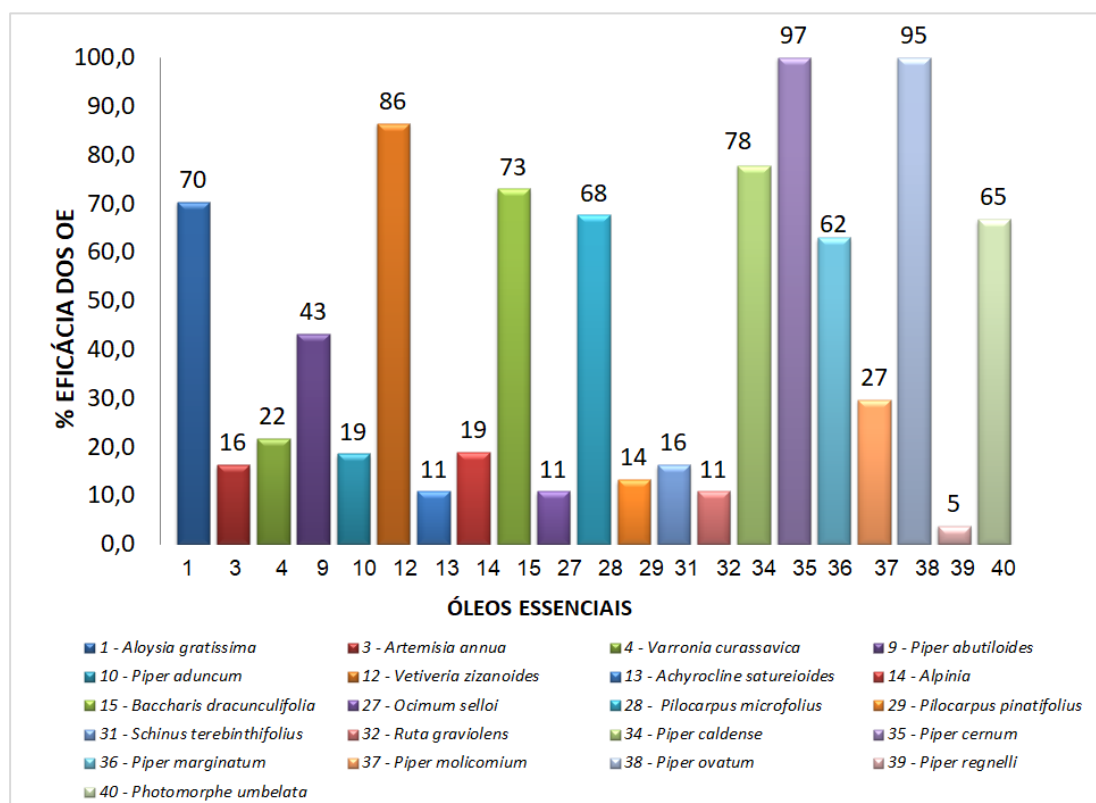


Figura 15: Eficácia da atividade dos Óleos Essenciais em bactérias ácido-lácticas (LAB). N=37.

Assim, investigações mais detalhadas e aprofundadas destes OE foram realizadas e são apresentadas e discutidas nos Capítulos 2 e 5.

Além disso, os ensaios para determinação de atividade inibitória e atividade microbica (MBC) demonstraram que a maioria dos OE apresenta perfil bacteriostático (Figura 16 e Figura 17). No entanto, os OE de *Artemisia annua* (3); *Baccharis dracunculifolia* (15); *Piper cernum* (35); *Piper ovatum* (38) e *Piper marginatum* (36) apresentaram perfil bactericida interessante, já que sua atividade bactericida foi superior a 40% para a população de LAB testada em concentrações que variaram de 2 mg/mL a 1 µg/mL (Figura 16 e Figura 17).

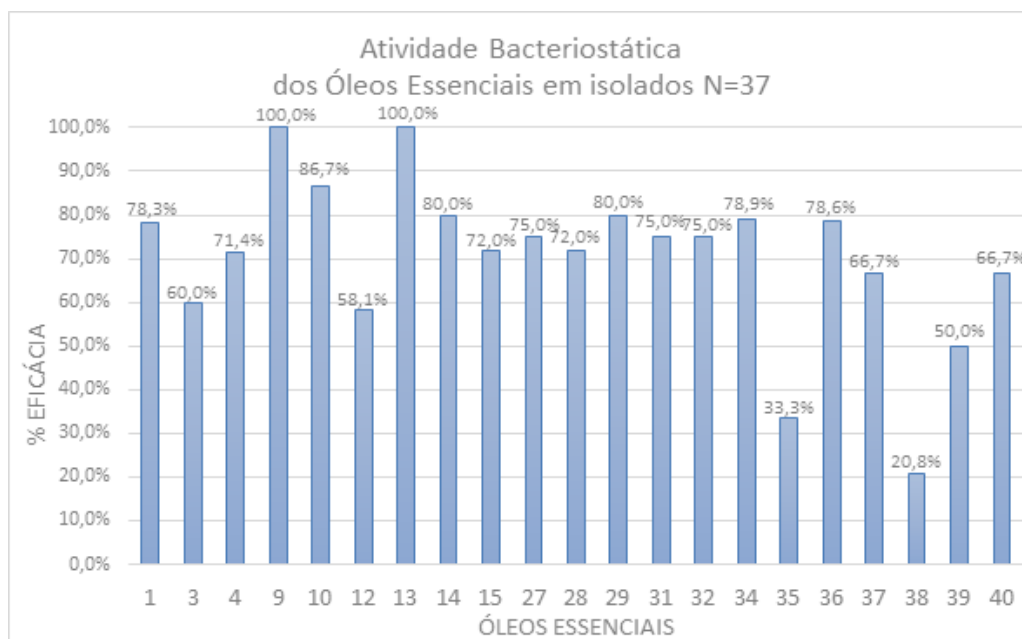


Figura 16: Eficácia da atividade bacteriostática de óleos essenciais em linhagens de bactérias ácido lácticas (LAB)

OE: 1 = *Aloysia gratissima*; 3 = *Artemisia annua*; 4= *Varronia curassavica*; 9= *Piper abutiloides*; 10= *Piper aduncum*; 12= *Vetiveria zizanioides* ; 13= *Achyrocline satureioides*; 14= *Alpinia*; 15= *Baccharis dracunculifolia*; 27= *Ocimum selloi*; 28= *Pilocarpus microphyllus*; 31= *Pimenta rosa*; 32= *Ruta graveolens*; 34= *Piper caldense*; 35= *Piper cernum*; 36= *Piper marginatum* ; 37= *Piper mollicomum*; 38= *Piper ovatum*; 39= *Piper regnellii* ; 40= *Photomorphe umbellata*.

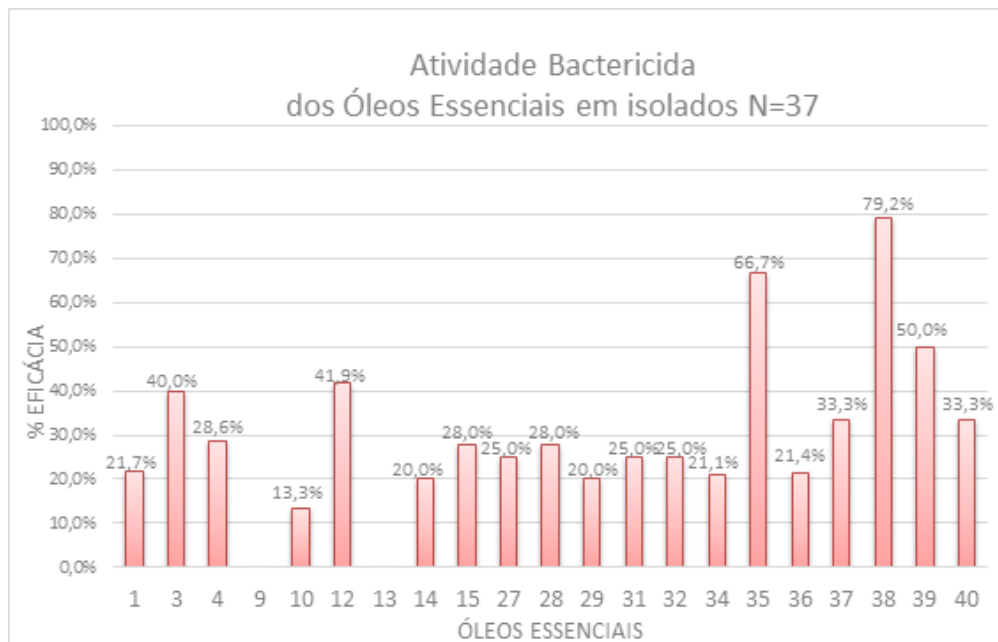


Figura 17: Eficácia da atividade bactericida de OE em linhagens de bactérias ácido lácticas (LAB).

OE: 1 = *Aloysia gratissima*; 3 = *Artemisia annua*; 4= *Varronia curassavica*; 9= *Piper abutiloides*; 10= *Piper aduncum*; 12= *Vetiveria zizanioides* ; 13= *Achyrocline satureioides*; 14= *Alpinia*; 15= *Baccharis dracunculifolia*; 27= *Ocimum selloi*; 28= *Pilocarpus microphyllus*; 31= *Pimenta rosa*; 32= *Ruta graveolens*; 34= *Piper caldense*; 35= *Piper cernum*; 36= *Piper marginatum* ; 37= *Piper mollicomum*; 38= *Piper ovatum*; 39= *Piper regnellii* ; 40= *Photomorphe umbellata*.

Com os resultados obtidos nos ensaios para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) é possível notar que, para a maioria dos OE testados, as concentrações inibitórias variaram entre 0,5 mg/mL e 2,0 mg/mL (Quadro 3). No entanto, alguns OE apresentaram faixas mais amplas de atuação, como o OE de *Vetiveria zizanioides* (12), que apresentou inibição a partir de 8 µg/mL, e os OE de *Achyrocline satureioides* (13) e *Alpinia*, com faixa de inibição a partir de 31,25 µg/mL. Além dos OE de *Artemisia annua* (3), *Varronia curassavica* (4) e *Piper aduncum*, com inibição em concentrações iguais ou superiores a 62,5 µg/mL (Figura 18).

Por outro lado, na avaliação do potencial de atividade bactericida dos OE nos ensaios para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC), nota-se que os óleos de *Artemisia annua* (3); *Vetiveria zizanioides* (12); *Piper cernum* (35); *Piper molicomum* (37); *Piper ovatum* (38); *Piper regnellii* (39) e *Photomorphe umbellata* (40) apresentaram os melhores resultados, com atividade bactericida para pelo menos um terço da população de LAB avaliada. Mereceram destaque os OE de *Piper ovatum* (79,2%), *Piper cernum* (66,7%); *Piper regnellii* (50,0%); *Vetiveria zizanioides* (41,9%) e *Artemisia annua* (40,0%), que apresentaram eficácia da atividade microbicida superior a 40,0% para a população de LAB testada (Figura 17).

Segundo Solórzano-Santos e Miranda-Novales (2011), o potencial bactericida do OE pode ser atribuído à hidrofobicidade destes compostos, o que lhes permite partição com os lipídeos da membrana celular e mitocôndrias das bactérias, causando desestruturação celular e aumentando a permeabilidade da membrana provocando o vazamento de moléculas essenciais à sua sobrevivência e levando as bactérias à morte.

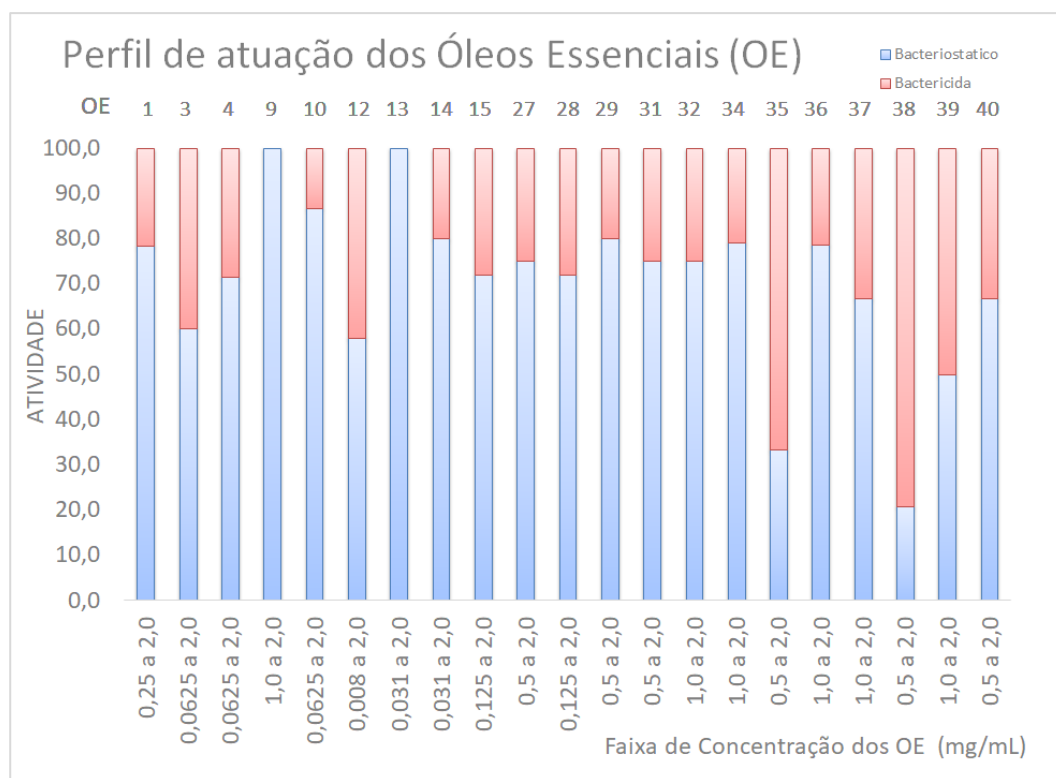


Figura 18: Perfil de atividade (bacteriostática ou bactericida) e faixas de atuação dos OE
 OE: 1 = *Aloysia gratissima*; 3 = *Artemisia annua*; 4= *Varronia curassavica*; 9= *Piper abutiloides*; 10= *Piper aduncum*; 12= *Vetiveria zizanioides* ; 13= *Achyrocline satureioides*; 14= *Alpinia*; 15= *Baccharis dracunculifolia*; 27= *Ocimum selloi*; 28= *Pilocarpus microphyllus*; 31= *Pimenta rosa*; 32= *Ruta graveolens*; 34= *Piper caldense*; 35= *Piper cernum*; 36= *Piper marginatum* ; 37= *Piper mollicomum*; 38= *Piper ovatum*; 39= *Piper regnellii* ; 40= *Photomorphe umbellata*.

Considerando-se os resultados obtidos acerca da eficácia de atuação dos OE em LAB, efeito microbicida, além das faixas de atuação dos 21 OE avaliados, foram selecionados os OE *Aloysia gratissima* (1); *Vetiveria zizanioides* (12); *Baccharis dracunculifolia* (15); *Pilocarpus microphyllus* (28); *Photomorphe umbellata* (40) além de todos os OE provenientes de plantas do gênero *Piper* (*P.abutiloides* (9); *P.aduncum* (10); *P.caldense* (34); *P.cernum* (35); *P.marginatum* (36); *P. mollicomum* (37) e *P. ovatum* (38) para avaliação do perfil químico, cujos resultados são apresentados posteriormente no Capítulo 5.

4.5 REFERÊNCIAS

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V; BUCKERIDGE, M.S; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology** 91: 1267-1275, 2011.

BISCHOFF, K.M., SKINNER-NEMEC, K.A. & LEATHERS, T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 739–744 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0250-4>

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, v.23 (2) Wayne, Pennsylvania USA, 2005.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred Accuracy Assessment. **Genome Research**, 8:175-185, 1998.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16, p.111-120, 1980.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J.L.S.; NUNES, A.C.; AZVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.L.; MORAIS JUNIOR, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, 2010, 10:298

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2001.

MAIORELLA B, BLANCH HW, WILKE CR (1983) By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 25:103–121

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J.Am.Soc. Brew.Chem.* 1994, 59:187-194.

NARENDRANATH NV, THOMAS KC, INGLEDEW WM (2001) Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J Am Soc Brew Chem* 59:187–194

NOBRE, T.P., HORII, J.; ALCARDE, A.R. Cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in association with contaminant bacteria of alcoholic fermentation. *Ciência Tecnol. Aliment.* 2007, 27:20-25.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4, p.406-425, 1987.

SCHLOSS, P.D et al Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community- supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23):7537-7541, 2009. f

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J.Ind.Microbiol. Biotechnol* .2004. 31:401-408

SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23:(2)136-141. 2011

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24, p.1596-1599, 2007.

THOMAS KC, HYNES SH, INGLEDEW WM (2002) Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol* 68:1616–1623

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS. D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 24, p.4876-4882, 1997.

Capítulo 5

Composição Química, *Blends* de Óleos Essenciais e Fermentação usando *Blend*

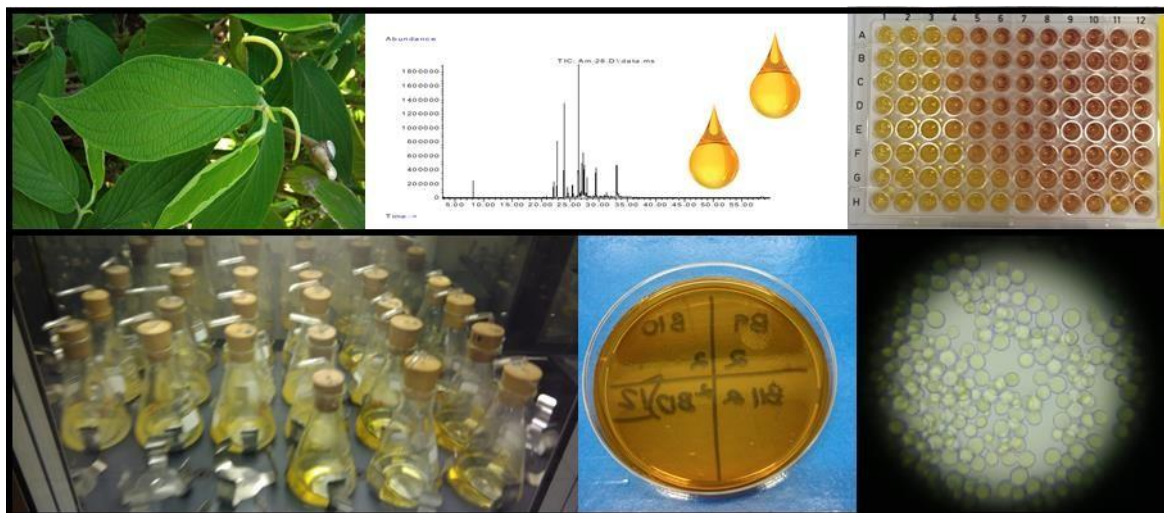


Figura 19: Etapas de avaliação dos óleos essenciais
 FONTE: Elaborada pela autora.

APRESENTAÇÃO

Este Capítulo refere-se à terceira etapa da triagem dos OE que envolveu a análise da composição química e as avaliações de diferentes misturas de óleos essenciais, aqui denominadas *blends*. Em adição, são apresentados os resultados dos ensaios de fermentação utilizando levedura, bactéria e *blend* de óleos essenciais que resultaram na Patente BLEND 1251 “Composições e seu uso” depositada sob Número do Processo: BR 10 2018 016804 5, apresentada no Capítulo 6.

5.1 PERFIL QUÍMICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

5.1.1 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA: CRITÉRIO DE SELEÇÃO

Após as duas primeiras etapas de triagem dos OE, que consistiram na seleção de OE com perfis desejáveis de seletividade de inibição (bactericidas e/ou bacteriostáticos para linhagens de LAB, porém inertes para linhagens de leveduras *Saccharomyces sensu stricto*), foi realizada a terceira etapa de triagem dos OE. Nesta última etapa, análises para avaliação da composição química dos óleos essenciais com os melhores desempenhos de atividade antimicrobiana e seletividade foram realizadas.

5.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.2.1 Óleos avaliados

De acordo com os resultados obtidos nas etapas anteriores discutidas nos Capítulos 3 e 4 a respeito da eficácia de atuação dos OE em LAB, o efeito microbicida, as faixas de atuação dos OE avaliados, e de acordo com os critérios descritos no item 5.1.1, os OE listados a seguir foram avaliados em relação à composição química: (1) *Aloysia gratissima*; (9) *Piper abutiloides*, (10) *Piper aduncum*; (12) *Vetiveria zizanioides*; (15) *Baccharis dracunculifolia*; (28) *Pilocarpus microphyllus*; (34) *Piper caldense*; (35) *Piper cernuum*; (36) *Piper marginatum*; (37) *Piper mollicomum*; (38) *Piper ovatum* e (40) *Photomorphe umbellata*.

5.1.2.2 Análise de composição química dos óleos essenciais

A avaliação da composição química foi realizada na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF) do CPQBA, empregando Cromatografia a Gás acoplada a Detector de Massas (CG-EM). Para as análises cromatográficas, todas as amostras de OE com perfil desejável de seletividade foram pesadas, solubilizadas em acetato de etila (20 mg.mL⁻¹) e analisadas por Cromatografia a Gás acoplada a Detector Seletivo de

Massas (CG-EM) para determinação de sua composição química. Foi utilizado o cromatógrafo Agilent 6890 N e detector de espectrometria de massas Agilent 5975 e coluna HP5-MS (J&W Scientific) contendo 5% de Fenilmetilsiloxano, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme. As condições para as análises cromatográficas foram: Temperaturas: injetor= 220°C, detector= 250°C, coluna= 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C e vazão do gás de arraste (He) 1,0 mL.min⁻¹. Para todas as análises o detector de espectrometria de massas foi operado com temperaturas: fonte 230 °C e quadrupolo 150 °C; e energia de ionização de 70 eV.

A identificação de componentes de óleos voláteis usando CG e de CG-EM vem sendo aplicada com sucesso para identificar substâncias de estruturas conhecidas porque, em sua maioria, os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção (índice de retenção) obtidos em colunas de polaridades diferentes e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados (ADAMS, 2007).

Foi realizada a identificação dos compostos através da comparação dos espectros de massas das amostras com dados da biblioteca NIST-05 (*National Institute of Standards and Technology*). Para as amostras de OE também foi calculado o Índice Aritmético (IA), de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (Figura 14), com co-injeção de padrão de hidrocarbonetos (C8 a C22) e dados descritos por Adams (2007).

$$IA = 100 \cdot C_{(n-1)} + \frac{[(Tr_{(x)} - Tr_{(Cn-1)}) \cdot (C_{(n)} - C_{(n-1)})] \cdot 100}{Tr_{(Cn)} - Tr_{(Cn-1)}}$$

Figura 20: Equação de Van den Dool e Kratz utilizada para calcular o índice aritmético (IA) (Adaptado de Adams, 2007).

Onde: C_{n-1} - Número de carbonos do hidrocarboneto $n-1$; $Tr_{(x)}$ - Tempo de retenção do composto na amostra; $Tr_{(Cn-1)}$ - Tempo de retenção do hidrocarboneto $n-1$; C_n - Número de carbonos do hidrocarboneto n ; $Tr_{(Cn)}$ - Tempo de retenção do hidrocarboneto n .

5.1.3 RESULTADOS

As análises cromatográficas permitiram identificar e quantificar os componentes dos OE que apresentarem perfil de inibição desejável (inertes para linhagens de leveduras e com atividade para as linhagens de LAB) cujas eficácias foram superiores a 70%. Esta caracterização do perfil químico teve a finalidade de avaliar similaridades dos principais constituintes químicos, bem como dos compostos majoritários nos diferentes óleos essenciais (OE) com melhores performances antimicrobiana avaliados nos ensaios de atividade inibitória e microbicida.

A composição química detalhada de cada um dos 12 OE está apresentada nas Tabela 5 a 17.

Tabela 5: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Aloysia gratissima* (1).
Eficácia: 70,3%; Atividade microbicida: 21,7%.

t_R (min)^(a)	IR^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel.^(c)
5,32	933	alfa-pineno	2,49
6,56	980	beta-pineno	22,06
6,79	988	beta-mirceno	3,89
8,14	1029	Limoneno	2,84
8,68	1044	trans-ocimeno	0,80
13,24	1163	trans-pinocanfona	9,30
13,86	1178	cis-pinocanfona	2,78
18,86	1297	acetato de trans-pinocarvila	7,80
23,98	1419	trans-cariofileno	9,80
25,42	1454	alfa-humuleno	1,62
26,48	1481	gemacreno D	7,85
27,06	1495	Biciclogermacreno	4,38
29,54	1558	gemacreno B	10,84
30,43	1581	óxido de cariofileno	2,16
31,05	1597	M = 222 ^(d)	8,66
33,58	1665	Bulnesol	2,73

Notas: (a) tempo de retenção (b) índice de retenção (c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) massa molar

Tabela 6: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper abutiloides* (9).
Eficácia: 43,2%; Atividade microbica: 0%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,34	933	alfa-pineno	0,55
6,56	979	beta-pineno	0,28
7,40	1008	para-cimeno	0,45
7,74	1018	orto-cimeno	2,10
8,33	1034	cis-ocimeno	1,42
8,70	1045	trans-ocimeno	1,63
9,17	1058	gama-terpineno	6,17
10,18	1086	Terpinoleno	2,21
24,00	1419	trans-cariofileno	9,03
25,53	1457	Croweacina	2,71
27,11	1496	Valenceno	16,56
28,27	1526	M = 204	0,52
29,64	1561	trans-nerolidol	1,12
30,24	1576	Espatulenol	0,52
31,75	1616	M = 208	0,62
31,95	1621	1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno	10,97
33,11	1653	Dilapiol	19,76
33,19	1655	n.i.	0,99
34,01	1677	trans-asarona	2,22
35,36	1714	m = 208	20,21

Notas: (a) tempo de retenção (b) índice de retenção (c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) massa molar

Tabela 7: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper aduncum* (10).
Eficácia: 18,5% Atividade microbica: 13,3%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,34	934	alfa-pineno	2,52
6,56	980	beta-pineno	3,05
8,33	1035	cis-beta-ocimeno	5,69
8,73	1046	trans-beta-ocimeno	15,86
18,70	1293	Safrol	10,44
23,97	1419	trans-cariofileno	2,84
24,74	1438	Aromadendreno	1,06
25,44	1455	alfa-humuleno	3,26
26,49	1481	germacreno D	5,34
27,14	1497	Biciclogermacreno	38,64
27,53	1507	beta-bisaboleno	1,11
27,77	1513	gama-cadineno	1,18
27,87	1515	M = 222	1,96
27,98	1518	M = 204	3,72
29,52	1558	germacreno B	0,74
30,26	1577	Espatulenol	2,59

Notas: (a) tempo de retenção (b) índice de retenção (c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) massa m

Tabela 8: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Vetiveria zizanioides* (12).

Eficácia: 86,5%; Atividade microbica: 41,9%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,35	934	alfa-pineno	8,82
6,56	980	beta-pineno	7,29
26,40	1479	gama-muroleno	3,78
26,71	1486	M = 204 ^(d)	1,55
26,79	1488	M = 202	2,77
29,33	1553	beta-vetiveneno	4,87
31,95	1621	M = 204	1,28
32,02	1623	M = 204	2,51
33,19	1654	M = 222	11,38
33,30	1657	M = 220	1,88
33,42	1661	M = 220	2,10
33,59	1665	Bulnesol	1,92
33,74	1669	M = 218	1,80
34,02	1677	n.i. ^(e)	1,93
34,41	1687	n.i.	3,93
35,70	1723	M = 220	3,34
36,52	1747	M = 220	15,86
37,88	1786	n.i.	6,47
38,80	1812	ácido vetivênico	12,34
39,66	1838	alfa-vetivona	4,20

Notas: a) tempo de retenção b) índice de retenção

c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

d) massa molar e) não identificado

Tabela 9: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Baccharis dracunculifolia* (15).

Eficácia: 73,0% Atividade microbica: 28,0%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,35	934	alfa-pineno	6,08
6,58	980	beta-pineno	13,42
6,81	989	beta-mirceno	2,90
8,19	1031	Limoneno	26,74
23,97	1419	trans-cariofileno	1,94
26,49	1481	germacreno D	5,48
27,09	1496	Biciclogermacreno	7,70
27,20	1498	alfa-muroleno	1,06
27,98	1518	delta-cadineno	3,78
29,75	1563	trans-nerolidol	22,54
30,31	1578	Espatulenol	5,41
30,60	1585	n.i. ^(e)	1,92
33,23	1655	M = 204 ^(d)	1,05

Notas: a) tempo de retenção b) índice de retenção

c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

d) massa molar e) não identificado

Tabela 10: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Pilocarpus microphyllus* (28)

Eficácia: 67,6% Atividade microbica: 28,0%

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
8,16	1030	Limoneno	1,79
22,17	1375	M = 204 ^(d)	2,28
22,78	1390	beta-elemeno	10,63
24,03	1420	trans-cariofileno	17,30
24,62	1435	alfa-guaieno	1,64
25,44	1455	alfa-humuleno	2,06
26,55	1482	germacreno D	27,75
26,80	1488	M = 204	0,86
27,09	1496	Biciclogermacreno	6,62
27,35	1502	alfa-bulneseno	9,51
27,56	1508	germacreno A	5,63
27,98	1518	delta-cadineno	3,24
29,55	1558	germacreno B	4,84
31,40	1606	5-epi-7-epi alfa-eudesmol	0,75
33,16	1654	M = 222	5,12

Notas: a) tempo de retenção b) índice de retenção

c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

d) massa molar

Tabela 11: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper caldense* (34)

Eficácia: 77,8% Atividade microbica : 21,1%

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,34	933	alfa-pineno	0,42
6,56	979	beta-pineno	1,07
8,16	1030	Limoneno	3,73
8,70	1045	trans-ocimeno	1,67
24,04	1420	trans-cariofileno	23,26
25,43	1455	alfa-humuleno	1,01
26,48	1480	gama-muroleno	1,96
26,79	1488	beta-selineno	1,04
27,17	1498	Biciclogermacreno	43,00
27,54	1507	alfa-bisaboleno	1,45
27,97	1518	delta-cadineno	1,36
29,52	1558	germacreno B	0,97
29,70	1563	trans-nerolidol	10,83
30,26	1577	Espatulenol	1,71
30,44	1582	óxido de cariofileno	1,72
30,61	1586	n.i.	2,69
30,92	1594	Khusimona	0,73
33,22	1656	M = 222	1,39

Notas: a) t_R (min)= tempo de retenção b) IR =índice de retenção

c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

d) M=massa molar

Tabela 12: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper cernuum* (35)
Eficácia: 97,0% Atividade microbica: 66,7%

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,35	934	alfa-pineno	6,94
6,56	979	beta-pineno	0,32
6,81	989	beta-mirceno	1,49
7,40	1008	para-cimeno	1,99
8,26	1032	beta-felandreno	21,02
8,33	1034	cis-ocimeno	1,39
8,70	1045	trans-ocimeno	0,51
10,70	1101	Linalol	0,80
23,98	1419	trans-cariofileno	3,28
26,47	1480	gama-muuroleno	1,37
27,14	1497	Biciclogermacreno	28,61
27,77	1513	gama-cadineno	1,49
27,86	1515	n.i.	1,10
27,99	1519	delta-cadineno	6,47
29,69	1562	trans-nerolidol	6,37
30,28	1577	Espatulenol	8,41
30,57	1585	beta-copaen-4-alfa-ol	1,41
32,73	1642	epi-alfa-cadinol	1,05
32,81	1644	M = 222	1,42
33,25	1656	M = 222	4,57

Notas: a) t_R (min)=tempo de retenção b) IR =índice de retenção
c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) M=massa molar

Tabela 13: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper marginatum* (36)
Eficácia: 63% Atividade microbica: 21,4%

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,36	934	alfa-pineno	15,73
6,57	980	beta-pineno	8,00
6,81	989	beta-mirceno	2,02
8,18	1030	Limoneno	4,69
8,34	1035	1,8-cineol (eucaliptol)	55,74
14,68	1198	M = 136	4,44
26,47	1480	germacreno D	1,54
27,07	1495	M = 204	3,59
29,52	1558	germacreno B	1,78
29,65	1561	M = 204	2,47

Notas: a) t_R (min)=tempo de retenção b) IR =índice de retenção
c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) M=massa molar

Tabela 14: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper molicomum* (37).

Eficácia: 29,6% Atividade microbica: 33,3%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
5,36	934	alfa-pineno	15,36
6,57	980	beta-pineno	8,00
6,81	989	beta-mirceno	1,97
8,18	1030	Limoneno	5,03
8,35	1035	1,8-cineol (eucaliptol)	63,31
14,68	1198	M = 136	4,89
29,65	1561	M = 204	1,44

Notas: a) t_R (min)=tempo de retenção b) IR =índice de retenção

c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) M=massa molar

Tabela 15: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Piper ovatum* (38).

Eficácia: 95,0% Atividade microbica: 79,2%.

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
5,35	933	alfa-pineno	4,40
6,57	980	beta-pineno	12,70
6,84	990	beta-mirceno	19,77
8,70	1045	trans-ocimeno	0,88
10,18	1086	Terpinoleno	2,14
22,75	1389	beta-elemeneno	1,44
23,97	1419	trans-cariofileno	2,39
26,48	1481	gama-muuroleno	4,70
27,08	1495	Biciclogermacreno	6,41
27,20	1498	alfa-muuroleno	1,25
27,53	1507	alfa-bulneseno	2,87
27,77	1513	gama-cadineno	1,53
27,86	1515	n.i.	2,19
27,99	1518	delta-cadineno	7,81
30,27	1577	Espatulenol	10,64
32,73	1642	epi-alfa-cadinol	2,26
32,82	1645	M = 222	3,51
33,28	1657	M = 222	13,14

Notas: a) t_R (min)=tempo de retenção b) IR =índice de retenção

c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma

d) M=massa molar

Tabela 16: Perfil Químico do Óleo Essencial de *Photomorphe umbellata* (40).
Eficácia: 66,7% Atividade microbica: 33,3%.

t_R (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos identificados na amostra	% rel. ^(c)
23,97	1419	trans-cariofileno	14,23
26,25	1475	gama-muuroleno	3,69
26,49	1481	germacreno D	47,62
27,07	1495	M = 204	11,92
27,75	1512	gama-cadineno	3,56
27,97	1518	Nootkateno	8,79
32,19	1628	1-epi-cubenol	4,01
33,21	1656	M = 204	6,20

Notas: a) t_R (min)= tempo de retenção b) IR =índice de retenção
c) %rel =fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma d) M=massa molar

A partir dos resultados da análise comparativa de composição química dos OE apresentados nas Tabelas de 5 a 16, é possível notar uma ampla diversidade de constituintes químicos.

Esta variabilidade de composição química é uma característica interessante para aplicação biotecnológica, uma vez que pode contribuir para que combinações de óleos essenciais distintos tenham atividades complementares com diferentes alvos celulares, favorecendo seu uso de maneira a evitar resistência por parte dos contaminantes. Além disso, esta amplitude de composição química quando utilizada de modo a combinar diferentes óleos essenciais pode resultar não apenas em um efeito somatório, mas em uma ação sinérgica dos componentes, possibilitando a ampliação da eficácia e/ou redução da concentração de uso.

Os dados da análise comparativa de composição química dos OE juntamente com os dados de eficácia, atividade microbica e faixa de atuação, discutidos previamente nos capítulos anteriores possibilitaram a seleção dos OE de *Aloysia gratissima* (1); *Vetiveria zizanioides* (12); *Baccharis dracunculifolia* (15); *Pilocarpus microphyllus* (28); *Piper caldense* (34); *Piper cernum* (35) e *Piper ovatum* (38) para avaliações subsequentes de composições (*blends*) utilizando a combinação destes OE, cujos resultados são apresentados e discutidos a seguir.

5.2 COMBINAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS – BLENDS

A partir dos resultados da análise da última etapa de triagem, os OE de *Aloysia gratissima* (1); *Vetiveria zizanioides* (12); *Baccharis dracunculifolia* (15); *Pilocarpus microphyllus* (28); *Piper caldense* (34); *Piper cernum* (35) e *Piper ovatum* (38) foram selecionados para avaliações de composições (*blends*) utilizando a combinação destes OE. Assim, foram realizados experimentos em microplaca com diferentes combinações dos OE (*Blends*) para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC), utilizando diferentes espécies de bactérias contaminantes isoladas a partir de processos fermentativos de produção de bioetanol.

Foram realizados aproximadamente 200 ensaios para avaliação antimicrobiana de 60 composições (*blends*) distintas, contendo de 2 a 6 óleos essenciais, para cada micro-organismo testado. Os ensaios foram realizados em microplaca com a mesma metodologia utilizada para avaliar a atividade de óleos essenciais isoladamente em contaminantes bacterianos, conforme descrito no Capítulo 4. Todos os ensaios foram realizados com avaliações baseadas no planejamento experimental de misturas descritos por Barros et al. (2002) e as concentrações utilizadas para as condições variaram de 0,001 a 2,0 mg/mL. Para todos os experimentos, o ponto central, composto pela combinação de um maior número de OE, foi realizado em triplicata.

A seguir são apresentados alguns dos resultados da análise destas composições com combinações dos OE (*Aloysia gratissima* (1); *Vetiveria zizanioides* (12); *Baccharis dracunculifolia* (15); e *Pilocarpus microphyllus* (28)). Os outros resultados referentes aos blends testados, incluindo combinações com óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Piper*, estão discutidos na patente no Capítulo 6, evidenciando as combinações mais promissoras.

Quadro 4: Atividade antimicrobiana de 11 Composições de Óleos Essenciais (Blends) em bactérias contaminantes.

Legenda: E_ = nome da composição (*Blend* testado); OE= Óleo Essencial; (1) = OE *Aloysia gratissima*; (12) = OE *Vetiveria zizanioides*; (15) = OE *Baccharis dracunculifolia*; (28) = OE *Pilocarpus microphyllus* Concentração inibitória em mg/mL

2,0	1,0	0,5	0,3	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001
-----	-----	-----	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

# Isolado	ID Origem	Identificação	OE isodamente	Blends																								
	Ano de Isolamento			E7	E8	E9	E13	E14	E15	E22	E23	E24	E25	E27														
				Óleos Essenciais																								
				1	12	15	28	1	12	1	15	1	28	12	15	12	28	15	28	12	15	28	1	12	15	28	1	12
# 12	DBP_SM-2015	Lactobacillus paracasei	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 15	DBP_RBN-2015	Lactobacillus fermentum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 43	DBP_VOM-2016	Lactobacillus ferruginis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 66	DBP_SM-2016	Lactobacillus harbinensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 70	DBP_ARO-2016	Lactobacillus sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 80	DBP_RV-2016	Lactobacillus sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 87	DBP_ORC-2016	Lactobacillus amylovorus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 99	DBP_COP-2016	Leuconostocaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 40	DBP_VOM-2015	Acetobacter sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
# 39	DBP_VOC-2015	Staphylococcus sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora

Na sequência, os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana dos *blends* foram comparados com os ensaios utilizando apenas os óleos constituintes do *blend* isoladamente

No Quadro 5 é apresentado um exemplo de avaliação comparativa do *blend* E24, cujos OE constituintes são: (1) *Aloysia gratissima*; (12) *Vetiveria zizanioides* e (15) *Baccharis dracunculifolia*, com os resultados dos ensaios com óleos essenciais empregados isoladamente. No exemplo mencionado é possível notar que houve uma redução nas MICs, ou seja, uma menor concentração do *blend* E24 (0,5 mg/mL) foi capaz de inibir os micro-organismos contaminantes avaliados quando comparada com a atividade destes mesmos OE isoladamente, em que a menor concentração atingida foi de 2,0 mg/mL. Por outro lado, neste exemplo, houve uma piora na cobertura geral da ação do *blend* E24 sobre os contaminantes em relação ao OE 15.

Quadro 5: Exemplo de análise comparativa entre os resultados de atividade do blend em relação aos resultados obtidos com os OE isoladamente.

Escala de cores correspondente à MIC dos OE (mg/mL):

2,0	1,0	0,5	0,3	0,125	0,063	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001
-----	-----	-----	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Blend E24			E24			OE		
Isolado	Origem	Identificação	1	12	15	1	12	15
# 12	DBP_SM-2015	<i>Lactobacillus paracasei</i>				-	-	
# 15	DBP_RBN-2015	<i>Lactobacillus fermentum</i>				-		
# 39	DBP_VOC-2015	<i>Staphylococcus sp</i>						
# 40	DBP_VOM-2015	<i>Acetobacter sp</i>	-			-	-	-
# 43	DBP_VOM-2016	<i>Lactobacillus ferruginis</i>				-	-	
# 66	DBP_SM-2016	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	-			-	-	
# 70	DBP_ARO-2016	<i>Lactobacillus sp</i>	-			-	-	
# 80	DBP_RV-2016	<i>Lactobacillus sp</i>				-		
# 87	DBP_ORC-2016	<i>Lactobacillus amylovorus</i>				-		-
# 99	DBP_COP-2016	<i>Leuconostocaceae</i>						

Após a avaliação de cada um dos *blends* com os OE isoladamente, foi realizada uma comparação entre os resultados do *blends* considerando como parâmetros: 1) cobertura, ou seja, capacidade do blend agir sobre o maior número de micro-organismos avaliados; 2) faixa de concentração de atividade do *blend*; 3) atividade bactericida, isto é, capacidade do *blend* de matar os micro-organismos; 4) atividade bacteriostática, ou seja, capacidade de inibir os micro-organismos contaminantes; 5) redução da concentração de uso em relação à concentração obtida nos ensaios com os OE isoladamente e 6) eficácia geral sobre os contaminantes. No Quadro 6 é mostrado um exemplo da comparação entre alguns dos *blends* avaliados.

Quadro 6: Exemplo de avaliação comparativa entre Blends de OE.

Avaliação Comparativa dos *Blends* frente aos OE isolados

Blend	B8			B9			B10				B11				B12				B13			
Composição do Blend	ÓLEOS ESSENCIAIS																					
	34	35	34	35	38	1	34	35	38	12	34	35	38	15	34	35	38	28	34	35	38	
Cobertura																						
Concentração																						
Atividade Bactericida	33%		0%			33%				40%				25%				20%				
Atividade Bacteriostática	67%		100%			67%				60%				75%				80%				
< [] mg/mL	1,0		0,5			2,0				1,0				0,5				1,0				
Eficácia Geral	100%		80%			80%				100%				100%				80%				

LEGENDA

	Melhora em relação à condição usando OE isolado
	Piora em relação à condição usando OE isolado
	Manteve a condição em relação aos OE isolados
< [] mg/mL=	Menor concentração de atividade

No exemplo mencionado, é possível notar diferentes perfis em relação aos parâmetros avaliados, sendo B12 o *blend* cujos resultados são mais promissores dentro da avaliação comparativa neste universo amostral de *blends*.

Após a avaliação comparativa de todos os *blends*, o *blend* denominado B16, cujo perfil está mostrado no Quadro 7, foi selecionado para os testes fermentativos utilizando a levedura industrial PE-2 e um contaminante bacteriano de *Lactobacillus paracasei*, que foi o micro-organismo predominante nas contaminações avaliadas neste estudo.

Os ensaios fermentativos, bem como os resultados, estão detalhadamente descritos no Capítulo 6, que consta da patente *Composições e seu uso*, depositada sob Número do Processo INPI: BR 10 2018 0168045.

Quadro 7: Resultado da avaliação comparativa do blend B16.

Blend	B16					
Composição do Blend	12	15	28	34	35	38
Cobertura						
Concentração de atividade						
Atividade Bactericida						57%
Atividade Bacteriostática						43%
< [] mg/mL						0,5
Eficácia Geral						100%

LEGENDA

	Melhora em relação à condição usando OE isolado
	Piora em relação à condição usando OE isolado
	Manteve a condição em relação aos OE isolados
< [] mg/mL=	Menor concentração de atividade

5.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

A realização de ensaios de fermentação em frascos sob agitação foi feita no laboratório de Bioprocessos (DBP) do CPQBA da Unicamp, utilizando a linhagem de levedura PE-2, a linhagem de bactéria láctica contaminante identificada como *Lactobacillus paracasei* e o *blend* de óleos essenciais B16, previamente selecionado com base nos melhores resultados para atividade antimicrobiana determinados neste trabalho.

O critério de escolha da linhagem de levedura para a fermentação foi o fato desta linhagem de levedura padrão comercial ser a mais comumente utilizada pelas unidades industriais, conforme é discutido no Capítulo 3. Já os critérios para a escolha da linhagem de bactéria contaminante estão embasados nos resultados de incidência das diferentes espécies de contaminantes apresentados no Capítulo 4.

Os ensaios de fermentação foram realizados em triplicata utilizando frascos com meio de cultivo sintético apropriado para fermentação, contendo 150 g/L de sacarose; 5 g/L de KH_2PO_4 ; 1,5 g/L de NH_4Cl ; 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L de KCl e 6,0 g/L de extrato de levedura, cuja formulação está descrita em Andrietta et al.(1999).

Nos ensaios de fermentação foram avaliados: população dos micro-organismos (leveduras e LAB) na presença e ausência de OE, além de monitoramento do decréscimo na concentração de açúcares, e produção de etanol e ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico.

A avaliação populacional foi realizada por plaqueamentos em meios específicos para cada micro-organismo, especificados como *meio de manutenção* na Tabela 4 (Capítulo 4). Para as condições que visavam recuperar leveduras para contagem, foram utilizados 100 ppm de monensina sódica para evitar o crescimento bacteriano. Já para as condições cujo objetivo era a recuperação de bactérias, foram utilizados 100 ppm de actidiona (ciclohexamida) para evitar o crescimento de leveduras. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata para cada diluição (10^{-1} a 10^{-12}) para cada frasco, no tempo zero ($t=0$) e 24 h após o início da fermentação ($t=24$ h).

O monitoramento do decréscimo na concentração de açúcares, bem como os níveis de produção de etanol e ácidos orgânicos foram realizados por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) utilizando Breeze 2

HPLC System (Waters).

A seguir são apresentados os resultados relativos à dosagem dos ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) para cada uma das condições nos ensaios fermentativos (Figura 21 e 18). Na Figura 17 é possível notar o efeito inibitório da adição do *Blend* sobre as bactérias, com consequente redução da produção do ácido láctico. Já a produção de ácido acético parece estar mais relacionada à levedura, e não à produção de ácido acético pelas bactérias. No entanto é possível notar que a adição do *Blend* também produziu uma redução da produção de ácido acético.

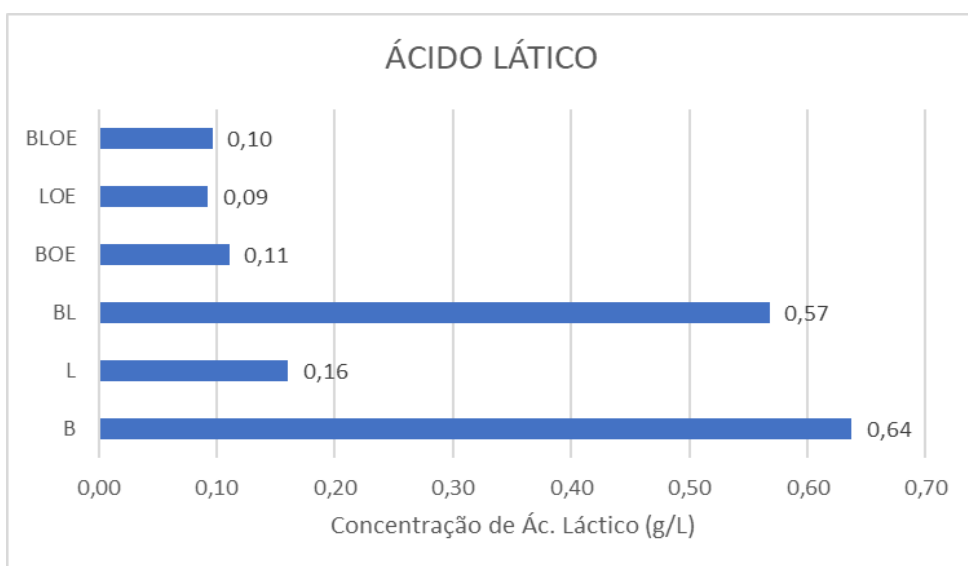


Figura 21: Concentração de ácido láctico em cada uma das condições dos ensaios fermentativos.

Legenda: B= Inóculo apenas com bactérias (*L. paracasei*); L = Inóculo apenas com leveduras (PE-2); BL= Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e leveduras (PE-2); BOE = Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e adição do Blend B16; LOE = Condição contendo inóculo de leveduras (PE-2) e adição do Blend B16; BLOE = Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e leveduras (PE-2) e adição de Blend B16.

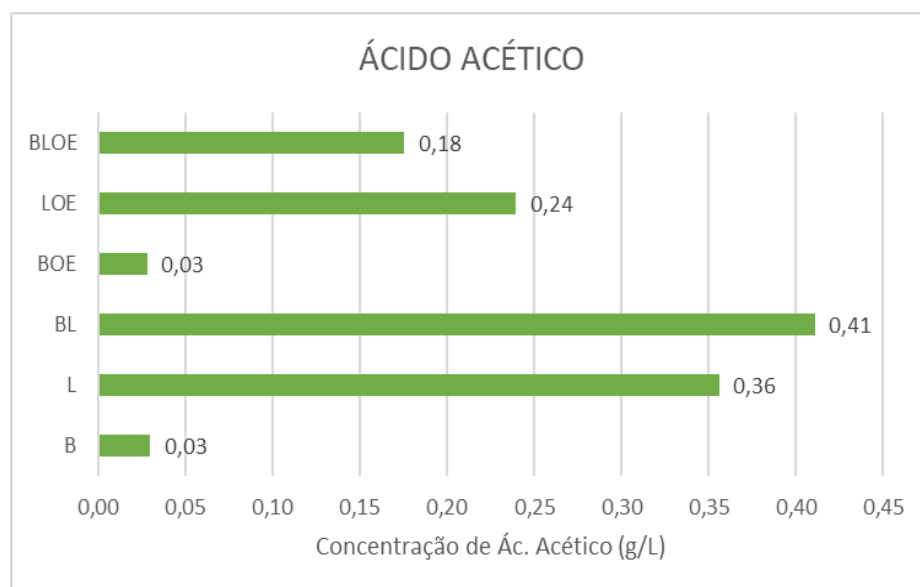


Figura 22: Concentração de ácido acético em cada uma das condições dos ensaios fermentativos. B= Inóculo apenas com bactérias (*L. paracasei*); L = Inóculo apenas com leveduras (PE-2); BL= Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e leveduras (PE-2); BOE = Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e adição do Blend B16; LOE = Condição contendo inóculo de leveduras (PE-2) e adição do Blend B16; BLOE = Condição contendo inóculo de bactérias (*L. paracasei*) e leveduras (PE-2) e adição de Blend B16.

Os demais resultados relativos aos ensaios fermentativos estão descritos no Capítulo 6, que consiste da patente *Composições e seu uso*, depositada sob Número do Processo INPI: BR 10 2018 0168045.

Os resultados dos ensaios de fermentação nos mostram que a adição do *blend* de OE possibilitou um acréscimo no rendimento em etanol em 4%, valor significativamente superior ao relatado por Fadel et al. (2018) que avaliou o efeito da adição de antibióticos e biocidas no rendimento em etanol da fermentação alcoólica.

O efeito da adição de antibióticos e biocidas descritas por Fadel et al. (2018), estão listados na Tabela 17, onde é possível notar que a adição de dióxido de cloro (50 ppm) ocasiona um acréscimo de 0,55%, já a adição de tetraciclina (8-12 ppm) ou amoxicilina (5-8 ppm) ou eritromicina (5-8 ppm) ou ainda Cefadroxil (5-8 ppm) traz um aumento de 0,7% no rendimento em etanol.

Tabela 17: Efeito da adição de antibióticos e biocidas no rendimento em etanol em fermentação alcoólica.

Legenda: < = Menor acréscimo no rendimento em etanol (%);

> = Maior acréscimo no rendimento em etanol (%)

[] avaliadas = concentrações avaliadas

[] ótimas = concentrações ótimas

Antibiótico / Biocida	[] avaliadas	[] ótimas	< (%)	> (%)
Tetraciclina	4 a 12 ppm	10 -12 ppm	0,3	0,7
Penicilina	200 a 800 U/L	600 -800 U/L	0,2	0,75
Virginiamicina	0,5 a 2,0 ppm	1,5 -2,0 ppm	0,2	0,8
Eritromicina	1,0 a 8,0 ppm	5,0 - 8,0 ppm	0,35	0,7
Amoxicilina	1,0 a 8,0 ppm	5,0 - 8,0 ppm	0,5	0,7
Amoxicilina+Flucloxacilina	1,0 a 8,0 ppm	5,0 - 8,0 ppm	0,35	0,75
Cefadroxil	1,0 a 8,0 ppm	5,0 - 8,0 ppm	0,4	0,7
Meta bissulfito de potássio	25 a 150 ppm	75 ppm	-0,8	0,7
Dióxido de cloro	25 a 125 ppm	50 ppm	-0,1	0,55
Dupond™ FermaSure®	10 a 60 ppm	50 ppm	0,2	0,85
Kamorán® (Monensina)	0,2 a 1,0 ppm	2 ppm	0,3	1
Effymol+	0,5 a 2,5 ppm	0,8 -1,0 ppm	0,4	1,1

Fonte: Elaborada pela autora a partir de Fadel et al. (2018).

Além disso, no caso da adição de penicilina (600-800 U/L) o acréscimo em rendimento de etanol é de 0,75%, seguida pela adição e virginiamicina (1,5 - 2,0 ppm) que ocasiona um aumento de 0,8% em rendimento em etanol.

Em suma, o uso do *blend* de óleos essenciais promoveu um acréscimo ao rendimento em etanol aproximadamente quatro vezes maior do que as estratégias disponíveis no mercado, demonstrando características desejáveis e um alto potencial biotecnológico para substituir os antibióticos utilizados no controle da contaminação da fermentação do bioetanol.

5.4REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry 4th ed. Illinois Allured Publ. 2007 804p.

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, Piracicaba, v. 17, n.5, p. 54-59, 1999.

BARROS NETO, B. ; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E.; *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Ed. da Unicamp: Campinas, 2002.

FADEL, M. ZOHRI,A.N.A.;EL-HEENRY,M.S. ADBEL AZIZ, A.M. Managing of bacterial contamination in alcoholic fermentation of sugarcane molasses. *Asina Journal of Science and Technology*. Vol.9: 1,7383-7391. 2018.

Capítulo 6



Figura 23: Blend de óleos essenciais.
Fonte: Elaborada pela autora.

Patente de Invenção ***Composições e seu uso***

Patrícia Regina Kitaka¹, Maria da Graça S. Andrietta¹, Valéria Maia de Oliveira²,
Marta Cristina Teixeira Duarte³, Glyn Mara Figueira⁴

¹Division of Bioprocess, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

²Division of Microbial Resources, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

³Division of Microbiology, Pluridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

⁴ Division of Agrotechnology, Puridisciplinary Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA), UNICAMP, Zip code 13148-218, Paulínia, São Paulo, Brazil

Número do Processo INPI: BR 10 2018 0168045
Procurador Universidade Estadual de Campinas: Ciro de la Cerda

APRESENTAÇÃO

Neste capítulo é apresentada a patente de invenção ***Composições e seu uso*** depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob número de processo INPI: BR 10 2018 0168045, que descreve composições obtidas a partir da combinação de óleos essenciais que apresentaram resultados promissores quando testados em micro-organismos presentes em processos de fermentação industrial, especialmente contaminantes bacterianos oriundos de processos fermentativos de unidades industriais brasileiras. As composições são resultado dos ensaios de avaliações dos óleos essenciais discutidos ao longo deste trabalho.

16/08/2018 870180071984
16:52

29409161711182914

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 016804 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 46068425000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-971

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/08/2018 às 16:52, Petição 870180071984

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÕES E SEU USO

Resumo: A presente invenção descreve composições compreendendo óleos essenciais obtidos preferencialmente a partir de plantas da flora brasileira, em que os óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de Vetiveria zizanioides, Baccharis dracunculifolia, Pilocarpus microphyllus, Piper caldense, Piper ovatum e Piper cernuum. Estas composições são úteis no controle da contaminação bacteriana em processos fermentativos, em especial processos de fermentação alcoólica para obtenção de bioetanol.

Figura a publicar: 7

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Ciro de la Cerda

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 04584518866

Endereço: Rua Roxo Moreira 1831, Caixa Postal 6131 - INOVA UNICAMP

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13083-970

Telefone:

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/08/2018 às 16:52, Petição 870180071984

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5

Nome: PATRÍCIA REGINA KITAKA

CPF: 27735754825

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Imperatriz Leopoldina, 550, Vila Nova

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13073-035

País: BRASIL

Telefone: (19) 997 884644

Fax:

Email: patricia.kitaka@gmail.com

Inventor 2 de 5

Nome: MARIA DA GRAÇA STUPIELLO ANDRIETTA

CPF: 09576132886

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Alexandre Cazellato, 999, Vila Betel

Cidade: Paulínia

Estado: SP

CEP: 13140-000

País: BRASIL

Telefone: (19) 213 92892

Fax:

Email: stupielo@cpqba.unicamp.br

Inventor 3 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/08/2018 às 16:52, Petição 870180071984

Nome: VALÉRIA MAIA MERZEL

CPF: 11943438803

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Alexandre Cazellato, 999, Vila Betel

Cidade: Paulínia

Estado: SP

CEP: 13140-000

País: BRASIL

Telefone: (19) 213 92892

Fax:

Email: vmaia@cpqba.unicamp.br

Inventor 4 de 5

Nome: MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE

CPF: 05727377854

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Alexandre Cazellato, 999, Vila Betel

Cidade: Paulínia

Estado: SP

CEP: 13140-000

País: BRASIL

Telefone: (19) 213 92872

Fax:

Email: mduarte@cpqba.unicamp.br

Inventor 5 de 5

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/08/2018 às 16:52, Petição 870180071984

Nome: GLYN MARA FIGUEIRA
CPF: 05720544836
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Av. Alexandre Cazellato, 999, Vila Betel
Cidade: Paulínia
Estado: SP
CEP: 13140-000
País: BRASIL
Telefone: (19) 213 92892
Fax:
Email: glyn@cpqba.unicamp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	RELATORIO_DESCRITIVO_160818.pdf
Reivindicação	REIVINDICACOES_160818.pdf
Desenho	FIGURAS_160818.pdf
Resumo	RESUMO_160818.pdf
DECLARACAO POSITIVA DE ACESSO	DECLARACAO_POSITIVA_ACESSO_140818.pdf
COMPROVANTE SisGen	Comprovante_SisGen_130818.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU_160818.pdf
Procuração	PROCURACAO_160818.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A8EAA6E

Data da Autorização de Acesso: 13/08/2018

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/08/2018 às 16:52, Petição 870180071984

COMPOSIÇÕES E SEU USO

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se insere no campo da química, mais especificamente na área de processos fermentativos, e descreve composições compreendendo óleos essenciais, em que os referidos óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Pilocarpus microphyllus*, *Piper caldense*, *Piper ovatum* e *Piper cernuum*.

[002] As referidas composições são úteis no controle microbiano de contaminação bacteriana em processos fermentativos, tais como os processos de fermentação alcoólica em usinas sucroalcooleiras produtoras de bioetanol.

[003] Tais composições apresentam perfil bacteriostático e/ou bactericida e visam controlar a contaminação no processo de fermentação, reduzindo ou erradicando o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis.

Fundamentos da invenção:

[004] Nas últimas duas décadas, o uso de antibióticos no controle de bactérias do processo de fermentação alcoólica tem sido uma prática comum na indústria do bioetanol.

[005] Tal uso indiscriminado de antibióticos torna-se alvo de preocupação, tendo em vista a seleção e proliferação de bactérias multirresistentes, uma vez que subprodutos da produção de etanol, tais como a levedura seca, são vendidos como insumos para produção de ração animal e podem afetar a saúde humana.

[006] O bioetanol industrial (combustível) é o produto proveniente da fermentação de açúcares a partir de diversas

2/26

matérias-primas, que incluem a cana-de-açúcar, a beterraba, o milho e o sorgo, utilizando leveduras.

[007] No Brasil, a obtenção de bioetanol combustível é feita majoritariamente a partir do melaço e do caldo da cana-de-açúcar. Estes açúcares são fermentados por leveduras em tanques que promovem um ambiente adequado também para o crescimento de bactérias.

[008] A principal consequência da presença de micro-organismos contaminantes nos tanques é a redução da eficiência fermentativa, acompanhada de uma menor produção de etanol. Em vista deste fato, a contaminação bacteriana precisa ser controlada, uma vez que as bactérias competem com as leveduras do gênero *Saccharomyces* por açúcares presentes no substrato a ser fermentado.

[009] Enquanto as leveduras fazem uso dos açúcares para a produção do bioetanol, as bactérias, por sua vez, produzem diversos metabólitos que inibem o processo de fermentação.

[010] As bactérias produtoras de ácido láctico (do inglês *Lactic Acid Bacteria* ou LAB) ou bactérias lácticas são consideradas o principal problema para o processo, pois são capazes de se desenvolverem de forma vigorosa nas condições dos tanques de fermentação. Essas bactérias podem secretar metabólitos tóxicos, como peptídeos biocidas específicos e ácidos orgânicos, que diminuem o pH do meio e o pH interno das leveduras, inibindo seu desenvolvimento.

[011] Este efeito de inibição e aumento na população de bactérias nas dornas de fermentação causam paradas no processo e acarretam perdas significativas nas usinas produtoras de etanol, comprometendo o rendimento.

[012] Para prevenir a propagação das LAB e limitar as

3/26

perdas, os produtores de etanol fazem uso, de forma contínua, dos mesmos antibióticos utilizados para saúde humana, como penicilina, eritromicina e virginamicina.

[013] De acordo com os princípios de microbiologia e da seleção natural, o uso de antibióticos de forma contínua leva à seleção de bactérias resistentes. Além disso, existe outra restrição em relação ao uso desses produtos nos processos fermentativos, a qual está relacionada aos traços desses antibióticos que podem ser encontrados em subprodutos da produção do etanol.

[014] Frente à problemática exposta, é indispensável a substituição dos antibióticos no controle de contaminação do processo de fermentação para produção de bioetanol. Essa substituição deve pressupor a utilização de substâncias ou produtos que não se tornem resíduos nocivos ao ambiente e, conseqüentemente, um risco para a saúde humana.

[015] Alguns processos de fermentação utilizam métodos alternativos, sem o uso de antibióticos, para controlar a proliferação de bactérias, porém sem sucesso. Dentre eles, podemos citar adição de ácidos, dióxido de cloro estabilizado (SCD), peróxido de ureia hidrogênio (UHP) e extrato de lúpulo.

[016] Tanto a adição de ácidos quanto o uso de dióxido de cloro estabilizado (SCD) não apresentam seletividade aos micro-organismos desejáveis, afetando tanto bactérias quanto leveduras.

[017] Por outro lado, o peróxido de ureia apresenta problemas de produção e armazenagem, além do fato de poder ser metabolizado por leveduras, inativando sua ação contra bactérias.

4/26

[018] Assim, como os demais métodos acima descritos, o extrato de lúpulo também não atende à demanda de conter a contaminação bacteriana, visto que não apresenta eficácia desejada no controle de contaminação em processos com alta taxa de infecção.

[019] Desta forma, embora haja tentativas de métodos alternativos ao uso de antibióticos no controle de contaminação na fermentação, a demanda por uma solução isenta de antibióticos que seja suficientemente seletiva e eficaz ainda permanece no panorama industrial.

[020] Sendo assim, a busca por produtos naturais surge como alternativa viável para este tipo de substituição.

[021] No Brasil, a biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas. A identificação e o entendimento dos mecanismos de ação dos compostos presentes em plantas têm sido objeto de estudo de inúmeras pesquisas, já que a busca por compostos com atividade biológica provenientes de plantas tem aumentado consideravelmente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

[022] Em todas as partes da planta, podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário, os quais dão origem a uma série de substâncias conhecidas e com diversas aplicações. Este fato motiva a investigação de produtos naturais como os óleos essenciais e extratos vegetais.

[023] Óleos essenciais são produtos obtidos a partir de partes de plantas (flores, brotos, sementes, folhas, ramos, cascas, frutos e raízes) através de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação. São

5/26

misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.

[024] Quimicamente, os óleos essenciais são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre em diferentes concentrações.

[025] Entretanto, a aplicação dos óleos essenciais não se restringe apenas a atividades relacionadas a fragrâncias e aromas, uma vez que estes são considerados a principal fonte de substâncias com atividade antimicrobiana.

[026] Sendo assim, óleos essenciais e seus componentes podem representar uma alternativa na substituição de antibióticos utilizados no controle de contaminação bacteriano no processo de fermentação para obtenção do bioetanol.

[027] Sob este panorama, são aqui propostas composições compreendendo misturas de diferentes óleos essenciais como alternativa no controle de contaminação no processo de fermentação alcoólica.

Estado da técnica:

[028] Alguns documentos do estado da técnica descrevem processos e composições que visam controlar o crescimento de micro-organismos indesejáveis em processos fermentativos.

[029] Em "*Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate Lactobacillus fermentum from the fermentation process for fuel ethanol production*" (Costa, M.A.S. et al.), é descrito um tratamento com ácido sulfúrico acrescido de 5 % de etanol para eliminar a bactéria *Lactobacillus fermentum* do processo de fermentação para a produção de etanol.

6/26

[030] No documento "*Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation*" (Meneghin, S.P. et al.), verifica-se o efeito do dióxido de cloro contra bactérias contaminantes da fermentação alcoólica através do método da concentração inibitória mínima (CIM), assim como seu efeito sobre o fermento industrial.

[031] Em US 20160270404, faz-se referência a um método e composição para controlar os micro-organismos indesejáveis em processos de fermentação. A combinação sinérgica desta composição tensoativa e do pH ácido da solução aquosa de fermentação é eficaz para o controle dos níveis de uma ou mais bactérias indesejáveis e/ou subprodutos bacterianos, enquanto que a levedura fermentadora permanece adequadamente viável.

[032] No documento WO2011116042A2, é descrito um método para controlar o crescimento bacteriano em sistemas de fermentação de etanol, com antibióticos alternativos, que podem ser biocidas não oxidantes, oxidantes estabilizados ou a combinação destes que utilizam milho como substrato ou fermentação cervejeira.

[033] Em WO2013074277, é revelado um método de alto rendimento para fermentar carboidrato em etanol e prevenção e/ou ruptura de biofilmes.

[034] O artigo "Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas" (Miranda, C.A.S.F. et al.) as propriedades antibacterianas do óleo essencial de algumas espécies, entre as quais *B. dracunculifolia*, que apresentou atividade antibacteriana para bactérias Gram negativas e Gram-positivas.

7/26

[035] Diferentemente, a tecnologia proposta na invenção, composta majoritariamente por óleos essenciais, foi testada em diferentes micro-organismos contaminantes, os quais foram isolados de diferentes processos industriais, se mostrando eficaz na atividade bactericida sem afetar as leveduras, melhorando o rendimento em etanol, quando comparado com condições em que há presença de bactérias contaminantes.

Breve descrição da invenção:

[036] Esta invenção descreve composições compreendendo combinações de óleos essenciais, em que os referidos óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Pilocarpus microphyllus*, *Piper caldense*, *Piper ovatum* e *Piper cernuum*.

[037] As referidas composições são úteis no controle da contaminação bacteriana em processos fermentativos, tais como os processos de fermentação alcoólica em usinas sucroalcooleiras produtoras de bioetanol.

Breve descrição das figuras:

[038] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[039] A Figura 1 representa o perfil eletroforético cromossômico do DNA genômico das linhagens de *Saccharomyces sensu stricto* avaliadas usando eletroforese de campo pulsado, em que as linhagens SA-1; PE2; CA-1; BG-1; FT858L e ANG são padrões de linhagens de leveduras selecionadas comerciais e as linhagens DBP_AR; DBP_RV; DBP_SF; DBP_SM; DBP_BPA; DBP_CVG; DBP_TFT e DBP_CLE são linhagens nativas.

[040] A figura 2 representa a diferenciação de perfil cromossômico das linhagens padrão SA-1; PE2; CA-1; BG-1;

8/26

FT858L e ANG e das linhagens nativas DBP_AR; DBP_RV; DBP_SF; DBP_SM; DBP_BPA; DBP_CVG; DBP_TFT e DBP_CLE.

[041] A Figura 3 representa graficamente a eficácia da atividade dos óleos essenciais em bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica.

[042] A Figura 4 representa graficamente a eficácia da atividade bacteriostática dos óleos essenciais em linhagens de bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica.

[043] A Figura 5 representa graficamente a eficácia da atividade bactericida dos óleos essenciais em linhagens isoladas de bactérias provenientes de fermentação alcoólica de unidades industriais.

[044] A Figura 6 representa graficamente a contagem de leveduras nos diferentes tratamentos no tempo zero (T0) e após 24h de fermentação (T24).

[045] A Figura 7 representa graficamente a contagem de bactérias nos diferentes tratamentos no tempo zero (T0) e após 24h de fermentação (T24).

[046] A Figura 8 representa graficamente o rendimento em etanol relativo para todos os tratamentos avaliados no ensaio de fermentação: apenas com a levedura (L); com bactérias e leveduras (B+L); com leveduras + mistura de óleos essenciais (LOE) e com bactérias + leveduras + mistura de óleos essenciais (BLOE).

Descrição detalhada da invenção:

[047] Esta invenção descreve composições compreendendo óleos essenciais, em que os referidos óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Pilocarpus microphyllus*, *Piper*

9/26

caldense, *Piper ovatum* e *Piper cernuum*.

[048] Em uma modalidade preferida da presente invenção, a composição apresenta concentração final de 2 mg/mL e os óleos nas seguintes concentrações:

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 18%, de óleo essencial de *Vetiveria zizanioides*;
- de 0,1 a 99%, preferencialmente 18%, de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*;
- de 0,1 a 99%, preferencialmente 19%, de óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*;
- de 0,1 a 99%, preferencialmente 22%, de óleo essencial de *Piper caldense*;
- de 0,1 a 99%, preferencialmente 3%, de óleo essencial de *Piper ovatum*;
- de 0,1 a 99%, preferencialmente 20%, de óleo essencial de *Piper cernuum*; e
- de 0,1 a 10%, preferencialmente 1%, de Tween 80.

[049] As referidas composições são úteis no controle da contaminação bacteriana em processos fermentativos, tais como os processos de fermentação alcoólica em usinas sucroalcooleiras produtoras de bioetanol, sendo as mesmas seletivas, de modo que a combinação sinérgica dos óleos essenciais não apenas reduz como também elimina uma ou mais bactérias contaminantes e, concomitantemente, permanece inerte para diferentes leveduras do processo, sendo elas selecionadas ou nativas.

Testes realizados:

[050] Para realizar os ensaios de susceptibilidade aos óleos essenciais (OE), foram selecionadas linhagens selecionadas de padrões comerciais de leveduras (SA-1; PE2;

10/26

CAT-1; BG-1; FT858L e ANG) além de linhagens nativas (isoladas a partir de amostras de fermentos provenientes de processos industriais de produção de bioetanol de diferentes usinas brasileiras).

[051] Em seguida, o perfil cromossômico das linhagens de leveduras foi comparado e avaliado, a fim de determinar diferentes linhagens. Dessa forma, quatorze linhagens distintas isoladas a partir de amostras de unidades industriais produtoras de bioetanol, incluindo os padrões comerciais, foram selecionadas para realizar os ensaios de determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) frente aos óleos essenciais (vide Figuras 1 e 2, que indicam a análise de identidade molecular e perfil cromossômico para diferenciação de linhagens de leveduras).

[052] Os óleos essenciais utilizados foram obtidos comercialmente ou através de extração de material vegetal por hidrodestilação.

[053] Uma triagem inicial foi realizada para garantir que fossem selecionados apenas óleos essenciais que apresentassem perfil adequado (inertes para todas as linhagens de *Saccharomyces sensu stricto* provenientes de fermentação alcóolica em todas as concentrações testadas, ou seja, que não apresentaram atividade inibitória para as linhagens de leveduras isoladas de processo industrial) para posterior avaliação da atividade antimicrobiana.

[054] Os óleos essenciais selecionados foram, então, testados para avaliar o potencial inibitório e microbicida frente às linhagens de bactérias isoladas de amostras de fermentação alcóolica de diferentes unidades industriais e compreendem micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus*,

11/26

Acetobacter, *Staphylococcus* e micro-organismos da família *Leuconostocaceae*, sendo o grupo de *Lactobacillus* o mais abundante, o qual incluiu espécies de *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. ferruginis* e *L. amylovorus*, além de *L. harbinensis*. Os ensaios para determinação de atividade inibitória (MIC) e os ensaios para determinação de atividade bactericida (MBC) foram realizados de acordo com protocolos já conhecidos e descritos em CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria*, 2005).

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) em bactérias isoladas em processos de fermentação industriais:

[055] Ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos óleos essenciais frente às linhagens de bactérias isoladas em processos de fermentação industriais foram realizados utilizando apenas os óleos essenciais que não apresentaram atividade nos ensaios de atividade antimicrobiana para todas as leveduras avaliadas.

[056] Para estes ensaios, foram preparados inóculos de 37 cepas isoladas de bactérias provenientes de amostras de unidades industriais distintas, segundo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (NCCLS, 2005). Para cada isolado foram avaliados 21 óleos essenciais distintos em testes de microdiluição, dos quais *Vetiveria zizanioides*; *Baccharis dracunculifolia*; *Pilocarpus microphyllus*; *Piper caldense*; *Piper cernuum* e *Piper ovatum* apresentaram os melhores resultados.

[057] De acordo com os resultados preliminares obtidos,

12/26

a eficácia (Figura 3), o perfil bacteriostático (Figura 4) e o perfil bactericida (Figura 5) dos óleos essenciais avaliados variaram de acordo com cada óleo essencial.

[058] As eficácias dos óleos essenciais perante aos isolados variaram, conforme pode ser notado na Figura 3. Dos 21 óleos essenciais testados para LAB, 9 apresentaram eficácia superior a 60%, demonstrando perfil interessante para a finalidade proposta na invenção.

[059] Dentre eles, podemos destacar os óleos essenciais de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Piper caldense*, *Piper cernuum* e *Piper ovatum*, os quais apresentaram melhores perfis antimicrobianos, com eficácias superiores a 70%, conforme mostra a Figura 3.

[060] Considerando-se os resultados obtidos de eficácia de atuação dos óleos essenciais em bactérias isoladas de processos fermentativos industriais, o efeito microbicida, além das faixas de atuação dos óleos essenciais avaliados foram selecionados os seguintes óleos: *Vetiveria zizanioides*; *Baccharis dracunculifolia* e *Pilocarpus microphyllus*, além dos óleos provenientes de plantas do gênero *Piper* (*P. caldense*; *P. cernuum* e *P. ovatum*) para avaliação do perfil químico.

- Avaliação do perfil químico:

[061] De acordo com os resultados obtidos nos ensaios para avaliação antimicrobiana dos óleos essenciais, os óleos essenciais de; *Vetiveria zizanioides*; *Baccharis dracunculifolia*; *Pilocarpus microphyllus*; *Piper caldense*; *Piper cernuum* e *Piper ovatum* foram selecionados para avaliação do perfil químico (Tabela 1).

[062] Análises de CG-EM foram realizadas para

13/26

caracterizar quimicamente os óleos que apresentaram perfil de inibição desejável e eficácias superiores a 70 %, bem como os compostos majoritários nos diferentes óleos essenciais com melhores desempenhos antimicrobianos avaliados nos ensaios de atividade inibitória e microbicida.

Tabela 1 - Perfil químico dos óleos essenciais

<i>Vetiveria zizanioides</i>			
(eficácia: 86,5 % / atividade microbicida: 41,9 %)			
Tr (min) ^(a)	IR ^(b)	Analitos	% rel ^(c)
5,35	934	alfa-pineno	8,82
6,56	980	beta-pineno	7,29
26,40	1479	gama-muuroleno	3,78
29,33	1553	beta-vetiveneno	4,87
33,59	1665	bulnesol	1,92
38,80	1812	ácido vetivênico	12,34
39,66	1838	alfa-vetivona	4,20
<i>Baccharis dracunculifolia</i>			
(eficácia: 73,0 % / atividade microbicida: 28,0 %)			
5,35	934	alfa-pineno	6,08
6,58	980	beta-pineno	13,42
6,81	989	beta-mirceno	2,90
8,19	1031	Limoneno	26,74
23,97	1419	trans-cariofileno	1,94
26,49	1481	germacreno D	5,48
27,09	1496	Biciclogermacreno	7,70
27,20	1498	alfa-muuroleno	1,06
27,98	1518	delta-cadineno	3,78
29,75	1563	trans-nerolidol	22,54
30,31	1578	Espatulenol	5,41

14/26

<i>Pilocarpus microphyllus</i>			
(eficácia: 67,6 % / atividade microbica: 28,0%)			
8,16	1030	Limoneno	1,79
22,78	1390	beta-elemeneno	10,63
24,03	1420	trans-cariofileno	17,30
24,62	1435	alfa-guaieno	1,64
25,44	1455	alfa-humuleno	2,06
26,55	1482	germacreno D	27,75
27,09	1496	biciclogermacreno	6,62
27,35	1502	alfa-bulneseno	9,51
27,56	1508	germacreno A	5,63
27,98	1518	delta-cadineno	3,24
29,55	1558	germacreno B	4,84
31,40	1606	5-epi-7-epi alfa-eudesmol	0,75
<i>Piper caldense</i>			
(eficácia: 77,8 % / atividade microbica : 21,1 %)			
5,34	933	alfa-pineno	0,42
6,56	979	beta-pineno	1,07
8,16	1030	limoneno	3,73
8,70	1045	trans-ocimeno	1,67
24,04	1420	trans-cariofileno	23,26
25,43	1455	alfa-humuleno	1,01
26,48	1480	gamma-muuroleno	1,96
26,79	1488	beta-selineno	1,04
27,17	1498	biciclogermacreno	43,00
27,54	1507	alfa-bisaboleno	1,45
27,97	1518	delta-cadineno	1,36
29,52	1558	germacreno B	0,97

15/26

29,70	1563	trans-nerolidol	10,83
30,26	1577	espatulenol	1,71
30,44	1582	óxido de cariofileno	1,72
30,92	1594	khusimona	0,73
<i>Piper cernuum</i>			
(eficácia: 100,0 % / atividade microbica: 66,7 %)			
5,35	934	alfa-pineno	6,94
6,56	979	beta-pineno	0,32
6,81	989	beta-mirceno	1,49
7,40	1008	para-cimeno	1,99
8,26	1032	beta-felandreno	21,02
8,33	1034	cis-ocimeno	1,39
8,70	1045	trans-ocimeno	0,51
10,70	1101	linalol	0,80
23,98	1419	trans-cariofileno	3,28
26,47	1480	gama-muuroleno	1,37
27,14	1497	biciclogermacreno	28,61
27,77	1513	gama-cadineno	1,49
27,99	1519	delta-cadineno	6,47
29,69	1562	trans-nerolidol	6,37
30,28	1577	Espatulenol	8,41
30,57	1585	beta-copaen-4-alfa-ol	1,41
32,73	1642	epi-alfa-cadinol	1,05
<i>Piper ovatum</i>			
(eficácia: 100,0 % / atividade microbica: 79,2 %)			
5,35	933	alfa-pineno	4,40
6,57	980	beta-pineno	12,70
6,84	990	beta-mirceno	19,77
8,70	1045	trans-ocimeno	0,88

16/26

10,18	1086	terpinoleno	2,14
22,75	1389	beta-elemeno	1,44
23,97	1419	trans-cariofileno	2,39
26,48	1481	gama-muuroleno	4,70
27,08	1495	biciclogermacreno	6,41
27,20	1498	alfa-muuroleno	1,25
27,53	1507	alfa-bulneseno	2,87
27,77	1513	gama-cadineno	1,53
27,99	1518	delta-cadineno	7,81
30,27	1577	espatulenol	10,64
32,73	1642	epi-alfa-cadinol	2,26

(a) tempo de retenção (b) índice de retenção (c) fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma (d) massa molar (e) não identificado

[063] Baseado nos resultados preliminares de eficácia, atividade seletiva (bacteriostática e bactericida) dos óleos essenciais e perfil químico, foram avaliadas combinações dos diferentes óleos essenciais frente às linhagens de bactérias provenientes de fermentação industrial.

Tabela 2 - Eficácia de combinações dos óleos essenciais (OE) avaliados com diferentes proporções

Blend OE	% dos Componentes (Óleos Essenciais/ Tween) no Blend							Eficácia
	12	15	28	34	35	38	Tween	
B2	98,5%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	75,0%
B3	0,1%	98,5%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	25,0%
B4	0,1%	0,1%	98,5%	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	75,0%
B5	0,1%	0,1%	0,1%	98,5%	0,1%	0,1%	1,0%	75,0%
B6	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	98,5%	0,1%	1,0%	100,0%
B7	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	98,5%	1,0%	100,0%
B8	0,1%	0,1%	0,1%	49,3%	49,3%	0,1%	1,0%	100,0%
B9	0,1%	0,1%	0,1%	32,5%	32,5%	32,5%	2,2%	75,0%

17/26

B11	24,5%	0,1%	0,1%	24,5%	24,5%	24,5%	1,8%	75,0%
B12	0,1%	24,5%	0,1%	24,5%	24,5%	24,5%	1,8%	100,0%
B13	0,1%	0,1%	24,5%	24,5%	24,5%	24,5%	1,8%	100,0%
B14	16,5%	16,5%	16,5%	16,5%	16,5%	16,5%	1,0%	100,0%
B16	17,6%	16,9%	21,3%	21,7%	18,9%	2,6%	1,0%	100,0%
E13	49,3%	49,3%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	33,0%
E14	49,3%	0,1%	49,3%	0,1%	0,1%	0,1%	1,0%	50,0%
E15	0,1%	48,0%	48,0%	0,1%	0,1%	0,1%	3,6%	83,0%
E22	32,5%	32,5%	32,5%	0,1%	0,1%	0,1%	2,2%	50,0%

OE = Óleo Essencial; 12 Óleo essencial de *Vetiveria zizanioides*; 15 Óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*; 28 Óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*; 34 Óleo essencial de *Piper caldense*; 35 Óleo essencial de *Piper cernuum*;

[064] A Tabela 2 apresenta a eficácia de combinações dos óleos essenciais (OE) avaliados com diferentes proporções. As proporções de cada OE variam de 0,1% a 98,5%. Os testes de microdiluição foram realizados em microplacas estéreis de 96 orifícios. Os ensaios foram conduzidos em micro-organismos provenientes de processos fermentativos de diferentes unidades industriais isolados nas safras de 2015/2016 e 2016/2017. O grupo de micro-organismos avaliados compreendem *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus fermentum*; *Lactobacillus ferruginis*; *Lactobacillus harbinensis*; *Lactobacillus amylovorus*; *Staphylococcus sp.*; *Acetobacter sp.*; *Fructobacillus sp.* Os ensaios identificados como " B " foram avaliados para os micro-organismos do grupo *Lactobacillus sp.* Os ensaios identificados como " E " foram avaliados para todos os micro-organismos, entretanto a eficácia que consta na Tabela 2 refere-se à atuação dos blends apenas em *Lactobacillus sp.*, tendo em vista que as bactérias ácido lácticas (LAB) são o principal componente da contaminação bacteriana em processos fermentativos.

18/26

Tabela 3 - Avaliação Comparativa Blend em relação à atividade dos OE isolados

Ensaio	B8	B9	B11	B12	B13	B14	B16
Cobertura	+	-	+	+	+	+	+
Concentração (mg/mL)	0	-	-	+	-	-	+
Atividade Bactericida	33%	0%	40%	25%	20%	60%	57%
Atividade Bacteriostática	67%	100%	60%	75%	80%	40%	43%
Eficácia Geral	100% +	75% -	75% -	100% +	100% +	100% +	100% +

Legenda:

- (+) Melhorou
(-) Piorou
(0) Manteve

[065] A Tabela 3 apresenta um comparativo dos blends com melhores eficácias em relação à atividade dos óleos essenciais isoladamente em bactérias do gênero *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus fermentum*; *Lactobacillus ferruginis*; *Lactobacillus harbinensis*). Esta avaliação comparativa do blend com as diferentes proporções de OE em relação aos óleos essenciais avaliados isoladamente, utilizou como parâmetros fatores importantes para atividade antimicrobiana tais como:

- Cobertura (capacidade de apresentar atividade antimicrobiana no maior número de micro-organismos avaliados);
- Concentração (concentração de uso comparativa dos óleos essenciais em mg/mL capaz de apresentar atividade antimicrobiana);
- Atividade bactericida (capacidade de atuar sobre as

19/26

bactérias avaliadas de forma a eliminá-las);

- Atividade bacteriostática (capacidade de atuar sobre as bactérias avaliadas de forma a inibir o crescimento destas);
- Eficácia Geral (eficácia de atuação do blend com diferentes proporções sobre as bactérias comparada às eficácias de atuação dos óleos essenciais isoladamente sobre as bactérias).

[066] Após a avaliação de diferentes combinações de óleos essenciais com perfil adequado, isto é, cujo potencial antimicrobiano seletivo é capaz de matar ou inibir bactérias sem afetar o crescimento das linhagens de *Saccharomyces sensu stricto* presentes na fermentação alcóolica de diferentes unidades industriais, foi realizado ensaio de fermentação em frascos agitados.

[067] Na fermentação em frascos agitados, utilizou-se linhagem de levedura (PE-2) e linhagem de bactéria láctica (*Lactobacillus sp*) (ambas isoladas, identificadas e caracterizadas) e a mistura de óleos essenciais previamente selecionados com os melhores resultados para atividade antimicrobiana.

[068] O ensaio de fermentação em frascos agitados foi montado a partir de modificações dos protocolos descritos por Thomas *et al* (2001), Narendranath *et al* (2004) e Steckelberg (2001). Neste ensaio, foram avaliadas as populações de bactérias e leveduras na presença e ausência da mistura de óleos essenciais com subsequente plaqueamento das condições testadas em placas contendo: meio seletivo para as leveduras (YEPD – *Yeast Extract Peptone Dextrose* com antibiótico) e meio seletivo para as bactérias lácticas (MRS

20/26

com actidione).

[069] Ainda, foram avaliados os seguintes parâmetros: redução populacional de bactérias na presença da mistura de óleos essenciais, com monitoramento do decréscimo na concentração de açúcares, produção de etanol e ácidos orgânicos por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Deste modo, foi avaliada a possível interferência positiva da adição da mistura de óleos essenciais na produção do bioetanol, a partir do ganho de rendimento na fermentação alcoólica, de modo que a mistura possa ser utilizada como potencial produto na substituição de antibióticos para o controle de contaminação por bactérias, principalmente LAB, na indústria de bioetanol.

Descrição do ensaio de fermentação:

[070] Para avaliação da mistura de óleos essenciais com finalidade de controlar a contaminação bacteriana, em especial bactérias ácido lácticas (LAB), foi realizado ensaio de fermentação utilizando meio de cultivo sintético, de acordo com protocolo de Steckleberg (2001) modificado.

[071] Ao meio de fermentação, foi acrescido 10% em volume da mistura de óleos essenciais em uma concentração de 20 mg/mL, de modo que se obtivesse 2 mg/mL de concentração final no meio de cultivo nos tratamentos com óleos essenciais. Nos demais tratamentos (controles), foi adicionado mesmo volume de salina estéril, a fim de evitar distorções de diluição nos resultados. Para avaliar o efeito da mistura de óleos essenciais em bactérias e leveduras, foram realizados os seguintes tratamentos:

- Tratamento B - Meio de fermentação inoculado apenas com bactéria (4 mL de inóculo inicial ajustado para 10^7 -

21/26

simulação de condição drástica de contaminação) + 8 mL de solução salina 0,9% estéril.

- Tratamento L - Meio de fermentação (40 mL) inoculado apenas com levedura (4 mL de inóculo inicial ajustado para 10^6) + 8 mL de solução salina 0,9% estéril.

- Tratamento B+L - Meio de fermentação inoculado com bactéria + levedura, sendo 4 mL de inóculo de bactéria inicial ajustado para 10^7 - simulação de condição drástica de contaminação (nível inaceitável de acordo com unidades industriais) + 4mL de inóculo de levedura inicial ajustado para 10^6) + 4mL de solução salina 0,9% estéril.

- Tratamento B+OE - Meio de fermentação acrescido de mistura de óleo essencial (BOE) inoculado com bactéria, sendo 4 mL de inóculo de bactéria inicial ajustado para 10^7 + 4mL de mistura de óleos essenciais + 4 mL de solução salina 0,9% estéril.

- Tratamento L+OE - Meio de fermentação acrescido de mistura de óleo essencial (BOE) inoculado com levedura, sendo 4 mL de inóculo de levedura inicial ajustado para 10^6 + 4 mL de mistura de óleos essenciais + 4 mL de solução salina 0,9% estéril.

- Tratamento B+L+OE - Meio de fermentação acrescido de 4 mL de mistura de óleo essencial (BOE) inoculado com bactéria e levedura, sendo 4 mL de inóculo de bactéria inicial ajustado para 10^7 + 4 mL de inóculo de levedura inicial ajustado para 10^6 .

[072] Para os tratamentos com leveduras, foi utilizada uma linhagem de levedura comercial Pedra-2 (PE-2). Para os tratamentos com bactéria, foi utilizado um isolado bacteriano proveniente de unidade industrial, isolado e

22/26

identificado como *Lactobacillus paracasei*.

[073] Os tratamentos foram feitos em duplicata em frascos de erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 40 mL de meio de fermentação em cada um, com adição dos inóculos a 10% em volume.

[074] Foram retiradas alíquotas de 1 mL de todos os experimentos para plaqueamento. Este volume foi submetido a diluição seriada em tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, a fim de se obter diluições de 10^1 até 10^{12} . Os plaqueamentos foram realizados em duplicata em placas contendo meio YEPD ágar com antibiótico monensina para recuperação exclusiva de leveduras e placas contendo meio MRS ágar com Actidione para recuperação exclusiva de bactérias. Todas as diluições de todos os experimentos foram plaqueadas no tempo zero (inicial 0, logo após adição do inóculo) e após 24h.

[075] Para evitar o efeito de diluição, uma solução de salina 0,9% estéril foi adicionada aos frascos de menor volume, a fim de completar o volume e para que os frascos apresentassem volume final de 52mL.

[076] O ensaio de fermentação foi realizado a 32°C por 24 horas a 150 rpm em agitador tipo shaker.

Composição da mistura de óleos essenciais:

[077] Para a composição da mistura de óleos essenciais avaliada no ensaio de fermentação com frascos agitados, foram utilizados os componentes de acordo com a Tabela 4.

23/26

Tabela 4 - Composição da mistura de óleos essenciais

Óleo Essencial (OE)	% relativa de OE na mistura	Concentração de cada OE (mg/mL)
<i>Vetiveria zizanioides</i>	17,6	3,51
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	16,9	3,38
<i>Pilocarpus microfilus</i>	22,3	4,45
<i>Piper caldense</i>	21,7	4,35
<i>Piper cernuum</i>	18,9	3,78
<i>Piper ovatum</i>	2,6	0,53
Solução de Tween 80 a 1%	1,5	
Água		qsp 20 mg/mL

[078] Para a composição da mistura de óleos essenciais (BOE), foram pesadas as quantidades dos diferentes óleos essenciais acima descritos (Tabela 4) em um mesmo frasco estéril, ao qual foram adicionados volumes de solução estéril de Tween 80 a 1% e água destilada estéril.

[079] A composição da mistura de óleos essenciais foi definida considerando: ausência de atividade em leveduras e eficácia geral dos óleos essenciais (OE) em diversos isolados de bactérias, incluindo LAB, avaliados individualmente e atividade bactericida em diversos isolados de LAB avaliados anteriormente.

[080] A contagem de micro-organismos, realizada no experimento de avaliação da mistura de óleos essenciais, pode ser observada na Tabela 5 abaixo.

24/26

TABELA 5 - Resultado da contagem de leveduras em meio de cultivo YEPD ágar para recuperação de leveduras e da contagem de bactérias em meio de cultivo MRS ágar para recuperação de bactérias

Experimento	Tratamento	Contagem			
		Leveduras		Bactérias	
		YEPD 0	YEPD 24	MRS 0	MRS 24
E1	B			$2,9 \times 10^8$	10^{12}
E2	B			10^8	10^{12}
E3	L	$2,5 \times 10^6$	10^{12}		
E4	L	$2,1 \times 10^6$	10^{12}		
E5	B + L	$3,0 \times 10^6$	10^{12}	10^5	$1,0 \times 10^{10}$
E6	B + L	$2,9 \times 10^6$	10^{12}	10^6	$2,0 \times 10^{10}$
E7	B + OE			$1,0 \times 10^8$	0
E8	B + OE			$3,0 \times 10^8$	0
E9	L + OE	8×10^6	$7,0 \times 10^{12}$		
E10	L + OE	$6,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{12}$		
E11	B + L + OE	$5,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^{12}$	$2,0 \times 10^8$	0
E12	B + L + OE	$6,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^8$	0

[081] De acordo com os resultados de contagem obtidos nos plaqueamentos (Tabela 5 e Figuras 6 e 7), é possível notar que a adição da mistura de óleos essenciais (OE) não afetou o crescimento da levedura, visto que os tratamentos (L) que possuíam apenas leveduras obtiveram resultados de mesma ordem de grandeza (10^{12}) que os tratamentos que possuíam leveduras e óleos essenciais (L+OE) e (B+L+OE), demonstrando que não houve redução de ciclos logarítmicos de crescimento.

[082] Concomitantemente, é possível notar que a adição da mistura de óleos essenciais (OE) afetou consideravelmente

25/26

o crescimento bacteriano. Nos tratamentos (B), que possuíam apenas bactérias, foram obtidos resultados com acréscimo de 4 ciclos logarítmicos (10^8 no tempo zero e 10^{12} após 24h de crescimento), enquanto que nos tratamentos com adição da mistura de óleos essenciais, foi possível uma redução de 10^8 para (B+OE) assim como de 10^8 para (B+L+OE), sendo uma redução de 8 ciclos logarítmicos de crescimento, sem detecção de bactérias ao final da 24h de fermentação em nenhuma das diluições plaqueadas.

Rendimento em etanol:

[083] A determinação do rendimento em etanol para cada um dos tratamentos foi avaliada através do parâmetro $Y_{p/s}$ (produção específica de etanol), que expressa a massa de etanol produzida em relação à massa de açúcares redutores totais (ARTs) consumido.

[084] Para tanto, foram determinados: ART de entrada (no meio de cultivo sem inóculo), ART consumido e rendimento em etanol de cada um dos tratamentos. Para esta determinação, 10 mL do vinho fermentado (conteúdo de todos os frascos após 24h de fermentação) foi centrifugado a 4000 rpm por 6 minutos.

[085] O sobrenadante foi filtrado em unidade filtrante 0,22 μ e avaliado por HPLC para detecção de etanol e açúcares.

[086] A Figura 8 mostra a representação gráfica do rendimento em etanol relativo para todos os tratamentos testados.

[087] Embora os dados de contagem da adição de bactéria às leveduras não tenham apresentado diferenças significativas para a contagem das leveduras, os dados

26/26

referentes ao rendimento em etanol demonstram que a presença da bactéria (tratamento B+L) compromete o rendimento em etanol, ou seja, afeta a levedura no processo de fermentação em aproximadamente 7%, o que representaria uma enorme perda para o processo.

[088] Além disso, os dados do ensaio de fermentação no tratamento com adição de mistura de óleos essenciais, demonstram um aumento no rendimento em etanol quando comparado ao tratamento B+L (Bactéria + Levedura), que simula a condição de um alto índice contaminação em dornas de fermentação.

[089] Assim, a adição da mistura de óleos essenciais melhora o rendimento em etanol da levedura em aproximadamente 4% quando comparada ao tratamento B+L, tendo uma interferência positiva para o processo e que, possivelmente, poderá ser utilizada como potencial produto na substituição de antibióticos para o controle de contaminação bacteriana, na indústria de bioetanol.

[090] Desta forma, a composição ora proposta se apresenta como um potencial biotecnológico para substituir os antibióticos utilizados no controle da contaminação da fermentação do bioetanol.

1/1

REIVINDICAÇÕES

1. Composições **caracterizadas** pelo fato de compreender óleos essenciais, em que os referidos óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Pilocarpus microphyllus*, *Piper caldense*, *Piper ovatum* e *Piper cernuum*, preferencialmente:

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 18%, de óleo essencial de *Vetiveria zizanioides*;

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 18%, de óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*;

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 19%, de óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*;

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 22%, de óleo essencial de *Piper caldense*;

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 3%, de óleo essencial de *Piper ovatum*;

- de 0,1 a 99%, preferencialmente 20%, de óleo essencial de *Piper cernuum*; e

- de 1 a 10%, preferencialmente 1%, de Tween 80;

em que a composição apresenta concentração final de 2 mg/mL.

2. Uso das composições conforme definidas na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser no controle da contaminação bacteriana em processos fermentativos, preferencialmente, fermentação alcoólica em usinas sucroalcooleiras produtoras de bioetanol.

1/5

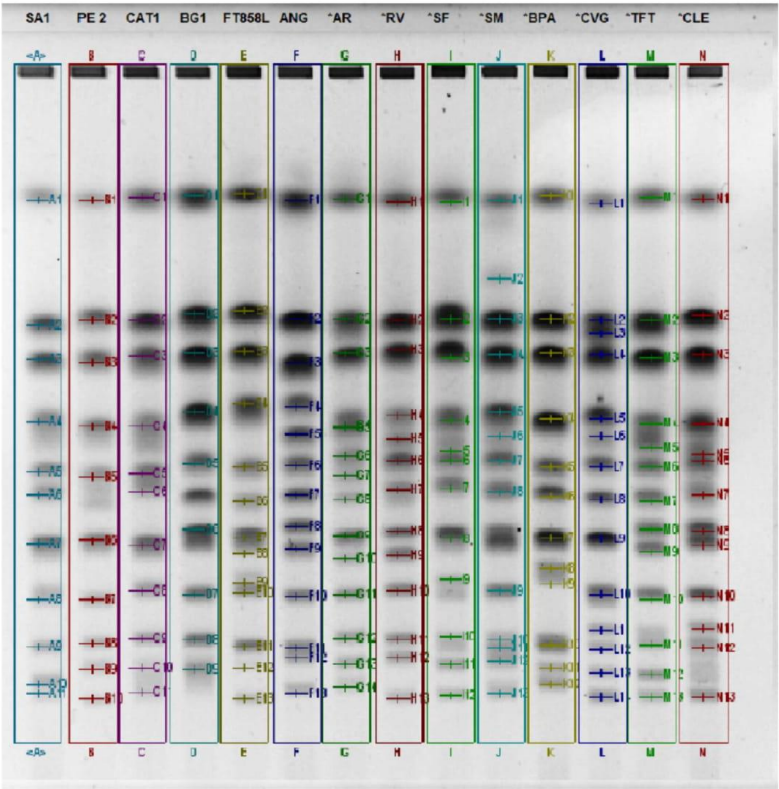


FIGURA 1

2/5

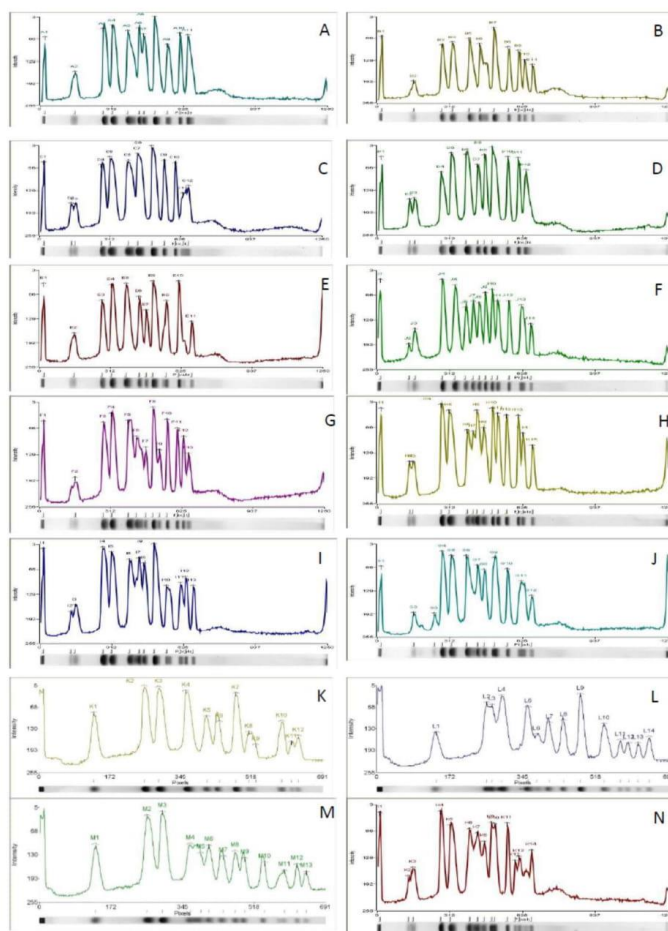


FIGURA 2

3/5

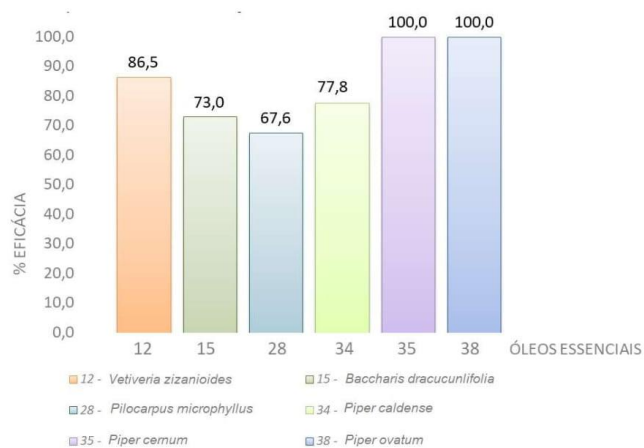


FIGURA 3

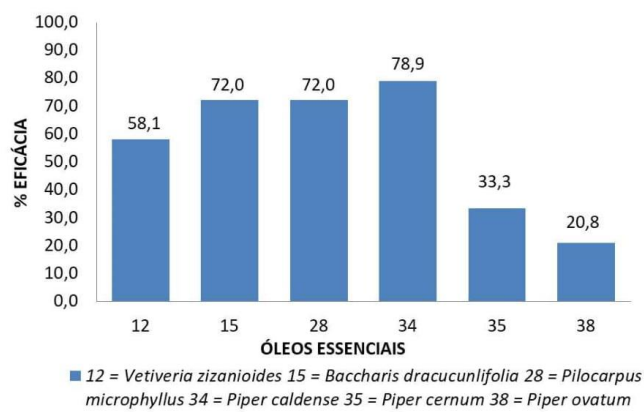


FIGURA 4

4 / 5

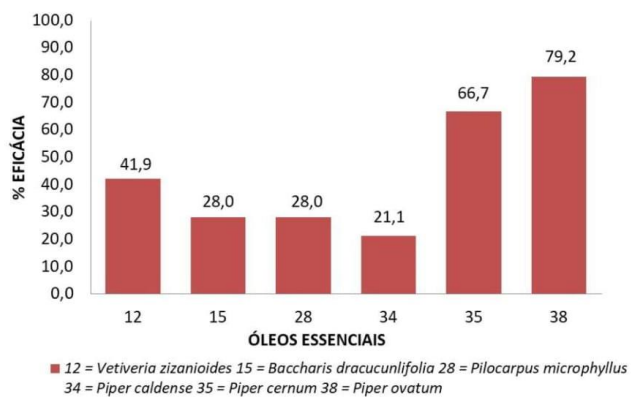
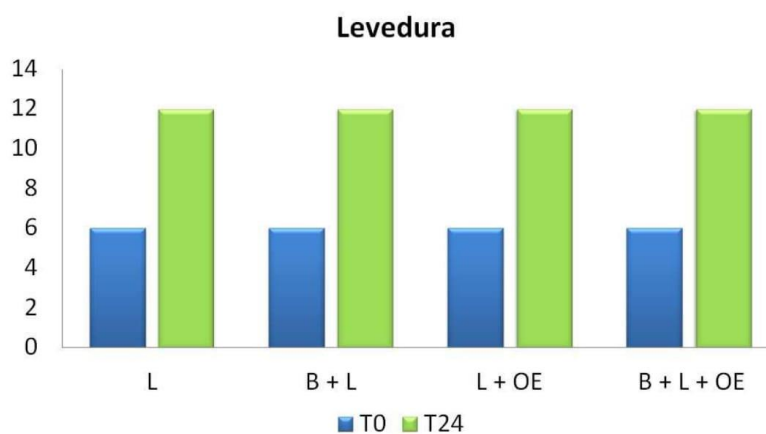


FIGURA 5

**Legenda:**

L = Levedura

B + L = Bactéria + Levedura

L + OE = Levedura + Blend de Óleos Essenciais

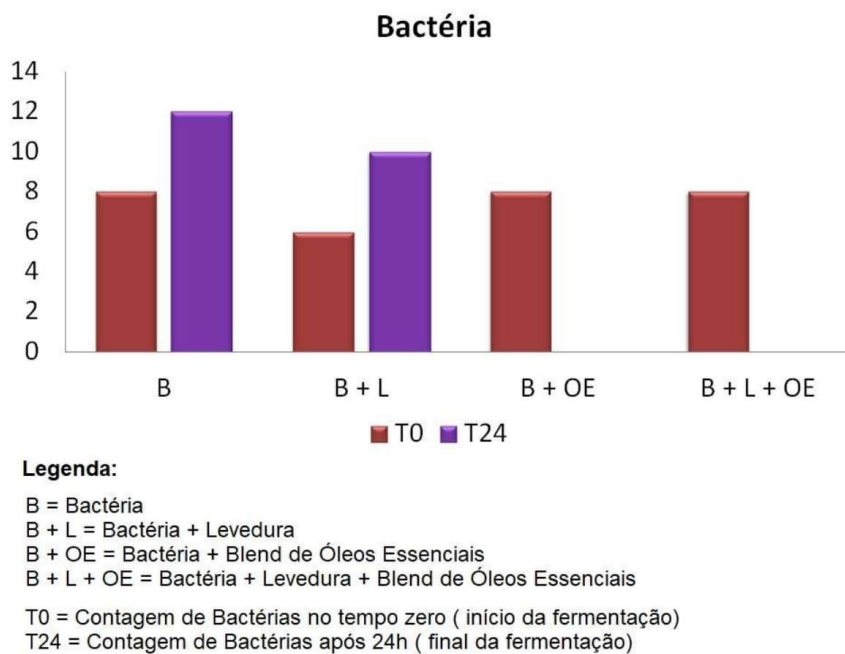
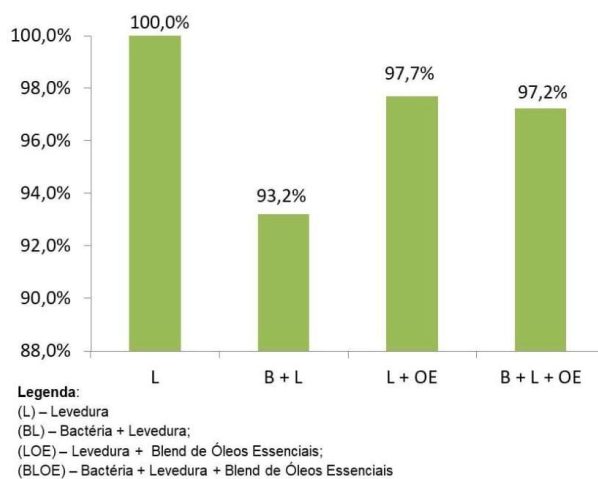
B + L + OE = Bactéria + Levedura + Blend de Óleos Essenciais

T0 = Contagem de Leveduras no tempo zero (início da fermentação)

T24 = Contagem de Leveduras após 24h (final da fermentação)

FIGURA 6

5/5

**FIGURA 7****FIGURA 8**

1/1

Resumo**COMPOSIÇÕES E SEU USO**

A presente invenção descreve composições compreendendo óleos essenciais obtidos preferencialmente a partir de plantas da flora brasileira, em que os óleos essenciais são selecionados do grupo que consiste de *Vetiveria zizanioides*, *Baccharis dracunculifolia*, *Pilocarpus microphyllus*, *Piper caldense*, *Piper ovatum* e *Piper cernuum*. Estas composições são úteis no controle da contaminação bacteriana em processos fermentativos, em especial processos de fermentação alcoólica para obtenção de bioetanol.

Anexo II

DECLARAÇÃO POSITIVA DE ACESSO A PATRIMÔNIO GENÉTICO NACIONAL
E/OU CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Eu, **Patricia Regina Kitaka**, nacionalidade **brasileira**, estado civil **solteira em união estável**, bióloga, portadora do RG nº 29.340.001-5, e inscrito no CPF nº 277.357.548-25, declaro para os devidos fins, que houve acesso ao Patrimônio Genético Nacional e/ou Conhecimento Tradicional Associado na pesquisa e desenvolvimento tecnológico que deu origem à Comunicação de Invenção de código interno **1251_BLEND**, cujo número do cadastro (Sisgen) é o **A8EAA6E**.

Campinas, 14 de Agosto de 2018.



Patricia Regina Kitaka



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A8EAA6E

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A8EAA6E
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Impossibilidade de identificação

Aloysia triphylla

Varronia curassavica

Lippia sidoides

Piper abutiloides

Piper aduncum

Achyrocline satureioides

Calea pinatifida

Cyperus articulatus

Elionurus muticus

Eugenia uniflora

Lippia alba

Ocimum selloi

Pilocarpus micrphyllus
Pilocarpus pennatifolius
Schinus terebinthifolius
Piper caldense
Piper cernuum
Piper marginatum
Piper mollicomum
Piper ovatum
Piper regnellii
Pothomorphe umbellata
Baccharis dracunculifolia
Impossibilidade de identificação

Título da Atividade: **Bioativos Naturais: Potencial de óleos essenciais como alternativa no controle de contaminação bacteriana na indústria de bioetanol**

Equipe

PATRICIA REGINA KITAKA	UNICAMP
Glyn Mara Figueira	UNICAMP
Maria da Graça Stupiello Andrietta	UNICAMP
Marta Cristina Teixeira Duarte	UNICAMP
Valéria Maia Merzel	UNICAMP

Data do Cadastro: **13/08/2018 20:53:11**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:16** de **15/08/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Petição 870180071984, de 16/08/2018, pág. 41/44

[bb.com.br] - Boleto gerado pelo sistema MPAG. 04/12/2017 11:27:16

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.

Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.

BANCO DO BRASIL		001-9	00190.00009 02940.916170 11182.914173 8 73920000007000		Recibo do Pagador
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço					
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS UNICAMP CPF/CNPJ: 46068425000133					
CIDADE UNIVERSITARIA ZEFERINO VAZ, CAMPINAS -SP CEP:13084971					
Sacador/Avalista					
Nosso Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(R) Valor Pago	
29409161711182914	29409161711182914	02/01/2018	70,00		
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço					
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088.0001-37					
PRACA MAUA 7 - 14 ANDAR - SALA 1415 , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20081240					
Agência/Código do Beneficiário					
2234-9 / 333028-1					
Autenticação Mecânica					

06/12/2017 - BANCO DO BRASIL - 15:47:42
420312237 0098

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

BANCO DO BRASIL S.A.
00190000090294091617011182914173873320000007000
NOSSO NUMERO 29409161711182914
CONVENIO 02940916
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIED
AG/COD. BENEFICIARIO 2234/00333028
DATA DE VENCIMENTO 02/01/2018
DATA DO PAGAMENTO 06/12/2017
VALOR DO DOCUMENTO 70,00
VALOR COBRADO 70,00
NR. AUTENTICACAO 8.786,392,175,38A,13F
LEIA NO VERSO COMO CONSERVAR ESTE DOCUMENTO,
ENTRE OUTRAS INFORMACOES.

Petição 870180071984, de 16/08/2018, pág. 42/44



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PROCURAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, autarquia em regime especial, inscrita no CNPJ/MF nº 46.068.425/0001-33, com sede na Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, Campinas, Estado de São Paulo, CEP: 13.083-970, neste ato representada por seu **Magnífico Reitor Professor Doutor Marcelo Knobel**, constitui e nomeia **PATRÍCIA FRANCO LEAL GESTIC**, brasileira, casada, engenheira de alimentos, portadora do RG nº 32.372.385-8, inscrita no CPF nº 219.274.108-19, matrícula 30.418-9; **CIRO DE LA CERDA**, argentino, solteiro, engenheiro de produção mecânica, portador do RG nº W255248-9, inscrito no CPF nº 045.845.188-66, matrícula 17.857-8; e **LÍVIA ALDRED IASBIK FERRAZ**, brasileira, casada, bacharel em direito, matrícula 304975; todos lotados na Agência de Inovação da Unicamp, com endereço na Av. Roxo Moreira, 1831, Caixa Postal 6131, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Barão Geraldo, em Campinas – SP; a quem confere poderes para, nos termos dos atos normativos, das portaria e das resoluções baixadas pelo INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL, requerer pedidos de proteção de direitos de propriedade industrial desenvolvidos pela Unicamp, junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL** através dos sistema e-INPI, com poderes para praticar todos os atos que se fizerem necessários aos pedidos e manutenção da proteção de direitos de propriedade intelectual em benefício da outorgante junto ao INPI, sendo vedado o substabelecimento dos poderes ora concedidos. Esta procuração terá vigência até o dia 31 de maio de 2021.

Campinas, 14 de março de 2018

CARTILHA
LEITURAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Professor Doutor Marcelo Knobel

Reitor - UNICAMP

CPC	CARTÓRIO DO DISTRITO DE BARÃO GERALDO	José Maria de Almeida César Oficial - Tabelião	Rua Nereu Miguel de Camargo, Pericado, Barão Geraldo - Campinas / SP Fone: (19) 3749-7333 cartorio@guoi.com.br - www.cartorio.org.br
RECONHECO por semelhança 1 firma(s) de MARCELO KNOBEL Campinas, 22 De março De 2018. EM TEST. _____ DA VERDADE.			
MARCELO VINÍCIOS VIRGÍLIO DE BRITO - ESCRIVENTE Custas: R\$ 6,10. Carimbo: 2401771 Selo(s): 769775-AA. SEM VALOR ECONOMICO			
*VÁLIDO SOMENTE COM O SELLO DE AUTENTICIDADE SEM EMENDAS E/OU F			



7. Discussão Geral

Os óleos essenciais já foram amplamente descritos na literatura quanto às suas atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antioxidante, anti- parasitária, anti-inflamatória, anti-tumoral e antidiabética (BURT, 2004; RAUTE e KARUPPAYIL, 2014; GUENTHER,1948).

Embora estes compostos estejam presentes em diversos segmentos industriais, sua presença mais notável em termos de consumo, deve ser destacada para aplicações na indústria alimentícia, bem como na indústria farmacêutica e de perfumaria e cosméticos (BURT, 2004; HUSSAIN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013).

De acordo com Barbieri e Borsotto (2018) o mercado de óleos essenciais movimentou mais de US\$ 6 bilhões em 2017 no mundo todo com projeção de atingir mais de US\$ 10 bilhões em 2020 e expectativa de crescimento atingindo mais de US\$ 30 bilhões até 2027. Segundo as autoras, esta demanda ascendente é consequência de uma tendência crescente de procura por produtos naturais e orgânicos.

Essa tendência de busca por soluções sustentáveis com uso de produtos naturais inclui também a diversificação das aplicações dos óleos essenciais para além das principais áreas no meio industrial, envolvendo a utilização no âmbito agrícola e no ramo da pecuária, especialmente em aplicações veterinárias.

No entanto, não há relatos da avaliação destes compostos para utilização em processos industriais para produção de bioetanol.

Assim, a abordagem inédita deste trabalho, traz a avaliação do potencial de diferentes óleos essenciais extraídos de plantas nativas da flora brasileira, bem como de plantas exóticas, quanto à sua atividade antimicrobiana seletiva frente aos principais micro-organismos contaminantes presentes no processo de fermentação para produção do bioetanol, expandindo ainda mais as possíveis aplicações dos óleos essenciais.

A primeira parte deste trabalho consistiu na avaliação do panorama dos processos fermentativos das unidades industriais brasileiras produtoras de bioetanol quando à utilização de antimicrobianos (**Capítulo1**) e à composição microbiológica dos processos (**Capítulo 3** e **Capítulo 4**).

A primeira parte deste trabalho apresentada no **Capítulo 1** refere-se a um levantamento das estratégias de controle de contaminação utilizadas por unidades brasileiras produtoras de etanol combustível a fim de ajudar a construir um panorama da realidade que permeia o processo fermentativo nas unidades industriais no Brasil quanto ao uso de antibióticos, que pode ter reflexos tanto para o ambiente bem como para a saúde humana.

Embora o uso de antibióticos venha sendo reportado na literatura e por órgãos regulatórios como importante componente na disseminação de resistência a antibióticos, os resultados obtidos nos trazem um panorama de utilização frequente e intensa pela indústria produtora de bioetanol, mostrando que para todas as unidades industriais há um intenso uso destas substâncias no controle de contaminantes bacterianos.

Diversos autores têm apontado a resistência a antibióticos como um problema global que vem se tornando comum (WHO, 2001), dentre eles, Jaimee e Halami (2016) e Allen et al. (2010) salientam o surgimento de reservatórios ambientais e dispersão descontrolada de bactérias patogênicas através de diversas vias como um fator preponderante que pode afetar a efetividade do uso destas substâncias para terapia humana.

Sabe-se que os antibióticos têm sido usados para fins veterinários e na alimentação animal como promotor de crescimento (BUTAYE et al., 2003; MARSHALL e LEVY, 2011) em todo o mundo, entretanto estudos mais recentes têm demonstrado que o uso inadequado dos antibióticos neste contexto leva à seleção de LAB tolerantes (GORBACH, 2001; DAVIES e DAVIES, 2010; THUMU e HALAMI, 2012).

Segundo Witte (2000), o uso irrestrito de antibióticos facilita o desenvolvimento e a disseminação de resistências na microbiota de animais de fazenda que eventualmente entram na população humana através da cadeia alimentar após o consumo de produtos alimentícios fermentados. Assim, LAB podem transmitir genes de resistência a antibióticos via transferência horizontal de genes a espécies de bactérias patogênicas aos humanos (SCHJORRING e KROGFELT 2010; DEVIRGILIS et al. 2011; NAWAZ et al. 2011).

Além disso, a ubiquidade das LAB na natureza, associada ao fato de que bactérias Gram-positivas, especialmente do gênero *Lactobacillus*, vem sendo consideradas reservatórios de genes de resistência a antibióticos

(MURPHREE et al., 2014; SAAED et al., 2014), reforçam a preocupação em relação à transferência de genes de resistência para micro-organismos patogênicos. Assim, o uso indiscriminado de antibióticos no contexto industrial na produção de bioetanol, onde a presença de LAB é preponderante, reforça a recomendação para o emprego prudente de antibióticos e a redução de seu uso excessivo fora da prática médica e veterinária. Esse tema vem sendo pauta das discussões trazidas por diversos autores (DEC et al., 2017; MURPHREE et al., 2014; SAAED et al., 2014).

No entanto, confrontando os dados encontrados em relação ao uso de antimicrobianos nas unidades industriais e as informações que a literatura traz a respeito da seleção de micro-organismos resistentes a antibióticos, o cenário brasileiro de uso de antimicrobianos nos processos fermentativos apresenta um panorama preocupante, sinalizando a necessidade iminente de novas soluções tecnológicas capazes de auxiliar na premissa de redução do uso excessivo e indiscriminado de antibióticos em contextos para além de sua aplicação na saúde, seja ela humana ou animal. Neste sentido, o presente trabalho traz, na segunda parte, a avaliação de óleos essenciais para o potencial desenvolvimento de soluções tecnológicas utilizando produtos naturais para serem aplicados no controle de contaminação bacteriana em processos de fermentação.

A estratégia empregada para verificar tal potencial consistiu primeiramente no isolamento, diferenciação e identificação de leveduras e bactérias contaminantes, descritos nos **Capítulos 3 e 4**, a fim de delinear um panorama geral da realidade encontrada nos processos fermentativos de produção de etanol combustível nas usinas brasileiras e, portanto, a análise da composição microbiana dos processos fermentativos está dividida em duas partes: leveduras e bactérias.

A análise de composição de leveduras nos traz as diferentes linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* presentes nos processos fermentativos para a produção de bioetanol.

No estudo de 2006, apresentado por Basso et al. (2008), 190 das 329 destilarias brasileiras avaliadas optaram pelo uso de linhagens selecionadas comerciais.

De maneira similar, os resultados aqui apresentados em relação à

avaliação de uso de linhagens de leveduras como *starters*, em 125 processos fermentativos, nos últimos 10 anos, demonstram a utilização preferencial de linhagens de leveduras selecionadas comerciais, com destaque para as linhagens PE-2 e CAT-1, reforçando a importância dessas para as unidades industriais.

Entretanto, o uso de novas linhagens autóctones nativas, cujo isolamento foi realizado a partir do próprio processo industrial com estudos e posterior caracterização, vem aumentando gradativamente nos últimos anos. Dentre as linhagens selecionadas comerciais, de modo contrário à constância de uso das linhagens CAT1 e PE2 pelas unidades industriais, os resultados mostram que o uso das linhagens BG1 e SA1 vem sofrendo um decréscimo no número de unidades que as utilizam nos últimos cinco anos.

Carvalho-Netto (2012) atribui a modificação da estratégia de seleção de inóculos iniciais para a fermentação à perda gradual do desempenho de algumas linhagens selecionadas ao longo dos anos, principalmente devido às alterações operacionais do processo, como a redução da queima da cana-de-açúcar e o aumento do teor alcoólico da fermentação. Soma-se a isso o aparecimento de linhagens selvagens mais robustas, que permite a introdução de linhagens nativas isoladas das próprias dornas, selecionadas por possuírem características de interesse e boa permanência no processo (Basso et al., 2008).

Já em termos de panorama dos contaminantes bacterianos nos processos fermentativos de produção de bioetanol, a análise filogenética demonstrou que os micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp. mostraram-se predominantes (91,4%) e, dentro deste grupo, a espécie de *Lactobacillus paracasei* foi prevalente (62,9%). Além disso, micro-organismos pertencentes aos grupos *Acetobacter* (2,9%), *Staphylococcus* (2,9%) e *Leuconostocaceae* (2,9%) foram identificados.

Muitos trabalhos evidenciam diferentes gêneros como contaminantes responsáveis pela infecção dos processos de fermentação para produção de bioetanol. Dentre eles, os gêneros *Bacillus* sp.; *Lactobacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Clostridium* sp. e *Leuconostoc* sp. são frequentemente citados e, embora não haja concordância em uma única espécie como principal contaminante, o gênero *Lactobacillus* sp. destaca-se, aparecendo como mais frequentemente apontado nos estudos a respeito de

contaminantes bacterianos de processos produtivos de bioetanol (CAETANO; MADALENO, 2011).

A exemplo disto, temos os trabalhos de Lucena et al. (2010) e Caetano e Madaleno (2011), que indicam que maioria das bactérias isoladas de processos fermentativos (98,52%) são Gram-positivas, onde o gênero *Lactobacillus* é predominante (59,75%), o que corrobora os dados aqui encontrados.

A segunda parte deste trabalho encadeou o processo de avaliação de óleos essenciais para o potencial desenvolvimento de soluções tecnológicas a serem aplicadas no controle de contaminação bacteriana em processos de fermentação.

Os óleos essenciais estudados foram extraídos tanto de espécies exóticas (42,5%) quanto de plantas da flora nativa brasileira (57,5%), conforme descrito no **Capítulo 2**. No grupo das espécies exóticas, foram incluídos representantes de 8 famílias: Amaranthaceae; Asteraceae; Lamiaceae; Myrtaceae; Poaceae; Rutaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae.

Já dentre o grupo das espécies nativas, os óleos essenciais foram extraídos de plantas pertencentes a 10 famílias: Anacardiaceae; Asteraceae; Boraginaceae; Cyperaceae; Lamiaceae; Myrtaceae; Piperaceae; Poaceae, Rutaceae e Verbenaceae.

Nos ensaios com leveduras, foi possível notar que todos os óleos essenciais provenientes de plantas nativas pertencentes à família Verbenaceae apresentaram atividade para todas as linhagens de leveduras, independente do grupo de leveduras. Além disso, plantas nativas pertencentes às famílias Cyperaceae, Poaceae e Myrtaceae apresentaram alto nível inibitório para as linhagens de leveduras, podendo ser apontados como muito prejudiciais para as linhagens de leveduras mesmo em baixas concentrações. Por outro lado, óleos essenciais extraídos de plantas nativas da família das Rutaceae foram inertes para todas as linhagens avaliadas.

Os resultados obtidos na análise da atividade dos óleos essenciais sobre micro-organismos oriundos de processos fermentativos foram apresentados e discutidos nos **Capítulos 3 e 4** e nos levaram a selecionar apenas os óleos com capacidade inibitória em relação às bactérias, além de um padrão de eficácia acima de 70% para bactérias contaminantes (LAB).

Assim, dentre todas essas famílias e considerando resultados de

inatividade em leveduras, eficácia dos óleos essenciais sobre os contaminantes bacterianos e seletividade para a finalidade a qual está sendo aqui proposta, a família Piperaceae merece destaque, em especial o gênero *Piper* sp.

A família Piperaceae inclui aproximadamente 2500 espécies classificadas em cinco gêneros distribuídos em regiões tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2001; GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006), podendo ser encontrada na forma de ervas, videiras, arbustos, e, mais raramente, árvores (Sousa et al., 2008).

No Brasil, a família é representada por quatro gêneros, o mais comumente encontrado sendo o gênero *Piper*, que contém quase 700 espécies, das quais aproximadamente 170 são nativas do Brasil. Diversas espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina popular em diversas partes do mundo e reconhecidas por suas propriedades biológicas e farmacológicas (CYSNE et al., 2005).

Devido ao fato de que muitas espécies deste grupo são aromáticas, muitos estudos a respeito dos OE de espécies de *Piper* tem revelado uma ampla diversidade de compostos, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanóides, aldeídos, cetonas e álcoois de cadeia longa (VILA et al., 2001 e RAWAT et al., 1989).

No estudo realizado por Constantin et al (2001) em que são avaliados óleos essenciais de *Piper cernuum* e *Piper regnelli* quanto à atividade antimicrobiana e composição química, os seguintes constituintes foram descritos para *Piper cernuum*: alfa e beta pineno; biciclogermacreno, beta cariofileno espatulenol e germacreno. Já para o OE de *P. regnelli* foram encontrados linalol, mirceno, biclogermacreno e beta cariofileno.

O perfil químico do OE de *Piper cernuum* descrito neste trabalho traz, além dos constituintes descritos por Constantin et al (2001), beta-mirceno, para-cimeno; beta-felandreno, cis-ocimeno; linalol, trans-cariofileno, gama-cadineno e trans-nerolidol. O perfil químico de *Piper regnelli* não foi determinado, visto que a eficácia deste OE nos contaminantes bacterianos foi muito baixa (5%) e, para os ensaios de composição química deste trabalho, foram selecionados apenas os OE com eficácia acima de 70%.

As análises antimicrobianas realizadas por Constantin et al. (2001), assim como muitos estudos envolvendo OE, utilizam micro-organismos

modelo, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, que são, respectivamente, modelos de: bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e fungos de interesse médico. Assim, os resultados da avaliação antimicrobiana não são comparáveis com os dados aqui avaliados, tendo em vista que os micro-organismos são distintos e os ensaios realizados por Constantin et al. (2001) utilizaram método de difusão em ágar.

As análises da atividade dos OE em contaminantes bacterianos dos processos fermentativos demonstram o alto potencial de aplicação dos OE para este contexto, visto que 9 dos 21 óleos essenciais avaliados (42,9%) apresentaram eficácia superior a 60%.

Embora as faixas de atuação encontradas para os OE isoladamente (0,008mg/mL a 2,0mg/mL) não estejam entre as concentrações de uso ideais, quando comparadas às concentrações de uso de outros antimicrobianos como os antibióticos, que variam de 3,0 a 150 ppm, o uso de estratégias de otimização de experimentos para avaliação de combinações ou fracionamento podem ser realizados futuramente com intuito de otimização das concentrações de uso.

A partir das análises da composição química descritas ao longo do **Capítulo 5**, foi possível avaliar combinações de diferentes OE (*blends*), cuja performance distinguiram-se da aplicação dos óleos essenciais isoladamente.

A avaliação da aplicação dos óleos essenciais de modo combinado, ou seja, sob a forma de *blends*, favorece uma complexidade maior na composição química em relação aos componentes ativos antimicrobianos, podendo conferir características interessantes. Dentre elas, pode-se citar uma maior capacidade bactericida, a redução das concentrações de uso e a atuação sobre um espectro mais amplo de contaminantes em casos de combinações com atividade sinérgica (HYLDGAARD et al., 2012).

A avaliação dos *blends*, foi adaptada baseando-se no critério utilizado para a interpretação do efeito resultante da combinação de antimicrobianos, ou seja, no cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (FIC_{index}), que considera a razão entre os resultados de MIC da combinação e dos componentes da combinação de modo isolado. Quando o valor calculado é menor ou igual a 0,5 é considerado sinérgico, e maior que 4,0 é considerado antagônico. (PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010).

Já na avaliação comparativa entre os *blends*, os critérios foram ampliados, incluindo a cobertura das avaliações em diferentes contaminantes (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus harbinensi*, *Lactobacillus ferruginis*, *Lactobacillus amlovorus*, *Acetbacter* sp. Leuconostocaceae e *Staphylococcus* sp.), atividade bactericida e eficácia geral. Esta avaliação demonstrou que algumas combinações apresentaram efeito antagônico enquanto outras indicaram efeitos sinérgicos com resultados promissores.

Dentre as que apresentaram resultados promissores, o *blend* B16 apresentou vários requisitos considerados interessantes para uma formulação adequada ao uso, tais como: eficácia, cobertura e ação microbicida em diferentes contaminantes. Assim, o referido *blend* foi selecionado para posterior validação em ensaio de fermentação, cujos resultados resultaram no depósito da patente de invenção INPI BR 10 2018 0168045, descrita no **Capítulo 6**.

Os ensaios de fermentação foram realizados como prova de conceito, em escala laboratorial, para avaliar o efeito do *blend* de OE nos micro-organismos que compõem o processo fermentativo e determinar sua viabilidade. Para tanto, foram utilizados como micro-organismos: a linhagem de levedura PE2, que conforme discutido no **Capítulo 3** é notadamente a mais utilizada pelas unidades industriais, e *Lactobacillus paracasei*, o contaminante prevalente de acordo com a identificação dos contaminantes descrita no **Capítulo 4**.

Os ensaios de fermentação demonstram que a adição do *blend* de OE ocasionou um acréscimo no rendimento em etanol de 4%, valor significativamente superior às melhores condições reportadas por Fadel et al. (2018) que chegam a no máximo 1,1% de acordo com as avaliações que realizou dos efeitos da adição de antibióticos e biocidas no rendimento em etanol da fermentação alcoólica.

Além disso, o efeito da adição do *blend* de OE nas bactérias é evidenciado não apenas na redução da contagem, mas também na consequente redução da produção de ácido láctico detectada na fermentação.

Outro ponto importante a ser ressaltado é o efeito dos antimicrobianos e biocidas sobre as leveduras.

O estudo conduzido por Meneghin et al. (2008) realizou a avaliação do efeito inibitório de dióxido de cloro em contaminantes bacterianos (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis* e *Leuconostoc mesenteroides*), em concentrações que variaram entre 10 e 125 mg/L, e mostrou que há um efeito inibitório na aplicação de dióxido de cloro em concentrações superiores a 50 ppm, ocasionando efeitos deletérios nas leveduras industriais.

Neste sentido, os óleos essenciais apresentam a vantagem de terem sido previamente testados em uma ampla gama de linhagens de leveduras. A partir dessa triagem inicial, apenas os que se mostraram inertes em leveduras foram considerados para avaliações posteriores em contaminantes bacterianos.

Assim, tanto os óleos essenciais constituintes da tecnologia *blend* quanto o *blend* são inertes a todas as linhagens de leveduras industriais avaliadas mesmo em concentrações elevadas, superiores a 1000mg/L.

Além disso, a complexidade química dos OE, que inicialmente foi considerada uma desvantagem para utilização de produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de fármacos na década de 1960, conforme apontado por Bernardes e colaboradores (2017), recentemente voltou a chamar a atenção dos pesquisadores. Esse interesse pode ser notado por uma análise realizada por Newman e Cragg, que demonstrou que dentre os fármacos aprovados pela FDA entre os anos de 1981 e 2014, 65% eram de produtos naturais ou derivados de produtos naturais.

A complexidade e variabilidade da composição química dos OE, em função da diversidade das rotas biossintéticas de produção nas diferentes espécies, traz como vantagem a ação destes bioativos em múltiplos alvos celulares dos contaminantes, favorecendo a utilização deste tipo de tecnologia no combate à resistência microbiana, como ocorre com a aplicação dos antibióticos.

Neste sentido, a tecnologia desenvolvida pode ser classificada como limpa ou *ecofriendly* por atuar não apenas no controle de bactérias contaminantes da fermentação na indústria de bioetanol, mas também por contribuir para a mitigação do problema de disseminação de genes de resistência a antibióticos, bem como o desenvolvimento de micro-organismos com múltiplas resistências.

Por fim, os ganhos ambientais e econômicos decorrentes do uso desta tecnologia ultrapassam o conceito de uma mera substituição utilizando diferentes moléculas, já que o *Blend* de OE aqui proposto acarreta não apenas uma melhoria de processo na indústria do bioetanol, como também pode ser considerada uma tecnologia sustentável que impulsiona o desenvolvimento da cadeia produtiva de plantas medicinais e aromáticas, tendo em vista que estudos posteriores que avaliem e otimizem as condições edafoclimáticas, fatores bióticos e abióticos que possam alterar a variabilidade química e abundância de compostos nas espécies de interesse, podem ser demandas a serem consideradas a partir deste tipo de desenvolvimento.

Assim, a composição proposta se apresenta como um produto promissor em termos biotecnológicos para substituir os antibióticos utilizados no controle da contaminação bacteriana nos processos de fermentação para produção de bioetanol, demonstrando o potencial de utilização de bioativos provenientes de plantas, majoritariamente nativas, neste novo segmento de aplicação de óleos essenciais que aqui se inicia.

8. Considerações Finais

- ✦ Apesar dos inúmeros problemas apontados em relação ao uso irrestrito de antibióticos, esta ainda é a principal estratégia de controle de contaminação utilizada pelas unidades produtoras de bioetanol atualmente.
- ✦ Os ensaios avaliando a atividade dos óleos essenciais em leveduras mostraram que, de maneira geral, as linhagens de panificação são mais sensíveis à presença de OE do que as linhagens nativas e linhagens industriais, tidas como padrões comerciais.
- ✦ Assim como descrito por diversos trabalhos na literatura, os contaminantes bacterianos isolados das unidades industriais consistem majoritariamente de bactérias lácticas, sendo *Lactobacillus* o gênero mais prevalente.
- ✦ Por outro lado, diferentemente dos trabalhos descritos na literatura em relação às espécies prevalentes de bactérias lácticas, a espécie de *Lactobacillus paracasei* foi a mais prevalente nas usinas brasileiras avaliadas.
- ✦ Embora a adição de bactérias nos ensaios fermentativos pareça não afetar as leveduras quando o parâmetro de contagem é considerado, as análises de monitoramento da fermentação demonstraram que a adição de bactérias na fermentação ocasionou um decréscimo no rendimento em etanol médio de 6,8%, afetando a produção de etanol. Além disso a concentração de ácido láctico mais que triplicou com a adição de bactérias.

9. Conclusões Gerais

- Os resultados obtidos demonstram a relevância da biodiversidade brasileira como fonte de bioativos, visto que dos 40 óleos essenciais analisados (23,8% provenientes de plantas exóticas e 76,2% de plantas nativas) 47,5% apresentaram atividade para linhagens de leveduras industriais. Além disso, considerando os 21 óleos essenciais analisados em contaminantes bacterianos, 42,8% apresentaram eficácia acima de 60%, sendo que 22,2% foram extraídos de plantas exóticas e 77,8% de plantas nativas.
- Os ensaios fermentativos sugerem que o uso de óleos essenciais, especialmente sob a forma combinada em *blends*, é uma alternativa eficaz para o controle de contaminantes bacterianos em processos fermentativos para produção de etanol.

10. Referências Bibliográficas

ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry 4th ed. Illinois Allured Publ. 2007 804p.

ALBA-LOIS, I. SEGAL- KISCHINEVZKY, C. Yeast fermentation and the making beer and wine. Nature Education, v3, n.9, p17, 2010.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat. Rev. Microbiol.. 8:251-259. doi.10.1038/nrmicro2312. 2010.

ALUMRAN A, HOU XY, SUN J, YOUSEF AA, HURST C. Assessing the construct validity and reliability of the parental perception on antibiotics (PAPA) scales. BMC Public Health. 2014;14(1):73.

ALVES T.M.A., SILVA A.F., BRANDÃO M., GRANDI T.S.M., SMÂNIA E.F., SMÂNIA Jr. A., ZANI C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 95:367-373, 2000.

AMORIM, H. V.; LEÃO R.M. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. 1ª ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora Comercio de Livros Ltda, v.3000, 433p., 2005.

AMORIM, H.V. de; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, Piracicaba, v. 17, n.5, p. 54-59, 1999.

ANDRIETTA, M.G.S; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? 2011Biofuel Production Recent Developments and Prospects, Dr Marco Aurélio dos Santos Bernardes (Ed.) ISBN:978-953-307-478-8, In-Tech.E-book (PDF) ISBN 978-953-51-4435-9. DOI:10.5772/959. 2011.

ANG-LEE, M.K.; MOSS, J.; YUAN, C.S. Herbal medicines and perioperative care.**JAMA**; 286(2):208-16.2001.

AQUARONE, E. Penicilin and tetracycline as control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**, New York, v.8 p.263-268,1960.

ARGUESO, J.L.; WESTMORELAND, J.; MIECZKOWSKI, P.A.; GAWEL, M.; PETES, T.D.; RESNICK, M.A. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. **PNAS** 105 (33) 11845-11850; 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804529105>

ARGUESO, J.L.; CARAZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S. MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D. PEREIRA, G.A.C. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research** 19:2258-2270. 2009

ARUNACHALAM, M., STEVEN, C.R. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. **Bioresour. Technol.** **101**, 5033–5042. 2010.

AZAM, A.H.; TANJI, Y. Bacteriophage-host arm race: An update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, 2121–2131, 2019.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil – A review. **Food and Chemical Toxicology**, **46**, p.446-475, 2008.

BALLESTER-COSTA, C.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS M. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. **Ind. Crops Prod.**, **50**:304–311. 2013.

BAQUERO F.; BLÁZQUEZ J. Evolution of antibiotic resistance, *Tree* **12**:482-487, 1997.

BARBIERI, C.; BORSOTTO, P. Essential Oils: Market and Legislation. 2018. DOI:10.5772/INTECHOPEN.69939

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Work by chemistry and biologists, 1789-1850. **Yeast** **14**:1439-145, 1998.

BARNETT, J. A history of research on yeasts: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850- 1880. **Yeast** **16**:755-771, 2000.

BARNETT, J.; LICHTENTHALER, F. A history of research on yeasts: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. **Yeast** **18**:363-388, 2001

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679- 688, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E.; *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Ed. da Unicamp: Campinas, 2002.

BASSO, L.C. PAULILLO, S.C.L. RODRIGUES, D.A. BASSO, T.O. AMORIM, H.V. WALKER, G.M. Aluminium toxicity toward yeast fermentation and protective effect of magnesium. International Congress on Yeasts – Yeasts in: **Science and Biotechnology. The Quest for Sustainable Development**, Book of Abstracts, Rio de Janeiro, p. PB-14, 2004.

BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8, 1155–1163, 2008.

BAYROCK, D.P.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentation by constant or pulsed addition of penicillin G. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.62, p.498-502, 2003.

BENTO, M.H.L.; OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; LAHTINEN, S.; NURMINEN, P.; SAARINEN, M.T.; SCHULZE, H.; MYGIND, T.; FISCHER, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals-effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. **Vet. Med.**, 58, 449–458. 2013.

BERDY J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. **J. Antibiot.**; 58: 1–26. 2005.

BERNARDES, L.S.C.; LANG, K.L.; PETROVICK, P.R. SCHENCKEL, P. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos in *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*, ArtMed Editora, 2017, 486p.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET, F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphisms of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22, 1-7. 1992.

BISCHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A.; LEATHERS, T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 34:739-744, 2007.

BISCHOFF, K.M., LIU, S., LEATHERS, T.D., WORTHINGTON, R.E. AND RICH, J.O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnol Bioeng** 103, 117–122. 2009.

BOYLE, W. Spices and essential oils as preservatives. **The American Perfumer and Essential Oil Review.** 66, p.25-28, 1955.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. **Anim. Feed Sci. Technol.** 158, 1-4, 2010.

BRODA, M.; GRAJEK, W. Ammonia disinfection of corn grains intended for ethanol fermentation. **Acta Sci Pol Technol Aliment**; 8:33-8, 2009.

BUKE, C.; HOSGOR-LIMONCU, M.; ERMERTCAN, S.; CICEKLIOGLU, M.; TUNCEL, M.; KÖSE, T.; EREN, S. Irrational use of antibiotics among university students. **J Infect.** 2005;51(2):135–9.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiological.** 94 (3), p.223-253, 2004.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clin Microbiol Rev** 16:175–188. 2003. doi:10.1128/CMR.16.2.175-188:2003

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. CONTROLE DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM A APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NATURAIS. **Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 2, n. 1, 2011.

CARVALHO, J.R.P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* DC. **J.Ethnopharmacol.**, 95, 297-301, 2004.

CARVALHO-NETTO, O.V. Fisiologia da fermentação alcoólica: Análise da expressão gênica de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo fermentativo. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) 2012. [*Physiology of the alcoholic fermentation: gene expression analyses of a Saccharomyces cerevisiae industrial strain during the fermentative process* Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R. A.; PERES, L.E.P. Metabolismo Secundário in Manual de Fisiologia Vegetal (Teoria e Prática) Editora Agronômica Ceres. 2005, 650p.

CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Fermentation Knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **European Molecular Biology Organization Reports**. Vol.11 (12), p.914-920, 2010.

CHANG I.S.; KIM, B.H.; SHIN, P.K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Appl Environ Microbiol.** 63:1-6, 1997.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, v.23 (2) Wayne, Pennsylvania USA, 2005.

COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M.; YU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Sci. Total Environ.** 545–546, 556–568. 2016.

CONNER, D.E. **Naturally occurring compounds**. In Antimicrobials in Foods; Davidson, P. M., Branen, A. L., Eds.; Dekker: New York, 1993; 441-468.

COSTANTIN, M.B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M.J. P. ; OHARA, M.T.; EMERENCIANO, V.P.; KATO, M.J. Essential Oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Med.** 67:771-773. 2001

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; NORONHA, H.S.M.; DUARTE, M.C. T.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. **Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae).** Química Nova v. 32, 78-81, 2009.

COSTA, M.A.S.; CERRI, B.C.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate lactobacillus fermentum from the fermentation process for fuel ethanol production. Lett. Appl. Microbiol., 66, 77–85, 2018.

DAVIES J, DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(3):417–33.

DEANS, S. G; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal Food Microbiology**, 5, 165-180. 1987.

DEC, M.; URBAN-CHMIEL, R.; STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D.; WERNICKI, A. Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens. *Gut Pathog.*;9:54. 2017. doi:10.1186/s13099-017-0203-z

DENGATE, S.; RUBEN, A. Controlled trial of cumulative behavioural effects of a common bread preservative. **J. Paediatr. Child Health**, 38, 373-376. 2002.

DEVIRGILIS, C.; BARILE, S.; PEROZZI, G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes Nutr* 6:275–284. 2011 doi:10.1007/s12263-011-0226-x

DOYLE, M. P. Antimicrobial resistance: implication for the food system. *Compr. Rev. Food Sci Food Saf.* 5:71-137. 2006

DRAVET, F.M.; OLIVEIRA, A.S. Relações entre oralidade e escrita na comunicação: Sankif, um provérbio africano. *Relations Between Orality and Writing in Communication: Sankofa, Miscelânea*, Assis, v. 21, p. 11-30, 2017.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research.** 21: p.308-323, 2007.

ESSAM, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 130, 325-337, 2001.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred Accuracy Assessment. **Genome Research**, 8:175-185, 1998.

FADEL, M. ZOHRI, A.N.A.; EL-HEENRY, M.S. ADBEL AZIZ, A.M. Managing of bacterial contamination in alcoholic fermentation of sugarcane molasses. *Asina Journal of Science and Technology*. Vol.9: 1,7383-7391. 2018.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. "Ethanol can contribute to energy and environmental goals." *Science* 311(5760): 506-8. 2006.

FEIJÓ, E.V.R.da S.; OLIVEIRA, R.A.; COSTA, L. C. do B. Light effects *Varroniacurassavica* essential oil yield by increasing trichomes frequency. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 24, 516-523, 2014.

FERNÁNDEZ DE ULLIVARRI, M.; MENDOZA, L.M.; RAYA, R.R. Killer yeasts as biocontrol agents of spoilage yeasts and bacteria isolated from wine. In *Proceedings of the BIO Web of Conferences*, Mendoza, Argentina, 9–14 November 2014; Volume 3, p. 02001.

FITZGERALD, D.J.; STARTFORD, M.; NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. **Int. J. Food Microbiol.**, 86,113-122, 2003.

FLEET, G. H. The commercial and community significance of yeasts in Food and Beverage Production in Querol A., Fleet G. (eds) *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

FREIRES, I.A.; BUENO-SILVA, B.; GALVÃO, L.C.C.; DUARTE, M.C. T.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; ALENCAR, S.M.de ; ROSALEN, P. L. The Effect of Essential Oils and Bioactive Fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Biofilms: A Confocal Analysis. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015.1-9, 2015.

FOWLER, T.; WALKER, D.; DAVIES, S.C. The risk/benefit of predicting a post-antibiotic era: is the alarm working? *Ann N Y Acad Sci*;1323(1):1–0, 2014.

GARVEY, C.; MCBRIDE, T.; NEVIN, L.; PEIPERL, L.; ROSS, A.; SIMPSON, P.; TURNER, R. The PLOS Medicine Editors Antimicrobial Resistance: Is the World UNprepared? **PLoS Med** 13(9) 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5019402/pdf/pmed.1002130.pdf>

GEORGE, D.R.; SMITH, J.; SHIEL, R.S.; SPARAGANO, O.A.E.; GUY, J.H. Mode of action and variability in efficacy of plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* **Vet. Parasitol.** 161,276-282, 2009.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. **Fitoterapia**. 79(3), p.199-203, 2008.

GOLDEMBERG, J. "The Brazilian biofuels industry." *Biotechnol Biofuels* 1(1): 6. 2008.

GORBACH, S.L. Antimicrobial use in animal feed—time to stop. *N Engl J Med* 345:1202–1203. 2001.

GORDON. C. R. 2009 FDA Sampling detects Antibiotics Residues in Ethanol Distillers Products. **National Grain and Feed Association Newsletter**, January 29, 2009. Disponível em <http://www.ngfa.org/files/misc/News1-29.pdf> (Acessado em 15 Outubro 2016).

GU, Z.; OLIVER, S. Yeasts as models in evolutionary biology. **Genome Biology** London, v.10,.p304, 2009.

GUENTHER, E. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York, 1948.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine** n.6, 1- 93, 2006.

HALBERSTEIN, R. A.Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns **Ann. Epidemiol.** 15. 686-699, 2005.

HAMMER, K.A. CARSON, C.E. RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant-extracts. **J Appl. Microbiol.**, 86, 985-990, 1999.

HIRSCHMANN, G.S., ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **J Ethnopharmacol** 29: 159-172, 1990.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components *Front. Microbiol.*, 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 18 (5), p.284-291, 1997.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total Environ.* 2005;346(1-3):87–98.

ISLAM, A.; SAIFUDDIN, A.K.M.; FARUQ, A.A.; ISLAM, S.; SHANO, S.; ALAM, M.; HASSAN, M.M. Antimicrobial residues in tissues and eggs of laying hens at Chittagong, Bangladesh. *Int. J. One Health.*;2(2):75–80, 2016.

JAIMEE, G; HALAMI, P.M. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin – an impending menace. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:1137-1151.2016

JAMSHIDI-KIA F, LORIGOOINI Z, AMINI-KHOEI H. Medicinal plants: past history and future perspective. **J HerbmedPharmacol.**7(1):1-7. 2018.

JURANEK, P.; DUQUETTE, P. Antibiotic regulatory considerations for distillers grains. *Distillers Grains Q.*, 4th quarter. BBI International Media, Grand Forks, ND. 2007.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, 10, 813-829, 2003.

KIM, S.I.; ROH, J.Y.; KIM, D.H.; LEE, H.S.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **J. Stored Prod.Res.** 39, 293-303, 2003.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16, p.111-120, 1980.

KITAKA, Patrícia Regina; ANDRIETTA, Maria da Graça Stupiello; MERZEL, Valéria Maia; DUARTE, Marta Cristina Teixeira; FIGUEIRA, Glyn Mara. **Composições e seu uso**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. Procurador: Ciro de la Cerda BR nº1020180168045. Depósito 16 de agosto de 2018.

KITAKA, P.R.; DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; STECKELBERG, C. DELARMELINA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Potential use of essential oils in baker's yeast. In **Pesquisa na Cadeia de Plantas Aromáticas**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. Cap.1. p.1-12. DOI 10.22533/at.ed.6219130091.

KITAKA, P.R.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; STECKELBERG, C. DELARMELINA, C. OLIVEIRA, V.M.; ANDRIETTA, M.G.S. Sturdiness of baker's yeast strains to natural bioactive compounds. In **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia** 2. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. Cap.14. p.143-153. DOI 10.22533/at.ed.39420220114.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and α -cymene. **Bioresource Technology**, Dec; 99(18) p.8788-95, 2008.

KOURKOUTAS, Y.; KARATZAS, K.A.G.; VALDRAMIDIS, V.P.; CHORIANOPOULOS, N. Bioactive Natural Products: Facts, Applications, and Challenges. **BioMed Research International**, Vol.2015

KREIS, W.; MUNKERT, J. PÁDUA, R. M. Biosíntese de metabólitos primários e secundários in Farmagognosia: Do produto natural ao medicamento. 1ª edição. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. ArtMed Editora, 2017, 486p.

KUORWEL, K.K.; CRAN, M.J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S.W. Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for synthetic packaging films. **J. Food. Sci.** 76, R164– R177. 2011.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFIN, L.; SANTOS, AC; FRIZZO, C.D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay **Planta Medica** 66, 476-477, 2000.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J.L.S.; NUNES, A.C.; AZVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.L.; MORAIS JUNIOR, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, 2010, 10:298

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2001.

MAIORELLA B, BLANCH HW, WILKE CR (1983) By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 25:103–121

MAKANJOULA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme Microb. Technol.** V.14 May 1992.

MARAGAKIS, L.L.; PERENCEVICH, E.N.; COSGROVE, S.E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2008;6(5):751–63.

MARÍN, I.; SAYAS-BARBERÁ, E.; VIUDA-MARTOS, M.; NAVARRO, C.; SENDRA, E. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from organic fennel, parsley, and lavender from Spain. **Foods**, 5, 18.2016.

MARSHALL, B.M.; EVY, S.B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24:718-733. 2011
doi:10.1128/CMR00002-11

MASTRANDREA, M. D.; STEPHEN, H. S. Global Warming, World Book Online Reference Center.
<http://www.worldbookonline.com/wb/Article?id=ar226310>. 2005.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das Agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea** 1933 [Tradução de Cláudia F. Falluh Balduino Ferreira]. São Paulo; Brasília, DF: NEAD, Editora UneSP –2010 586p.:il

MCGOWAN, J.E. JR. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.*;7(2):286–92, 2001.

MISSAWA, S.K. Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional. Campinas, 2009

MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s. Botucatu, **13**, 298-304.2011.

MOTHES, K.; SCHÜTTE, H.R.; LUCKNER, M. Bioschemistry of alkaloids, Verlag Chemie, Weinheim. 1985.

MÜLLER-AUFFERMANN, K.; GRIJALVA, F.; JACOB, F.; HUTZLER, M. Nisin and its usage in breweries: A review and discussion. *J. Inst. Brew.*, 121, 309–319, 2015.

MURPHREE, C. A.; HEIST, P.E.; MOE, L.A. Antibiotic Resistance Among Cultured Bacterial Isolates from Bioethanol Fermentation Facilities Across the United States **Curr Microbiol** 2014 DOI 10.1007/s00284-014-0583-y

MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermentors. **Bioresour Technol** 101:50 33-42, 2010.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog. Energy Combust. Sci.*, 37, 351–370, 2011.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied Environmental Microbiology**. V.63, p.4158-4163, 1997.

NARENDRANATH N.V., THOMAS K.C., INGLEDEW, W. M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **J Am Soc Brew Chem** 59:187–194, 2001.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **Int. J. Food Microbiol.**, 156, 7–17. 2012.

NAWAZ, M.; WANG, J.; ZHOU, A.; MA, C.; WU, X.; MOORE, J.E.; MILLAR, B.C.; XU, J. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Curr Microbiol* 62: 1081–1089. 2011. doi:10.1007/s00284-010-9856-2

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J.Nat Prod.* 2016. 79 (3):629-61

NOBRE, T.P., HORII, J.; ALCARDE, A.R. Cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in association with contaminant bacteria of alcoholic fermentation. *Ciência Tecnol. Aliment.* 2007, 27:20-25.

NYCHAS, J.E. Natural antimicrobials from plants. In: Goul, G.W. (Ed), *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional, London, p.58-89, 1995

OAKLEY-GUTOWSKI, K.M., HAWTHORNE, D.B., AND KAVANAGH, T.E. Application of chromosome fingerprinting to the differentiation of brewing yeasts. **Am. Soc. Brew. Chem.** v.50, p. 48–52, 1992.

OGDEN, K. Nisin: A bacteriocin with a potential use in brewing. **J. Inst. Brew.**, 92, 379–383, 1986.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.10, p.697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Estudos de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. 1995. 183p. Tese (Doutorado em engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1995

OLMSTEAD, J.; WALLINGA, D. Antimicrobial alternatives: public health risks call into question continued antibiotic use in ethanol production. **Foodborne Pathog Dis.** Jul.7(7):871, 2010.

O'NEILL, J. The review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

OUSSALAH, M.; CAILLET, S. SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* thyphimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* **Food Control**, 18, 414-420, 2007.

PALANIAPPAN, K. HOLLEY, R.A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drugs resistant bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 140: 164-168. 2010.

PEREIRA, R. A. N.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, VERA L. G.; GODOY, M. C. L. ; SILVA, A. F. **Uso de Plantas Medicinais na Terapêutica Animal**. Informe Agropecuário (Belo Horizonte), v. 31, p. 101-105, 2010.

PETERS, R.J.B.; BLOCK, Y.J.C.; RUTGER, S.P.; STOLKER, A.A.M.; NIELEN, M.W.F. Multi residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**.1216(46):8206–8216, 2009.

PRIFTIS, K.M.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ANTHRACOPOULOS, M. B.; PAPADIMITRIOU, A.; NICOLAIDOU, P. Aims, methods and preliminary findings of the Physical Activity, Nutrition and Allergies in Children Examined in Athens (PANACEA) epidemiological study. **BMC Public Health**, 7:140, 1471-2458. 2007.

RADLER, F. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. **Am. J. Enol. Vitic.**, 41, 1–6, 1990.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S. M.A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, 62, 250–264, 2014.

RIBELLES, P.; RODRIGUEZ, I.; SUAREZ, J.E. Lysa2, the *Lactobacillus casei* bacteriophage a2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 94, 101–110, 2012.

RODRIGUES.F.F.;OLIVEIRA, L.G.;RODRIGUES, F.F.;SARAIVA, M.E.;ALMEIDA, S.C.;CABRAL, M.E.;CAMPOS, A.R.;COSTA, J.G. **Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves** Pharmacognosy Res. **4(3):161-165**, 2012.

ROLLER, S. Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Cambridge: Woodhead Publishing, Limited. 2003.

SAAED, R.M.; ELYAS, Y.Y.A.; YOUSIF, N.M.; ELTAYEB, M.M.; AHMED, I.S.M Incidence of antibiotic resistance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from various Sudanese fermented foods. **J. Food Nutr. Disor.**2014, 3:6 <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9323.1000161>

SABINI, L.I. Study of the cytotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp. **Molecular Medicinal Chemistry**, v.11, 31-3,2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4, p.406-425, 1987.

SALVI, D.A.; AITA, G.M.; ROBERT, D.; BAZAN, V. Ethanol production from sorghum by a dilute ammonia pretreatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 27–34, 2010.

SÁNCHEZ, E.; GARCÍA, S.; HEREDIA, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*, **Appl Environ. Microbiol.**76, 6888-6894, 2010.

SANTOS, A. R.; BENGHI, T.G.S.; NEPEL, A.; MARQUES, F.A.; LOBÃO, A. Q.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L.N.S. Antiproliferative and Antibacterial Activities of Essential Oils from Four Species of Guatteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, 1-6, 2017.

SANTOS, S.A.; CRISPIM, S.M.A.; FILHO, J.C.; POTT, A.; CARDOSO, E.L. **Substituição de Pastagem Nativa de Baixo Valor Nutritivo por Forrageiras de Melhor Qualidade no Pantanal**. EMBRAPA, Circular Técnica, nov, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 35, n.4, 275-280, 2004.

SCHJORRING, S.; KROGFELT, K.A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. *Int J Microbiol* 2011:1–10. 2010. doi:10.1155/2011/312956

SCHLOSS, P.D et al Introducing Mothur: open-source, platform-independent,community- supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23):7537-7541, 2009.

SENDRA, E. Essential Oils in Foods: From Ancient Times to the 21st Century, **Foods**,5:43, 1-3, 2016.

SEO, S.-O.; PARK, S.-K.; JUNG, S.-C.; RYU, C.-M.; KIM, J.-S. Anti-Contamination Strategies for Yeast Fermentations. *Microorganisms*, 8, 274, 2020.

SHAROPOV, F.; BRAUN, M.; GULMURODOV, I.; KHALIFAEV, D.; ISUPOV, S.; WINK, M. Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from tajikistan. **Foods**. 4:645. 2015.

SHALLCROSS, L.J.; HOWARD, S.J.; FOWLER, T.; DAVIES, S.C. Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. **Phil. Trans. R. Soc. B** 370: 20140082. 2015 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0082>

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, 6, p.29-44,1983.

SILBERGELT, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**. 29, p.151-169, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 2007

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol** **31**, 401–408, 2004.

SMITH, D.L.; DUSHOFF, G. MORRIS Jr. Agricultural antibiotics and human health. **PloS Med**. 2(8):e232. 2005

SMITH R, COAST J. The true cost of antimicrobial resistance. *Bmj*. 2013;346:f1493.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-bourne pathogens. **Letters in Food Microbiology** 26, p118-122, 1998.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**. 18, p.463-470, 2001.

SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23(2)136-141. 2011

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química). [*Characterization of yeasts from alcoholic fermentation processes using cell composition and attributes and kinetic characteristics*.Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STECKELBERG, C.; KITAKA, P.R.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. Dominance and Persistence of PE strains (*Saccharomyces Sensu Stricto*) in Brazilian Bioethanol Fermentation Tanks (One Unit Four Seasons). **International Journal of New Technology and Research** 3 (6) 2017.

STEFANAZZI, N. STADLER, T. FERRERO, A. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Pest Manag. Sci.**, 67, 639-646. 2011.

STRATFORD M. **Food and Beverage Spoilage Yeasts**. In: Querol A., Fleet G. (eds) Yeasts in Food and Beverages. Springer, Berlin, Heidelberg 2006.

STROPPIA C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. *Int Sugar J.* 2000. 102:78–82

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24, p.1596-1599, 2007.

THEIS, N.; LERDAU, M. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. **International Journal of Plant Sciences** 164(S3):93-102, 2003.

THOMAS KC, HYNES SH, INGLEDEW WM Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Appl Environ Microbiol** 68:1616–1623. 2002.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS. D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** 24, p.4876-4882, 1997.

THUMU, S.C.R.; HALAMI, P.M. Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. **Antonie Van Leeuwenhoek** 102:541–551. 2012 doi:10. 1007/s10482-012-9749-4

TIWARI, R.; RANA, C.S. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science* Vol.3 (5). 2015.

TOSETTO, G.M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. 2008 Tese (Doutorado em Engenharia Química). [Behavior of *Saccharomyces industrial strains* before inhibiting compounds present in sugarcane molasses in bioethanol production. Thesis]. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

TYAGI, A. D.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M.E.; Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. **LWT-Food Science and Technology**, 57 (2), 731-737, 2014.

TSERENNADMID, R.; TAKÓ, M.; GALGÓCZY, T.; PAPP, T.; PESTI, M.; VÁGVÖLGYI, C.; ALMÁSSY, K.; KRISCH, J., Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk **Int. J. Food Microbiol**, 144, 480-486, 2011.

UDOP - UNIÃO NACIONAL DA BIOENERGIA Produção Brasileira de Etanol. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Política Agrícola - Departamento de Comercialização e Abastecimento DCAA / SPAE/MAPA Disponível em: https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/12ago20_producao_brasileira_etanol.pdf ,2020.Acessado em 25/08/2020.

UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar
<http://unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=2449&safr=2019%2F2020&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR> Acessado em 23/09/2020

VAN DE BRAAK; S.A.A.J.; LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Center for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p.16, 1999.

VILANOVA, M.; ZAMUZ, S.; MASA, A.; SIEIRO, C. Evaluation of PFGE and mtDNA restriction analysis methods to detect genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated to *Vitis Vinifera* J. Int. Sci. Vigne Vin, 41, n°3, n°3, 155-159, 2007.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Cont.** 19,1130-1138, 2008.

WEBER, J.T.; COURVALIN, P. An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance. *Emerg Infect Dis.* 11(6):791, 2005.

WINK, M. Plant secondary metabolism: Diversity, Function and its evolution. *Natural Products Communications.* Vol.8 (3)1205-1216, 2008.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents* 14:321– 325. 2000.

ZIMMERMANN M., FOURNIER P. Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In: *Nonconventional Yeasts in Biotechnology.* Springer, Berlin, Heidelberg 1996 DOI https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3

11. ANEXOS

11.1 DOCUMENTO DE DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "***Biotivos Naturais: Potencial de Óleos Essenciais para controle de contaminação bacteriana na indústria de bioetanol***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Patrícia Regina Kitaka

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Valéria Maia Merzel

Data: 23 de Novembro de 2020

11.2 DOCUMENTO DE DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Bioativos Naturais: Potencial de óleos essenciais para o controle de contaminação bacteriana na indústria de bioetanol**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 23 de Novembro de 2020

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Patrícia Regina Kitaka**
RG n.º 29.340.001-5


Assinatura :
Nome do(a) orientador(a): **Valéria Maia Merzel**
RG n.º 12.573.419

11.3 DOCUMENTO DE DECLARAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO E/OU CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Anexo II

DECLARAÇÃO POSITIVA DE ACESSO A PATRIMÔNIO GENÉTICO NACIONAL E/OU CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Eu, **Patricia Regina Kitaka**, nacionalidade **brasileira**, estado civil **solteira em união estável**, bióloga, portadora do RG nº 29.340.001-5, e inscrito no CPF nº 277.357.548-25, declaro para os devidos fins, que houve acesso ao Patrimônio Genético Nacional e/ou Conhecimento Tradicional Associado na pesquisa e desenvolvimento tecnológico que deu origem à Comunicação de Invenção de código interno **1251_BLEND**, cujo número do cadastro (Sisgen) é o **A8EAA6E**.

Campinas, 14 de Agosto de 2018.



Patricia Regina Kitaka