

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KELLI DE SOUZA DIAS

**USE OF JAMBOLON AND PINK PEPPER IN CONTROL OF MICROBIAL
CONTAMINATION IN INDUSTRIAL FERMENTATION**

DOURADOS
2018

KELLI DE SOUZA DIAS

**USE OF JAMBOLON AND PINK PEPPER IN CONTROL OF MICROBIAL
CONTAMINATION IN INDUSTRIAL FERMENTATION**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal da Grande Dourados
como parte dos requisitos necessários para a
obtenção do Grau de Bacharel em
Biotecnologia. Sob a orientação do Professor Dr.
Marcelo Fossa da Paz.

DOURADOS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D541u Dias, Kelli De Souza
USO DE JAMBOLÃO E PIMENTA ROSA NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA EM FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL [recurso eletrônico] / Kelli De Souza
Dias. -- 2018.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcelo Fossa da Paz.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Antibióticos. 2. Contaminantes. 3. Leveduras fermentadoras. 4. Usina. I. Paz,
Marcelo Fossa Da. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Dedico

Aos meus pais, Darci e Luciana.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família, que sempre estiveram do meu lado todo esse tempo de luta, tanto nos momentos bons, como os difíceis.

Aos meus pais Luciana e Darci, por sempre fazerem de tudo para que eu pudesse chegar onde cheguei.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz, que foi um ótimo orientador, sempre ajudando e confiando em mim.

A minha colega de laboratório Mariza pelo companheirismo no laboratório.

Aos membros da banca examinadora Prof.^a Dr.^a Gisele Jane de Jesus e ao Prof. Dr. Rodrigo Simões Leite.

Ao meu namorado Marcelo Franco de Arruda por sempre estar do meu lado nos momentos mais estressantes que a faculdade fez eu passar, e por ainda estar aqui me ajudando sempre que preciso.

Aos pais do meu namorado dona Cristina e João Batista, que me ajudaram sempre durante todos esses anos.

A minha tia Zefa Valdivina, que me ajudou no momento da minha vida que mais precisei, e que sempre me apoiou durante todos esses anos.

A minha prima Juliane Lobtchenko, que esteve do meu lado desde sempre, uma pessoa que sempre posso contar para qualquer coisa.

A minha melhor amiga Bruna Nonato, que esteve ao meu lado nesses quatro anos, me suportando, me cuidando, e me ajudando todo esse tempo.

A minha amiga Vitória, que me ajudou muito me ensinando varias coisas no laboratório.

As minhas amigas Claudia Alessandra e a Geisianny Nunes pelo apoio e ajuda nos momentos que mais precisei.

Ao meu amigo Everson, que disponibilizou seu tempo para me ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	1
LISTA DE TABELA.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivos gerais.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. REVISÃO.....	7
3.1. Etanol.....	7
3.2. Fermentação alcoólica.....	8
3.3. Levedura de processo fermentativo.....	9
3.4. Contaminação bacteriana.....	10
3.5. Antibióticos.....	11
3.6. Extratos vegetais.....	11
3.7. Extratos a base de lúpulo.....	12
3.7.1. JAMBOLÃO <i>Syzygium cumini</i> (L.)	13
3.7.2. AROEIRA <i>Schinus terebinthifolius</i>	14
4. METODOLOGIA.....	15
4.1. Local dos experimentos.....	15
4.2. Material vegetal.....	15
4.3. Extratos hidroalcoólicos.....	16
4.4. Meios de cultura.....	16
4.5. Material microbiano.....	16
4.6. Classificação da bactéria.....	17
4.7. Teste de difusão em ágar.....	17
4.8. Análise estatística.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS	23

APÊNDICE 1. Ficha da exsicata da planta <i>Syzygium cumini</i>	29
APÊNDICE 2. Ficha da exsicata da planta <i>Schinus terebinthifolius</i>	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fórmula estrutural do etanol.	8
Fotografia 1. Lúpulo	12
Fotografia 2. Jambolão (<i>Syzygium cumini</i> (L.)	14
Fotografia 3. Pimenta Rosa (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	15
Fotografia 4. Lactobacilos Gram-positivo.	17
Figura 2. Controle Negativo e Positivo do extrato de <i>Schinus terebinthifolius</i>	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetro do crescimento microbiano pelo método de difusão em disco dos extratos de <i>Syzygium cumini</i> (L.), <i>Schinus terebinthifolius</i> e lúpulo pelo teste de Tukey.....	20
--	----

RESUMO

O enorme interesse na substituição de antibióticos nos processos industriais por antimicrobianos naturais, tem sido uma nova alternativa de se reduzir a quantidade de bactérias que causam contaminações no processo industrial sem que as leveduras sejam afetadas. As transformações que as bactérias podem ocasionar em uma fermentação industrial pode gerar problemas em todo o processo. Essas bactérias possuem a capacidade de consumir os substratos e açúcares presentes nas fermentações, dificultando ou até inibindo o crescimento das leveduras fermentadoras, também podem mudar todo o produto final, devido as substâncias que as mesmas podem produzir. Por isso, com o objetivo de minimizar esse grande problema, sem que se faça a utilização de antibióticos sintéticos, o uso de extratos de plantas está sendo a alternativa mais viável no momento. Nesse experimento utilizou três plantas para se fazer os extratos, Jambolão (*Syzygium cumini* (L.)) e Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*) e o Lúpulo (*Humulus lupulus*), foi utilizado também cinco concentrações, (12 mgxmL^{-1} , 24 mgxmL^{-1} , 60 mgxmL^{-1} , 200 mgxmL^{-1} , e 300 mgxmL^{-1}). As bactérias contaminantes e as leveduras foram coletadas na usina. Para classificar a bactéria foi necessário se fazer o método de coloração de gram. As análises do experimento foram feitas por análise de variância e por meio de comparação das medias pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade no programa de estatística GENES. Os resultados mostraram que o extrato da Pimenta Rosa na concentração 200 mgxmL^{-1} , não obteve o efeito para a levedura, e se mostrou eficaz na inibição da bactéria.

Palavras-chave: Antibióticos, contaminantes, leveduras fermentadoras, usina.

ABSTRACT

The enormous interest in the substitution of antibiotics in industrial processes by natural antimicrobials has been a new alternative to reduce the amount of bacteria that causes contamination in the industrial process without the yeasts being affected. The transformations that bacteria can cause in an industrial fermentation can generate problems throughout the process. These bacteria have the ability to consume the substrates and sugars present in the fermentations, hindering or even inhibiting the growth of fermenting yeasts, they can also change the entire final product, due to the substances they can produce. Therefore, in order to minimize this great problem, without the use of synthetic antibiotics, the use of plant extracts is the most viable alternative at the moment. In this experiment three plants were used to make extracts, Jambolão (*Syzygium cumini* (L.)) and Pepper pink (*Schinus terebinthifolius*) and Hops (*Humulus lupulus*). Five concentrations were also used: 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹, 60 mgxmL⁻¹, 200 mgxmL⁻¹, and 300 mgxmL⁻¹). Contaminant bacteria and yeasts were collected at the plant. To classify the bacterium it was necessary to make the gram staining method. The analyzes of the experiment were done by means of analysis of variance and by means of comparison of means by the test of Tukey in level of 5% of probability in the program of statistics GENES. The results showed that Pepper pink extract at 200 mgxmL⁻¹ concentration, did not have an effect on yeast and was effective in inhibiting the bacteria.

Key words: Antibiotics, contaminants, fermenting yeasts, plant.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é pioneiro na produção em larga escala de álcool combustível, sendo um dos líderes mundiais nessa área, com isso o interesse pelo álcool no Brasil parece ter se fortalecido em virtude das novas perspectivas de mercado. A fermentação alcoólica é a operação mais complexa e importante da fabricação do álcool, por utilizar organismos vivos e concentrar grande parte da eficiência da produção.

No Brasil existe vários tipos de processos de fermentação industrial, onde pode ocorrer a disputa entre leveduras e bactérias, que utilizam quase todo o substrato do processo de fermentação para o seu metabolismo. Essas bactérias produzem substâncias indesejáveis, que pode ser imensamente relevante na produtividade final.

O processo fermentativo das indústrias sucroenergéticas geralmente possuem condições não assépticas, onde pode ocorrer frequentemente a contaminação por bactérias ou até por leveduras não *Saccharomyces*. Esses contaminantes podem gerar grandes problemas, tanto operacionais quanto econômicos. As contaminações ocorrem devido ao reciclo de células de levedura para aumentar a produtividade, com isso também pode-se reciclar as bactérias contaminantes. As contaminações bacterianas no processo fermentativo podem-se originar durante as operações de transferência da cana-de-açúcar do campo até a indústria, envolvendo corte, carregamento, transporte, descarregamento e até armazenamento da matéria-prima.

A contaminação bacteriana pode diminuir o rendimento da produção do produto de interesse, devido a elas consumirem uma grande quantidade de sacarose ou até mesmo reduzir a viabilidade da levedura. A existência de certos índices de microrganismos indesejáveis pode ocasionar prejuízos ao processo industrial (PRADO, 2014).

Durante o processo de centrifugação os microrganismos contaminantes também são reciclados juntamente com o fermento e agravam os problemas associados com a contaminação bacteriana (CHERUBIN, 2003). Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas

drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2007).

O método adotado pelas indústrias e usinas que utilizam processos fermentativos para a obtenção de seus produtos de interesse é a adição de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo para o controle de bactérias. Como os antibióticos vem sendo um grande empecilho para as indústrias, devido as bactérias estarem ganhando resistência aos mesmos, então está sendo necessário que se busque outras alternativas para que se possa resolver esse problema.

As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais, de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido a sua diversidade de seus constituintes (LIMA et al., 2006).

Devido a frequente presença de contaminantes durante o processo fermentativo é interessante que se conheça os fatores que podem possibilitar a redução desses problemas causados pelas bactérias. Para que se possa diminuir as contaminações uma grande quantidade de antibióticos vem sendo utilizada. Contudo isso está se tornando um problema, pois as bactérias contaminantes cada vez mais estão evoluindo e ficando resistentes a esses antibióticos que são descartados em lugares inapropriados. Esse descarte incorreto dos antibióticos está prejudicando cada vez mais o meio ambiente, os animais e aos seres humanos.

Nos últimos anos foram testados antimicrobianos naturais com o objetivo de substituir os antibióticos, com o intuito de ser sustentável e também ser uma das formas mais viáveis economicamente de se fazer um tratamento tão complexo. Nas últimas décadas, foram intensificadas as investigações sobre fitoterápicos que possam oferecer tratamento alternativo de controle bacteriano (PUPO et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de Jamelão (*Syzygium cumini* (L.)) e Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), contra bactérias contaminantes que

causam contaminações nos processos fermentativos, sem que a mesma afete o processo fermentativo da levedura.

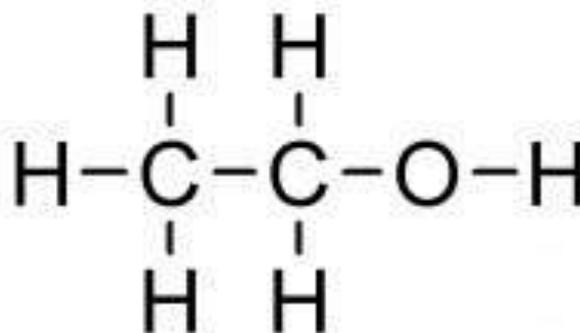
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Avaliar atividade antimicrobiana de Jamelão (*Syzygium cumini* (L.)) e Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), contra as bactérias contaminantes de processos industriais de fermentação alcoólica;
- ❖ Avaliar atividade antimicrobiana de Jamelão (*Syzygium cumini* (L.)) e Pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), contra as leveduras industriais utilizadas em fermentação alcoólica;
- ❖ Identificar a concentração ideal de extrato para uso no controle de contaminação nas usinas;

3. REVISÃO

3.1. ETANOL

O Brasil hoje é o maior produtor de cana-de-açúcar, desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade, esse aumento tem colaborado para novas tecnologias e aumento de usinas em todo o país. Essa planta trouxe muitos benefícios, como empregos, rendas para a população e para empresas sucroenergéticas (NUNES, 2017). A cana-de-açúcar é uma planta semi perene da família das gramíneas. A sacarose se concentra nos colmos, que compõe a parte aérea da planta enquanto a palha da cana está em suas pontas e folhas (BNDES; CGEE, 2008). O etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Figura 1), também chamado álcool etílico - na linguagem popular, simplesmente álcool - é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução a acetaldeído¹², encontrado em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, bem como na indústria de perfumaria (ÚNICA, 2008).

Figura 1. Fórmula estrutural do etanol

Fonte: HIELSCHER, (2018).

O etanol tem uma importância ambiental muito relevante, pois além de ser produzido a partir de uma matéria-prima renovável, gerar empregos na cadeia sucroenergética e novas oportunidades de negócios, esse biocombustível também reduz a emissão de gases para a atmosfera, o que é uma preocupação mundial atualmente (SEBRAE,2016).

3.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica industrial é a transformação de açúcares em álcool etílico (etanol) e gás carbônico (CO₂) pela ação de um determinado grupo de organismos unicelulares predominantemente denominados leveduras (SILVA; COUTO, 2007). O processo de conversão que ocorre dentro da célula é dividido em duas etapas: A primeira etapa é a conversão do monossacarídeo em ácido pirúvico (piruvato), isso acontece através de uma sequência de dez reações enzimáticas, esta etapa é conhecida como glicólise. A segunda etapa acontece a partir do ácido pirúvico, em condições de anaerobiose ocorre fermentação alcoólica propriamente dita, dando origem então ao produto final mais comum neste processo, o etanol (MADIGAN et al., 2010).

A fermentação é uma operação complexa e importante na fabricação do álcool, por utilizar organismos vivos e concentrar grande parte da eficiência da produção. É uma reação química exotérmica que transforma as moléculas de glicose, em moléculas de álcool e gás carbono liberando energia térmica.

O agente da fermentação é um microrganismo conhecido popularmente como fermento e tecnicamente como *Saccharomyces cerevisiae*, que foi biologicamente desenvolvido e adaptado para a indústria alcooleira. Esses organismos são desenvolvidos para propiciar fermentação uniforme, rápida e com alto rendimento em etanol (SILVA; COUTO, 2007).

As células de levedura, durante o processo de fermentação alcoólica apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da transformação do açúcar em álcool (AMORIM, 2005).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais frequentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, a acidez do meio (inclusive no tratamento ácido), a presença de sulfito, a contaminação bacteriana e, mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces* (BASSO, 2004).

3.3. LEVEDURA DE PROCESSO FERMENTATIVO

Saccharomyces é o gênero de maior predominância nos processos fermentativos. No Brasil, a espécie que apresenta a melhor adaptação às condições industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*. Também existem outras espécies do mesmo gênero *Saccharomyces* e outros gêneros isolados em destilarias no Brasil, como por exemplo, *S. ellypsoideus*, *S. fragilis*, *S. coreanus*, *S. bayanus*, *S. chevalieri*, *S. pretoriensis* (*Torulaspota pretoriensis*) e *Schizosaccharomyces pombe*, entre outras (CINELLI, 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular, pois seu metabolismo, semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) tornam este microrganismo uma valiosa ferramenta de estudo do metabolismo e fisiologia celular. Esta levedura destaca-se por realizar uma rápida conversão de açúcar a etanol e CO₂ (OLIVEIRA, 2009).

As leveduras podem se reproduzir por esporulação ou por gemulação (ou brotamento). O método mais comum é o da gemulação, onde a partir da célula

mãe é formada uma protuberância que dará origem à célula filha. Durante sua vida uma célula madura produz, por gemulação, uma média de 24 células filhas. As gemulações sucessivas são sempre formadas em locais diferentes na superfície celular, permanecendo cicatrizes das gêmulas como resultado deste processo de reprodução (STECKELBERG, 2011).

3.4. CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Os processos industriais de produção de álcool existentes no Brasil reutilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos. Durante o processo de centrifugação os microrganismos contaminantes também são reciclados juntamente com o fermento e agravam os problemas associados com a contaminação bacteriana (CHERUBIM, 2003).

A infecção bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo, tais como: consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido aos metabólitos tóxicos e ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007).

A redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias lácticas é óbvia pois, quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico resulta em duas moléculas de etanol que deixaram de serem produzidas pela levedura (NARENDRANATH, 1997).

As bactérias *Acetobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Eterobacter* sp., *Leuconostoc* sp. e *Streptococcus* sp. são os contaminantes mais atuantes e geralmente associados aos fracassos da fermentação alcoólica, devido à formação de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, além de estarem associados a floculação (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Além disso, as análises químicas e microbiológicas possibilitam um melhor controle dos processos de fermentação alcoólica, reduzindo as perdas e melhorando o desempenho do setor (AMORIM; BASSO; LOPES, 2008).

3.5. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são substâncias do metabolismo secundário de fungos e bactérias com capacidade de impedir o crescimento ou levar à morte outros microrganismos, podendo ser sintéticos ou naturais (WALSH, 2003)

Os princípios ativos dos antibióticos são de origem do metabolismo de microrganismos selecionados e o seu grau de pureza depende do refinamento do processo de purificação de cada empresa produtora de antibióticos (CHERUBIN, 2003). Antibióticos como penicilina e a tetraciclina são utilizados nas fermentações (BREGAGNOLI, 2006), porém não é admissível usar uma levedura para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresente resíduos de antibióticos (TAUBE, 2009 *apud* CAETANO; MADALENO, 2011). Além disso, a resistência térmica dos antibióticos impede sua destruição durante a destilação, fazendo com que alguns antibióticos sejam levados junto da vinhaça para campo no processo de fertirrigação.

Sabe-se que o problema da resistência microbiana é crescente, e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

Somado a tudo isso a utilização de antibióticos no controle microbiológico da produção de etanol apresenta elevado custo (CAETANO; MADALENO, 2011). O uso indiscriminado de antibióticos levou ao desenvolvimento de resistência a drogas em muitas cepas de bactérias patogênicas e estudos estão em andamento para descobrir novos agentes que sejam eficazes e seguros para o consumo humano (DE OLIVEIRA et al., 2007).

Na tentativa de minimizar os efeitos da contaminação a indústria sucroenergética trata o fermento com antibiótico e ácido sulfúrico para o controle da infecção bacteriana.

3.6. EXTRATOS VEGETAIS

Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias

ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (NASCIMENTO et al., 2000).

Os extratos de plantas são ricos em fitoquímicos, como compostos fenólicos, flavonoides e taninos, que são fontes de antioxidantes naturais e tem a capacidade de ser antimicrobianos, dentre eles o extrato a base de lúpulo, extrato do jambolão e extrato da pimenta rosa.

3.7. EXTRATOS À BASE DE LUPULO

O lúpulo é uma flor da família das Canabidáceas que entra na composição das cervejas (Fotografia 1). A planta não tem efeito entorpecente, serve para dar à cerveja seu amargor, além de contribuir no aroma da bebida (NOGUEIRA, 2004).

Fotografia 1. Lúpulo



Fonte: (MESTRE CERVEJEIRO, 2014).

Os ácidos do lúpulo interferem no transporte de metabólitos na membrana celular e modificam o pH intracelular o que provoca a morte das bactérias por meio de insuficiência nutricional. Sua ação é mais eficiente em bactérias Gram-positivas (SILVA; FARIA, 2008). Atuam principalmente sobre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, limitando seus metabolismos e

melhorando as condições fermentativas para as leveduras. Isso proporciona melhores condições para o crescimento das leveduras que irão fermentar mais rapidamente o mosto e com maior produção de álcool (RUCKLE; SENN, 2006).

3.7.1 JAMBOLÃO (*Syzygium cumini* (L.))

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.)) (Fotografia 2) que é pertencente à família Myrtaceae é uma planta promissora, sendo abundantemente cultivada no Brasil como árvore ornamental, de sombra e muito utilizada como quebra vento para várias culturas. Originou-se na Ásia tropical, especificamente no subcontinente indiano, e é comum em regiões tropicais e clima subtropical, que pode ser encontrado na maioria dos estados brasileiros (BALIGA et al., 2011). É conhecido como jamelão, jambolão, azeitona preta, azeitona roxa, jambul, jamun, entre outros (SOUSA, 2015).

Com relação ao Jambolão, estudos mostraram que o extrato hidroalcoólico da folha possui efeitos antibacterianos contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus in vitro* (DE OLIVEIRA et al., 2007). Segundo Loguercio e colaboradores (2005) citado por Caetano e Madaleno (2011), o extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão na concentração de 10% (m/v) apresentou atividade antibacteriana frente a vários isolados bacterianos, a saber: *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp., *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus* sp., *S. aureus*, *S. intermedius*, *Streptococcus canis*, *Salmonella typhi* e *S. cholerasuis*, não sendo observada diferença de sensibilidade entre microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Este estudo justifica o teste com as bactérias contaminantes dos processos de fermentação alcoólica industriais que apresentam alta resistência osmótica e ao álcool.

Fotografia 2. Jambolão (*Syzygium cumini* (L.))



FONTE: (LEE DOC, 2018).

3.7.2 Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*)

A espécie *Schinus terebinthifolius* (Fotografia 3), pertence à família Anacardiaceae e é popularmente conhecida como, pimenta rosa, aroeira-vermelha, aroeira mansa, aroeira branca, aroeira da praia, aroeira do brejo, aroeira rasteira, aroeira do campo que é um vegetal nativo no Brasil e introduzida na Europa, onde é muito apreciada pela beleza de seu porte, sendo muito utilizada na arborização de ruas (RIBAS et al., 2006).

A aroeira tem sido alvo de vários estudos envolvendo o uso de extratos de casca, folhas e frutos como promotor de cicatrização e como agente antibacteriano e antifúngico (ESTEVÃO et al., 2013). Um extrato hidroalcoólico de folhas de Aroeira mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARTINEZ et al., 2000).

Fotografia 3. Pimenta Rosa (*Schinus terebinthifolius*)



Fonte: (EVERGLADES, 2011)

4. METODOLOGIA

4.1. LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no Prédio Multidisciplinar, no Laboratório de Biotecnologia Aplicada, pertencente a Faculdade de ciências biológicas e ambientais (FCBA), da Universidade Federal da Grande Dourados, na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul no período de março à agosto de 2018.

4.2. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas folhas jovens das plantas (*Syzygium cumini* (L.) e *Schinus terebinthifolius*) coletadas pela manhã no campus da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). As exsicatas são pertencentes ao Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados, obtém o número de registro 3494 e 5566, respectivamente (Apêndices: 1 e 2).

4.3. EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

Foram preparados extratos hidroalcoólicos (70% etanol e 30% água) da folha seca das plantas com atividade antimicrobiana (*Syzygium cumini* (L.) e *Schinus terebinthifolius*). Primeiramente as folhas foram separadas dos ramos, lavadas, esterilizadas com hipoclorito e secas em estufa de circulação e renovação de ar, com temperatura média de 50°C, por 48 h. Depois de secas as folhas foram trituradas até obter-se um pó fino. Em balança analítica pesou-se a massa seca em uma proporção de 86 g de pó da folha da planta para cada 500 mL da solução hidroalcoólica a 70%. A homogeneização do extrato foi feita em um agitador rotativo tipo *shaker* sob agitação à 400 RPM, em temperatura ambiente por um período de 48 h. Em seguida o extrato foi filtrado em gaze, e a partir deste extrato bruto, foi necessário que se fizesse a evaporação do solvente utilizado para a extração de todos os componentes presentes na planta. Para isso foi necessário se utilizar um rotaevaporador com a temperatura de 50°C à 60°C, a fim de se retirar todo esse solvente presente no extrato bruto. O extrato restante ficou em uma estufa de circulação, para a secagem total, onde ficou a 50°C por um período de 72 h. Depois de seco totalmente o extrato, foi macerado em um pistilo até que se ficasse em pó, facilitando a pesagem para a diluição. As concentrações dos extratos empregados nos testes de atividade antimicrobiana foram 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹, 60 mgxmL⁻¹, 200 mgxmL⁻¹, e 300 mgxmL⁻¹ (conforme SILVEIRA, 2009; PINHO et al., 2011)

4.4. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados foram meios ricos que permitem o crescimento vigoroso do microrganismo. Para a bactéria MSR broth e para a levedura YEPD foram utilizados, autoclavados a 121°C e 1 atmosfera por 20 min.

4.5. MATERIAL MICROBIANO

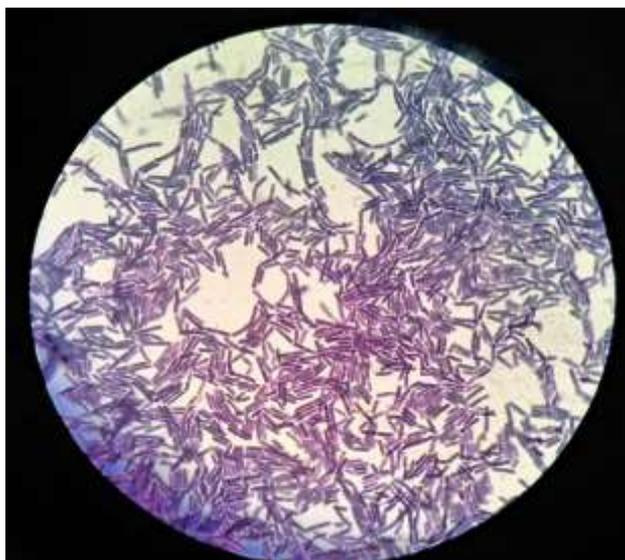
Foram selecionados Lactobacilos Gram-positivo obtidas através da coleta do material na Usina, e também a leveduras PE-2 (*Saccharomyces cerevisiae*).

Tais isolados integram o Laboratório de Biotecnologia Aplicada do campus da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), onde se mantêm liofilizados e congelados a -20°C .

4.6. CLASSIFICAÇÃO DA BACTÉRIA

Para a identificação da bactéria foi necessário que se fizesse coloração de Gram, que é o método de coloração utilizado para descobrir se a bactéria é gram-negativa ou gram-positiva. A bactéria utilizada em estudo foi classificada como Lactobacilos Gram-positivo (Fotografia 4).

Fotografia 4. Lactobacilos Gram-positivo



Fonte: (O autor)

4.7. TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela metodologia de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, para conhecer o perfil de atividade dos extratos. Para este ensaio utilizou-se alíquotas de $5\ \mu\text{L}$ dos extratos nas concentrações de $12\ \text{mgx mL}^{-1}$, $24\ \text{mgx mL}^{-1}$, $60\ \text{mgx mL}^{-1}$, $200\ \text{mgx mL}^{-1}$, e $300\ \text{mgx mL}^{-1}$ para impregnar os discos de papel, cada concentração. Uma suspensão do microrganismo teste ($1,5 \times 10^8\ \text{UFCx mL}^{-1}$ para bactérias e $1,5 \times 10^5\ \text{UFCx mL}^{-1}$ para leveduras) foi determinada através

de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland e espalhada (100 µL) sobre a superfície de meio sólido, (MRS para as bactérias, e o YEPD para leveduras) em placa de Petri de (15 x 90 milímetro). Posteriormente foram adicionados sobre as placas inoculadas os discos impregnados com 5 uL dos extratos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h (bactérias) e a 28°C por 48 h (leveduras). Após este período foi realizada a leitura visual observando-se o halo de inibição de crescimento microbiano quantificado em milímetro com o auxílio de uma régua. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os mesmos repetidos 4 vezes, gerando 12 repetições.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

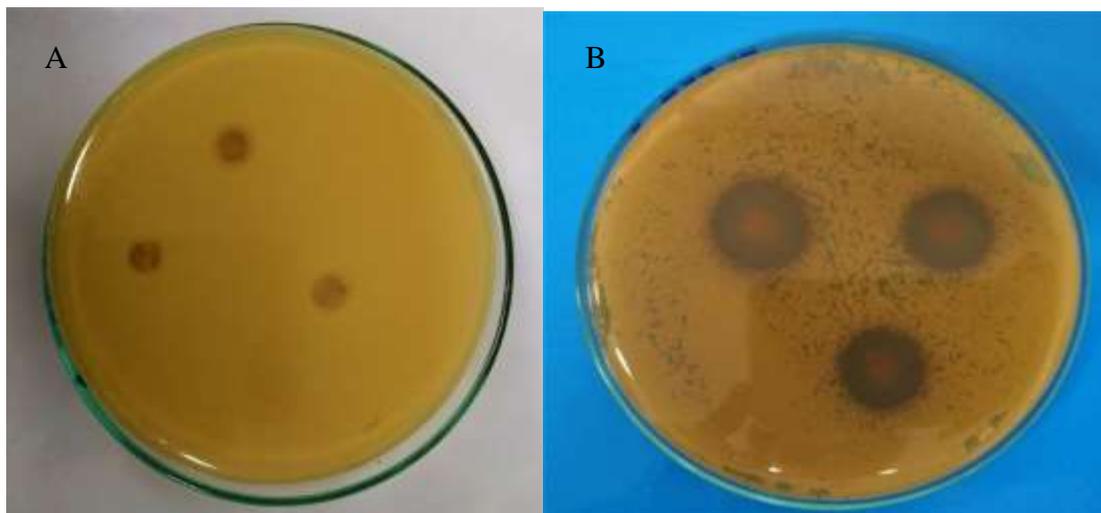
Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Cada tratamento constituído de três repetições, sendo que cada cultivo bacteriano e de levedura foi testado 5 concentrações de cada tratamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de difusão em ágar, os diferentes extratos foram avaliados nas concentrações de 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹, 60 mgxmL⁻¹, 200 mgxmL⁻¹, e 300 mgxmL⁻¹ frente aos dois microrganismos testados: Lactobacilos Gram-positivo e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem PE-2, os resultados estão expressos na (Tabela 1).

Na metodologia da difusão em ágar, os extratos tiveram perfil de inibição diferente, visto que o extrato hidroalcoólico da *Schinus terebinthifolius* na concentração de 200 mgxmL⁻¹ se mostrou com maior eficiência frente a Lactobacilos Gram-positivo e não mostrou atividade na *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1). Já a *Syzygium cumini* (L.), se mostrou ineficaz para o estudo, pois a maioria das concentrações se mostraram inibitórias para a levedura.

Figura 2. Controle Negativo e Positivo do extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi



Legenda: Fotografia (A): Controle negativo para inibição da levedura frente ao extrato de *Schinus terebinthifolius* na concentração de 200 mgxmL^{-1} ; Fotografia (B): Controle positivo para inibição da bactéria frente ao extrato de *Schinus terebinthifolius*, se mostrando como indicador de atividade na concentração de 200 mgxmL^{-1} .

Fonte: O autor

Tabela 1. Média dos diâmetros (milímetro) dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo método de difusão em ágar frente aos extratos de *Syzygium cumini* (L.), *Schinus terebinthifolius* e Lúpulo.

Concentração (mgxmL ⁻¹)	Diâmetro do Halo (mm)					
	<i>Syzygium cumini</i> (L.)		<i>Schinus terebinthifolius</i>		Lúpulo (Controle)	
	<i>S. cerevisiae</i>	Lactobacilos (Gram-positivo)	<i>S. cerevisiae</i>	Lactobacilos (Gram-positivo)	<i>S. cerevisiae</i>	Lactobacilos (Gram-positivo)
12	0 cA	0 bB	0 bA	0 bB	0 aA	24 aA
24	12.66 bcA	0 bB	0 bA	0 bB	0 aA	24 aA
60	12.83 abA	14 abB	0 bB	0 bB	0 aB	24 aA
200	15 aA	16.33 abA	0 bB	15,10 aA	0 aB	24 aA
300	13.21 aA	24 aA	10 aA	13,11 aA	0 aB	24 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL e minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

O teste Tukey, indica que há diferença estatística entre os tratamentos com uma significância 5% de probabilidade. A concentração de 200 mgxmL⁻¹ do extrato *Schinus terebinthifolius* foi a única que apresentou diferença nos resultados tanto para a bactéria quanto para a levedura, se mostrando semelhante ao Lúpulo. Para o extrato de *Syzygium cumini* (L). nos testes com *Saccharomyces cerevisiae* as concentrações de 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹ não diferem estatisticamente entre si, porém a concentração 24 mgxmL⁻¹ também não difere estatisticamente da concentração 60 mgxmL⁻¹. A concentração 60 mgxmL⁻¹ também não apresenta diferenças estatísticas às concentrações 200 mgxmL⁻¹ e 300 mgxmL⁻¹, sendo elas diferente das demais (Tabela 1).

Os resultados do extrato de *Schinus terebinthifolius* mostram que 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹, 60 mgxmL⁻¹ e 200 mgxmL⁻¹, não apresentam diferença estatística entre si, mas se diferem da concentração 300 mgxmL⁻¹. Os resultados do extrato de Lúpulo mostram que todas as concentrações são estatisticamente iguais (Tabela 1).

Os três extratos na concentração 12 mgxmL⁻¹ e 24 mgxmL⁻¹ não diferem entre si, mas são diferentes das demais. Já nas concentrações 60 mgxmL⁻¹ e 200 mgxmL⁻¹ o extrato de *Syzygium cumini* (L.), é diferente estatisticamente dos outros extratos.

Nas concentrações 60 mgxmL⁻¹ e 200 mgxmL⁻¹ dos extratos da *Schinus terebinthifolius* Raddi e Lúpulo, são iguais estatisticamente entre si. Na concentração 300 mgxmL⁻¹ os extratos de *Syzygium cumini* (L.), *Schinus terebinthifolius* Raddi se apresentaram iguais estatisticamente e diferentes do extrato de lúpulo (Tabela 1).

Para o extrato de *Syzygium cumini* (L). nos testes com *Lactobacilos* (Gram positivo) mostram que as concentrações de 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹ são estatisticamente idênticas entre si, porém as concentrações 300 mgxmL⁻¹, 60 mgxmL⁻¹ e 200 mgxmL⁻¹ são estatisticamente iguais, estas, porém, se diferem das concentrações 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹ (Tabela 1).

Os resultados do extrato de *Schinus terebinthifolius* mostram que 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹ e 60 mgxmL⁻¹, são iguais estatisticamente entre si, e se diferem das concentrações de 200 mgxmL⁻¹ e 300 mgxmL⁻¹.

Os resultados do extrato de Lúpulo mostram que todas as concentrações são iguais estatisticamente entre si (Tabela 1).

Os extratos *Syzygium cumini* (L.) e *Schinus terebinthifolius*, nas concentrações de 12 mgxmL⁻¹, 24 mgxmL⁻¹ são iguais estatisticamente entre si, e se diferem do extrato de Lúpulo. Já nas concentrações 60 mgxmL⁻¹, 200 mgxmL⁻¹ e 300 mgxmL⁻¹ os três extratos se apresentaram iguais estatisticamente (Tabela 1).

6. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Schinus terebinthifolius* apresenta atividade antibacteriana frente a Lactobacilos (Gram-positivo), mas não frente a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo assim ele possui as médias iguais estatisticamente às do Lúpulo, podendo ser um substituto à altura.

A concentração inibitória ideal de *Schinus terebinthifolius* Raddi para Lactobacilos Gram-positivo e sem efeito para a levedura foi de 200 mgxmL⁻¹.

O uso das folhas dessas espécies vegetais pode constituir-se numa alternativa sustentável, viável e acessível para tratamento antimicrobiano podendo substituir os antibióticos convencionais.

7. REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P., Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J., Infecção na fermentação: como evita-la. **Açúcar e Álcool**, v.5, p.12-18, 1982.

AMORIM, H. V., Ethanol production in a petroleum dependente world: the Brazilian Experience. **Sugar Journal**, v. 67, p. 11-14, 2005.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L., Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão agrícola**, Piracicaba, v. 8, p. 34-37, 2008

BALIGA, M.S.; BHAT, H.P.; BALIGA, B.R.V.; WILSON, R.; PALATTY, P.L., 2011. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. **Food Research International** 44, 1776–1789. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.007>.

BASSO, L. C., Fisiologia e ecologia microbiana, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BNDES E CGEE. (Org.). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: **Bndes**, 2008. 316 p. DC, 2007. Disponível em: Acesso em: 09 de novembro de 2018.

BREGAGNOLI, F.C.R. Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica. 2006. 80 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Revista Ciência & Tecnologia**: FATEC-JB, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

CINELLI, B. A. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 2012.

CHERUBIN, R. A., Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. 2003. 137 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DE OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA-FILHO, A. A.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; Atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *Syzygium cumini* (myrtaceae). **Revista Brasileira de Microbiologia**, 38 (2007), pp. 381 – 384.

ESTEVÃO, L. R. M.; MENDONÇA, F. S.; EVÊNCIO, L. B.; SIMÕES, R. S.; BARROS, M. E. G. B.; ARANTES, R. M. E.; RACHID, M. A.; NETO, J. E., Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirurgia Brasileira**. vol. 28. São Paulo Mar. 2013.

EVERGLADES. Everglades Organisms. 2011. Disponível em: <http://kozybooks0-everglades-b.blogspot.com/2011/05/everglades-organisms.html>. Acesso em: 09 de novembro de 2018.

HIELSCHER. Fermentação assistida por ultra-som para a produção de bioetanol. **Hielscher tecnologia de ultrassom**. Disponível em: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonically-assisted-fermentation-for-bioethanol-production.htm>. Acesso em: 08 de novembro de 2018.

JORGE, N., Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S. Sant'Ana AEG 2006. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacologia** 16: 300-306.

LEE DOC. Jambolão: Benefícios e Como Usá-lo. 2018. Disponível em: <https://www.leetdoc.com/br/jambolao/>. Acesso em: 09 de novembro de 2018.

LOGUERCIO A. P.; BATTISTIN A.; VARGAS A. C.; HENZEL A.; WITT N. M., Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n2, p331-376, mar-abr, 2005.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock. 12. ed.**, Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARTINEZ, M.J., BARREIRO, M.L., RODRIGUEZ, Z.M., RUBALCABA, Y., 2000. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 5, 23–25.

MESTRE CERVEJEIRO. O Lúpulo. 2014. Disponível em: <http://www.cervejacsac.com/mundo-cervejeiro/o-lupulo/>. Acesso em: 09 de novembro de 2018.

NAREDRAMATH. N. V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M.. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4158-41163, Nov. 1997.

NOGUEIRA, M. O que é lúpulo. Revista Superinteressante. n.197, fev. 2004. Disponível em: Acesso em: 08 de novembro de 2018.

NUNES, E. F. Cana-de-açúcar: a produção de etanol e seus benefícios. **Curso técnico em agronegócios**. INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO CAMPUS BARRETOS (2017).

OLIVEIRA, A. A. C. Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura. **Escola de química**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (2009).

OLIVEIRA, A. C. P.; DENISE C. EDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A. S.; BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. C. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**. Volume 102, Issue 3, 1 December 2005, Pages 465-469.

OLIVEIRA G. F.; FURTADO N. A. J. C.; FILHO A. A. S.; MARTINS C. H. G.; BASTOS J. K.; CUNHA W. R.; SILVA M. L. A. Antimicrobial activity of syzygium cumini (myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology** (2007). 38:381-384. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200035>

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I.O.; SILVA-FILHO, R.N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacologia**. (2007). 17: 186-190.

PRADO, J. L. Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”.

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS. CAMPUS DE BOTUCATU.
Janeiro de 2014.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M. ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from rosemary, peppertree, barbatimão and erva baleeira leaves and from pequi peel meal. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, Online ISSN 0103-8478. (2011)

RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Effect of the schinus terebinthifolius raddi in the process of tissular repair in ulcers induced in mucosa oral of the rat. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.

RUCKLE, L., SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products: Nurenberg**, Germany, v. 7, n. 9, 2006.

SEBRAE. O que é etanol. 2016. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-que-e-etanol,ac3d438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCRD>. Acesso em: 03 de novembro de 2018.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciências Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 902-906, out./dez. 2008.

SILVA, J. S.; JESUS, J.C.; COUTO, S. M. Noções sobre Fermentação e Produção de Álcool na Fazenda. In: Produção de Álcool Combustível na Fazenda e em Sistema Cooperativo. Viçosa; 2007.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S. M.; DA CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts:

comparison between two agar diffusion techniques. **Revista Brasileira de Farmacia.**, 90(2), 2009.

SOUSA, M. M.; LIMA, A., NOGUEIRA, N. N. Aplicações de *Syzygium cumini* (L.) Skeels na indústria alimentícia: uma prospecção tecnológica. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia.** 2015

UNICA. Etanol uma atitude inteligente. 2008. Disponível em: [file:///C:/Users/Vanessa/Downloads/56801f3ecac4c41ab7a8c54305635fbe%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/Vanessa/Downloads/56801f3ecac4c41ab7a8c54305635fbe%20(5).pdf). Acesso em: 03 de novembro de 2018.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, jan./fev. 2004.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance; **American Society for Microbiology** - Washington, 2003.

Apêndice 1. Ficha da exsicata da planta *Syzygium cumini*.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL		HERBÁRIO 3494
FAMÍLIA: <i>Myrtaceae</i>		
NOME CIENTÍFICO: <i>Syzygium cumini</i>		
NOME VULGAR: <i>Jambolão</i>		
NOME COLETOR: <i>Ana Paula M.</i>		DATA: <i>16/06/05</i>
NOME DETERMINADOR:		DATA:
PAIS: <i>Brasil</i>	ESTADO: <i>M.S</i>	
MUNICÍPIO: <i>Dourados</i>	LOCAL DA COLETA: <i>KM 14 - Barragem</i>	
HABITAT:	PORTE:	
COR DA FLOR:		
OUTRAS OBSERVAÇÕES:		

Apêndice 2. Ficha da exsicata da planta *Schinus terebinthifolius*.

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS HERBÁRIO DDMS	
		Nº Herbário: <u>5566</u>
Nome Popular: <u>Pimenta Rosa</u>		
Nome Científico: <u><i>Schinus terebinthifolius</i></u>		
Família: <u>Anacardiaceae</u> Características: <u>arvore pequena,</u> <u>ramos foliosos mais ou menos embustecidos, frutos globulosos</u> <u>avermelhados pequenos</u>		
Coletor: <u>Emanoel Sanches Martins</u>		
Nº Coletor: <u>02</u> Local de coleta: <u>Horto de plantas medicinais-</u> <u>UFGD</u>		
Coordenadas geográficas:		Data <u>06/04/2012</u>