

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

ANA CLARA MARCHI

**USO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA EM FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL**

Dourados
Fevereiro de 2022.

ANA CLARA MARCHI

**USO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA EM FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL**

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

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M316u Marchi, Ana Clara
USO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO
MICROBIANA EM FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL [recurso eletrônico] / Ana Clara Marchi.
-- 2022.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcelo Fossa da Paz.
TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2022.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. Extratos vegetais. 3. Antibióticos. 4. Indústrias
sucroenergéticas. 5. Atividade Antimicrobiana. 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.

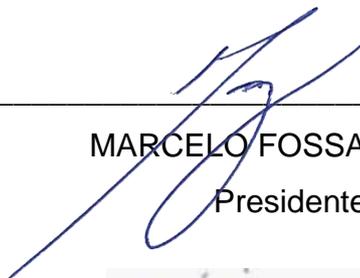
ANA CLARA MARCHI

USO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.
Orientador: Professor Dr. Marcelo Fossa da Paz.
Área de Concentração: Microbiologia Industrial

Aprovada em: 04/03/2022.

BANCA EXAMINADORA



MARCELO FOSSA DA PAZ
Presidente



GISELE JANE DE JESUS
Membro



ALESSANDRO MUNILLO
Membro

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço à Deus pela realização desse trabalho.

À minha tia Maria Madalena Silva da Silva e meu tio Luís Carlos Pereira da Silva, que me ajudaram no momento da vida que eu mais precisei, por todo apoio e por estarem ao meu lado nesse tempo de luta.

Aos meus irmãos, Livia e Luís Otávio, por estarem sempre me incentivando e ajudando em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Marcelo Fossa da Paz, pela orientação, dedicação, paciência durante todo o processo.

A Vanessa Correia Mota e o Willian Ryuichi Hirota de Barros que foram meus companheiros de laboratório e pesquisa.

A Professora Dr^a Gisele Jane de Jesus e ao Dr. Alessandro Minillo, por terem aceitado o convite e contribuírem para o enriquecimento deste trabalho.

Ao meu namorado Diego, pela paciência e companheirismo em todos os momentos.

A todas minhas amigas e amigos que me apoiaram e ensinaram muita coisa durante esses anos de faculdade.

RESUMO

Conhecida cientificamente por *Baccharis dracunculifolia* DC., a “vassourinha”, ou “alecrim do campo”, é uma planta da família Asteraceae, presente na América do Sul e em várias regiões do Brasil. Seu destaque é devido a presença de metabólitos secundários, produzidos como mecanismo próprio de defesa da planta contra agentes externos. A busca de indústrias sucroenergéticas para aprimorar a produção do álcool por via fermentativa é constante, pois a contaminação bacteriana no processo fermentativo pode gerar danos, tais como: floculação do fermento; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio; redução na produtividade e rendimento da fermentação. Métodos para o tratamento do mosto onde o objetivo é controlar a carga microbiana estão sendo muito estudados como alternativas a utilização de antibióticos. O objetivo deste trabalho foi buscar o uso do extrato aquoso das folhas de *Baccharis dracunculifolia* como uma via alternativa para o controle de contaminação contra bactérias das usinas utilizando extratos vegetais. O extrato foi preparado por extração a frio e a quente. Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas, *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus* sp. (Grupo *B. cereus*) isolada da usina São Fernando pelo Centro de Pesquisa e Tecnologia em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul; e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922). A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). No teste de difusão em disco para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizadas as concentrações de 0,1 mgxmL⁻¹, 0,25 mgxmL⁻¹, e 0,5 mgxmL⁻¹. Os resultados mostraram que o extrato de *Baccharis dracunculifolia* na concentração de 0,5 mgxmL⁻¹, não inibiram a atividade da levedura, e se mostrou eficaz na inibição da bactéria.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*, extratos vegetais, antibióticos, indústrias sucroenergéticas, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Scientifically known as *Baccharis dracunculifolia* DC., a “vassourinha”, or “alecrim do campo”, is a plant of the Asteraceae family, present in South America and in several regions of Brazil. Its contrast is due to the presence of secondary metabolites, as the plant's own defense mechanism against external agents. The search for sugar-energy industries to improve the production of alcohol through fermentation is constant, because bacterial contamination in the fermentation process can cause damage, such as: yeast flocculation; inhibition and drop in yeast viability due to toxins and liquids excreted in the medium; reduction in productivity and fermentation yield. Methods for the treatment of the wort where the objective is to control the microbial load are being studied as an alternative to the use of antibiotics. The objective of this work was to search, through the aqueous extract of the leaves of *Baccharis dracunculifolia*, an alternative to control contamination against bacteria from plants using plant extracts. The extract was prepared by cold and hot extraction. As Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Bacillus sp.* (*B. cereus* group) isolated from Usina São Fernando by the Center for Research and Technology in Natural Resources, State University of Mato Grosso do Sul; and a Gram negative bacterium *Escherichia coli* (ATCC 25922). The yeast used was *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2). In the disk diffusion test were used such as 0.1 mgxmL⁻¹, 0.25 mgxmL⁻¹, and 0.5 mgxmL⁻¹ procedures to assess antimicrobial activity. The results showed that the extract of *Baccharis dracunculifolia* at a concentration of 0.5 mgxmL⁻¹ did not inhibit yeast activity, and was effective in inhibiting the bacteria.

Key words: *Baccharis dracunculifolia*, plant extracts, antibiotics, sugar-energy industries, antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Produção Mundial de Etanol Combustível por país, destacando-se os dois maiores produtores mundiais.....	14
Fotografia 1- Vassourinha, Baccharis dracunculifolia	19
Fotografia 2 - Material coletado e esterilizado a ser desidratado.....	21
Fotografia 3 - Representa a ação do extrato aquoso da B. dracunculifolia à frio e a quente, observando-se que a levedura PE-2 não apresenta sensibilidade frente aos extratos.....	25
Dendrograma 1 - Análise de distância genética	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo método de difusão em disco frente ao extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i>.....	25
---	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO	13
3.1	Etanol	13
3.2	Fermentação alcoólica.....	14
3.3	Levedura de processo fermentativo	15
3.3.1	Reprodução.....	16
3.4	Contaminação bacteriana	16
3.5	Antibióticos.....	17
3.6	Extrato vegetal, vassourinha <i>Baccharis dracunculifolia</i>	18
4	JUSTIFICATIVA DE ESTUDO.....	20
5	METODOLOGIA	20
5.1	Local dos experimentos.....	20
5.2	Material vegetal.....	20
5.3	Preparação de extratos	21
5.4	Preparo das diluições do extrato	22
5.5	Meios de cultura.....	22
5.6	Material microbiano.....	22
5.7	Manutenção dos microorganismos.....	23
5.8	Ativação das bactérias.....	23
5.9	Ativação da levedura	23
5.10	Teste de difusão em agar	23
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28
	APÊNDICE 1	34
	REFERÊNCIAS APÊNDICE 1.....	36

1 INTRODUÇÃO

Espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas, da família Asteraceae, estão amplamente distribuídas pela América do Sul nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Plantas do gênero *Baccharis*, são arbustos com uma grande diversidade morfológica, conhecidas popularmente por “alecrim-do-campo”, “carquejas” ou “vassourinhas” (CANCELLI; EVADT; BAUERMANN, 2007; FERRONATTO *et al.*, 2007).

Quanto ao ponto de vista fitoquímico, *Baccharis dracunculifolia* DC., vem sendo estudada revelando uma grande variedade de constituintes químicos com atividade biológica e com destaque aos efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos. Devido sua composição micromolecular, pode-se observar que o gênero é caracterizado pelo acúmulo de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e flavonoides. Diversos estudos mostram que as inúmeras atividades biológicas da própolis verde se associam com os constituintes presentes na planta (LEMOS *et al.*, 2007; PAULINO *et al.*, 2008; NAKANISHI *et al.*, 2003).

A agroindústria do álcool apresenta considerável valor sobre a economia. A produção do álcool ocorre por via fermentativa, devido a isso é fundamental ter conhecimento sobre todo o processo e buscar formas de aprimorá-lo. A contaminação bacteriana no processo fermentativo pode gerar danos, tais como: floculação do fermento; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio; consumo de açúcar; e redução na produtividade e rendimento da fermentação (YOKOYA, 1991; ALCARDE; HORII; NOBRE, 2007).

As bactérias do grupo Gram-positivo são os microrganismos contaminantes que predominam na fermentação alcoólica, pesquisas mostram que os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* são os de maior ocorrência (SKINNER; LEATHERS, 2004). Na fermentação alcoólica, em cultura mista com bactérias contaminantes, diversos autores consideram a influência dos ácidos acético e láctico na inibição do crescimento e ocorrente queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos mostram que se a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a $10^6 - 10^7$ células x mL⁻¹ de mosto, manifesta-se uma significativa queda no rendimento alcoólico (MAKANJUOLA; TYMON; SPRINGHAM, 1992; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001).

As indústrias sucroenergéticas tradicionalmente utilizam métodos para o tratamento do mosto onde o objetivo é reduzir a carga microbiana contaminante com a utilização de antibióticos e de ácido sulfúrico concentrado. A resistência antimicrobiana e a sua disseminação entre bactérias são geralmente consequência da pressão seletiva desses antibióticos. Considerando que as bactérias desenvolvem uma resistência aos antibióticos, a estratégia de se utilizar extratos naturais como agentes antimicrobianos vem sendo muito estudada (NARENDRANATH; POWER, 2004).

A alternativa de substituir antibióticos utilizando antimicrobianos naturais vem sendo muito estudada nos últimos anos, pois é vista como uma forma mais viável economicamente e sustentável para realizar o tratamento na fermentação. As empresas desse ramo, buscam cumprir metas de produção, rendimento e custo; e perdas podem causar prejuízos que influenciam diretamente na economia da empresa. A importância de se conhecer essas perdas e suas interferências no processo produtivo vem sendo estudada em convergência com a utilização de extratos que ofereçam um tratamento alternativo de controle bacteriano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

“Determinar a concentração mínima inibitória do extrato de *Baccharis dracunculifolia* para uma bactéria contaminante da fermentação alcoólica”.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Verificar se há atividade antimicrobiana da *Baccharis dracunculifolia* contra as bactérias contaminantes de processos industriais de fermentação alcoólica e determinar a concentração mínima inibitória;
- ❖ Verificar se *Baccharis dracunculifolia* apresenta atividade antimicrobiana contra a levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 utilizada na fermentação alcoólica;
- ❖ Identificar o potencial do extrato vegetal para uso no controle de contaminação nas usinas.

3 REVISÃO

3.1 Etanol

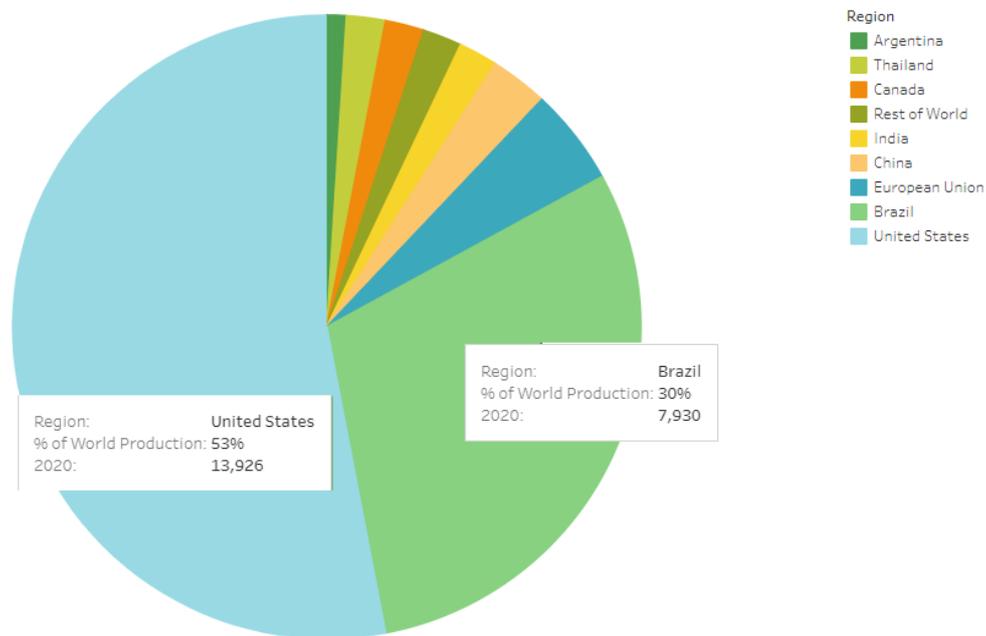
Em razão aos efeitos das alterações climáticas e da volatilidade dos compostos oriundos do petróleo, os países do mundo estão, cada vez mais, admitindo políticas para promover o uso de fontes renováveis de energia (ROBERTSON *et al.*, 2008). O etanol destaca-se como um biocombustível de referência, por ser uma das alternativas mais viáveis e sua produção ser baseada em uma comprovada plataforma tecnológica.

No etanol produzido a base de cana-de-açúcar, o CO₂ liberado no processo é reabsorvido através da fotossíntese durante o crescimento celular da planta, resultando em uma emissão muito pequena de gases de efeito estufa. Do bagaço é proveniente toda energia (eletricidade) gasta durante a produção de etanol (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008). Segundo Hira e Oliveira (2009) muitos países adotam o sistema brasileiro afim de diminuir a dependência pelo petróleo. Os países interessados em produzir bioetanol demonstram interesse nos parâmetros e no progresso do sistema brasileiro de etanol.

O setor sucroenergético tem exibido uma grande expansão de desenvolvimento em vários estados brasileiros, no Estado de Mato Grosso do Sul, ocorre em grande parte por apresentar uma grande área territorial e, além disso, por possuir clima e solo propícios para o cultivo da cana-de-açúcar. O Brasil ocupa o 1º lugar no ranking mundial de produção de café, cana-de-açúcar, soja e laranja considera-se que este cenário está intimamente ligado a abertura de mercados internacionais através de acordos buscando negociações e potencializando exportações (FAMASUL, 2021).

A produção mundial de etanol está concentrada nos Estados Unidos (53%) que são também os maiores exportadores do produto. O segundo maior produtor mundial de etanol é o Brasil representando 30%, deste quase totalmente de cana-de-açúcar, ainda que nas últimas safras observou-se um crescimento considerável na utilização do milho para produção de etanol, principalmente na região Centro-Oeste (VIDAL, 2020).

Gráfico 1 - Produção Mundial de Etanol Combustível por país, destacando-se os dois maiores produtores mundiais.



Fonte: RFA - Renewable Fuels Association (2020).

3.2 Fermentação alcoólica

A fermentação, em termos bioquímicos, é um processo de catabolismo anaeróbico em que há a degradação de moléculas de açúcar (processo chamado de catálise enzimática), no interior das células de microrganismos (leveduras), até a formação de etanol e gás carbônico (CO₂), havendo liberação de energia química e térmica (BASTOS, 2010). Simultaneamente, durante a fermentação alcoólica é formada uma ampla variedade de coprodutos em baixas concentrações, como por exemplo, alguns ácidos voláteis e ésteres, que podem ser controlados através das condições operacionais.

De acordo com Rodman e Gerogiorgis (2016) que estudaram a otimização do processo da fermentação de cerveja via simulação dinâmica, “a fermentação é o processo no qual a levedura é introduzida em uma dorna com um mosto rico em açúcar e condições ideais para o desenvolvimento microbiano”.

Na produção de álcool no Brasil, utiliza-se a sacarose proveniente da cana-de-açúcar, na forma de caldo de cana ou melaço, como substrato para a fermentação

(BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). A cana-de-açúcar apresenta vantagem em sua utilização, devido sua ação simbiótica e fixação de nitrogênio por microrganismos, permitindo que este sistema produza oito vezes (8x) mais energia (GOLDEMBERG, 2007; ROBERTSON *et al.*, 2008).

A maior parte da produção industrial de álcool em grande escala, no Brasil, ocorre em processos fermentativos denominados de batelada alimentada (AMORIM *et al.*, 2011). Durante esses processos, as leveduras passam por diversas formas de estresses (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). O ambiente de fermentação é complexo, principalmente em processos que utilizam o caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima. Nesse sistema, ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de *S. cerevisiae* no mosto de fermentação. No processo fermentativo, quando o fermento original é substituído por linhagens selvagens, as cepas selvagens podem se tornar mais adaptadas ao processo. Em alguns casos, o fermento original é completamente substituído por linhagens selvagens de *S. cerevisiae* (SILVA-FILHO *et al.*, 2005).

3.3 Levedura de processo fermentativo

As leveduras são os microrganismos empregados para a obtenção de etanol por via fermentativa. As mais utilizadas na fabricação de bebidas alcoólicas e combustíveis geralmente são das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* (VENTURINI FILHO, 2005). A *S. cerevisiae* é amplamente utilizada na produção comercial de etanol, onde a sacarose é hidrolisada pela levedura em glicose e frutose, duas hexoses com alto rendimento fermentativo (TIBAYRENC *et al.*, 2010). Para gerar ATP que é uma fonte de energia necessária para seu desenvolvimento, crescimento e multiplicação, a levedura transforma anaerobicamente o carboidrato (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

A capacidade da levedura em converter açúcar em etanol, depende de fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos) e microbiológicos (linhagens, espécies e concentração de leveduras). Tudo isso deve ser controlado no processo, afim de não prejudicar o rendimento da fermentação (CAETANO; MADALENO, 2011).

De acordo com Andrietta, Andrietta e Rodrigues (1997), devido a evolução nas técnicas de identificação de leveduras verificou-se que as leveduras presentes nas dornas de fermentação alcoólica são as leveduras chamadas “selvagens” e que na maior parte das vezes não acarretam problemas ao processo. Essas leveduras são microrganismos que habitam naturalmente a cana-de-açúcar e, portanto, são habituadas ao substrato de alimentação da dorna. Por fim, dentre todas as leveduras só sobrevivem as aptas a viver no ambiente de fermentação.

3.3.1 Reprodução

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As *S. cerevisiae*, são leveduras unicelulares com 2 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura muito utilizadas no processo de produção do etanol. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, após a união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (filha) (PELCZAR, 2005).

A célula de levedura possui divisões que se adequam para uma melhor atividade metabólica. Para se beneficiar dessa habilidade, deve-se buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, com ênfase na maior eficiência para produção de etanol. Em meios com pH baixo, por exemplo, ocorre uma redução na produção de glicerol, subproduto importante para o crescimento celular e para a fermentação alcoólica com *S. Cerevisiae*, podendo afetar o crescimento da levedura, reduzindo assim a eficácia do processo (JOHNSON; ECHAVARRI-ERASUN, 2011).

3.4 Contaminação bacteriana

As fermentações industriais estão sujeitas a contaminação por bactérias e leveduras selvagens (espécies *Saccharomyces* ou não). A entrada de microrganismos contaminantes no processo gera uma competição com as cepas de leveduras selecionadas, isto ocorre devido a reciclagem sucessiva de toneladas de células de levedura todos os dias e as dificuldades para esterilizar grandes volumes de caldo fermentativo (AMORIM *et al.*, 2011).

Esses microrganismos contaminantes desenvolvem diferentes estratégias de sobrevivência e competição nos processos de fermentação alcoólica. A contaminação bacteriana nesses processos mostra-se predominantemente Gram-positiva (98,5%), e os gêneros mais frequentes são os *Lactobacillus* e *Bacillus*. A presença dessas bactérias e a acidez do meio provocam uma redução na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* (ALCARDE; HORII; NOBRE, 2007). Já as espécies Gram-negativas são menos frequentes, pois são mais difíceis de controlar (LUCENA *et al.*, 2010).

As populações bacterianas são controladas com tratamento ácido, antibióticos, produtos de lúpulo e biocidas químicos que não afetam as células de levedura (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). No entanto, um grande problema são as bactérias resistentes a estes compostos, o que torna difícil o controle durante o processo de reciclo. Em alguns casos, a contaminação causa prejuízos consideráveis exercendo efeito sobre o rendimento da fermentação.

Quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, duas moléculas de álcool deixaram de ser produzidas pela levedura, assim ocorre a redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias lácticas. Além disso, a floculação é outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes, podendo ocasionar a redução na velocidade da fermentação, gerando inapropriações, como entupimento de tubulações, dificuldades no tratamento ácido do creme de levedura, aumento de fundo de dorna, além de reduzir a eficiência das centrífugas e dos antimicrobianos utilizados (BASÍLIO *et al.*, 2008).

3.5 Antibióticos

Os antibióticos podem ser sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, e tem como função matar um microrganismo (microbicida) ou impedir seu crescimento e reprodução (SINGLETON; SAINSBURY, 2006).

Nas décadas de 50 e 60 foram realizados vários estudos sobre a utilização da penicilina, como desinfetante industrial na fermentação alcoólica em mosto de cana-de-açúcar. Segundo Guilfoile (2007) vários outros antibióticos foram desenvolvidos, cada um com atuação em diferentes rotas. A reprodução celular desses microrganismos acontece muito rápido, dessa forma uma bactéria resistente surgindo em meio a tantas outras suscetíveis a ação do antibiótico, pode gerar milhões de

bactérias resistentes em pouco tempo, causando alteração do equilíbrio natural da microbiota presente na linha de produção.

Na indústria do etanol, a aplicação de antibióticos para o controle microbiano é bem comum. Os mais utilizados na fermentação alcoólica são a penicilina, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, virginiamicina e monensina. O desempenho desses antibióticos é estudado há anos, de modo a avaliar e quantificar sua atuação frente a esse setor (BAYROCK; THOMAS; INGLEDEW, 2003).

Estudos com extratos vegetais de plantas são relatados na literatura como promissores, pois são portadores de moléculas bioativas e podem ser empregados como antimicrobianos. Porém, muitos destes estudos são conduzidos com espécies de microrganismos causadores de doenças ou contaminação em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (OLIVEIRA *et al.*, 2007; RATH; PADHY, 2014).

3.6 Extrato vegetal, vassourinha *Baccharis dracunculifolia*

O gênero *Baccharis*, é o grupo sistemático mais numeroso da classe das angiospermas, pertencente à família Asteraceae, compreendendo cerca de 25.000 espécies. Aproximadamente 500 espécies desse gênero estão distribuídas no continente americano, das quais 120 espécies ocorrem no Brasil, onde tem o Cerrado brasileiro como uma das áreas mais ricas em espécies do gênero *Baccharis* (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Baccharis dracunculifolia DC é popularmente conhecida como “vassourinha”, “alecrim do campo” ou “alecrim de vassoura” e ocorre naturalmente no Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai e na Bolívia. No Brasil, esta espécie é um arbusto lenhoso, que ocorre principalmente nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul (Fotografia 1). Este gênero possui muitas espécies estudadas do ponto de vista fitoquímico, porém, poucas possuem estudos completos (AZEVEDO; SILVA, 2006; REFLORA, 2020).

Fotografia 1- Vassourinha, *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: Plantas que curam, 2013.

Segundo Kumazawa *et al.* (2003), a *B. dracunculifolia* é considerada a fonte botânica mais importante de própolis do Sudeste Brasileiro, conhecido por sua cor como “própolis verde”.

Ferronato *et al.* (2007) descreveu que, o óleo essencial de *B. dracunculifolia* possui atividade antibacteriana com capacidade de inibição de microrganismos cariogênicos como *Streptococcus mutans* (ATCC 2575); *S. sobrinus* (ATCC 27607); *S. sanguis* (ATCC 10557) e *Lactobacillus casei* (ATCC 4646).

Esta planta possui vários compostos químicos como flavonoides e ácidos fenólicos (ALENCAR *et al.*, 2005). Em vários estudos relatam sua capacidade de inibição frente a bactérias, relevante para diversas áreas, pois os extratos de plantas como esta são fontes de compostos com propriedades antimicrobianas. (OGBOLE; SEGUN; FASINU, 2018).

4 JUSTIFICATIVA DE ESTUDO

Devido a frequente contaminação por bactérias ou linhagens de leveduras *Saccharomyces* nos processos fermentativos de indústrias sucoenergéticas, percebe-se a falta de condições assépticas. Devido ao reciclo de células de leveduras no processo com intuito de aumentar a produtividade pode-se também reciclar as bactérias contaminantes. No processo fermentativo, as contaminações bacterianas, tem como origem o transporte da matéria-prima (cana-de-açúcar) do campo até a indústria, envolvendo desde os processos de corte até o armazenamento. A utilização de antibióticos nesses casos é focada para diminuir as contaminações, entretanto, as bactérias contaminantes do processo estão se tornando cada vez mais resistentes, tornando-se um problema não só para o processo, mas também para o meio ambiente, devido ao descarte em locais inapropriados desses antibióticos. Diante disso, diversas técnicas foram criadas e estão sendo utilizadas para o controle bacteriano, como por exemplo, a utilização de extratos de plantas com funções antibacteriana, de forma a favorecer o processo de fermentação alcoólica com atuação das leveduras, sem grandes prejuízos.

5 METODOLOGIA

5.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), na cidade de Dourados, Estado do Mato Grosso do Sul no período de fevereiro a setembro de 2020.

5.2 Material vegetal

Foram utilizadas folhas jovens da planta *Baccharis dracunculifolia* coletadas pela manhã as margens da Rodovia Dourados/Itahum, caminho para a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) como pode ser observado na Fotografia 2.

Fotografia 2 - Material coletado e esterilizado a ser desidratado



Fonte: O autor.

5.3 Preparação de extratos

Foram preparados chás quentes e à frio da folha seca da planta *B. dracunculifolia* com atividade antimicrobiana. Primeiramente as folhas foram separadas dos ramos, lavadas, esterilizadas com hipoclorito (solução diluída) e secas em estufa de circulação e renovação de ar, com temperatura média de 40 °C, por 48 h. Depois de secas, pesou-se em balança analítica a massa seca das folhas em uma proporção de 25 g da folha da planta para cada 250 mL de água destilada (para cada método). O chá a frio ficou 3 dias na geladeira a (8 ± 1 °C), após isso foi filtrado em papel de filtro comum previamente tarado para eliminação dos sólidos residuais. O preparo do chá a quente foi realizado pelo método de infusão, onde um volume de 250 mL de água quente (79 ± 2 °C) foi adicionado a 25 g das folhas secas em Béquer e imediatamente foi tampado utilizando-se um vidro de relógio. Após isso, o chá foi mantido em bancada de laboratório (temperatura ambiente de 25 ± 2 °C) por 10 minutos e realizou-se a filtração em papel filtro comum previamente tarado. Em ambos os casos, os extratos brutos a quente e a frio obtidos foram imediatamente congelados

em recipientes menores a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e levados para serem liofilizados em laboratório da FCA (conforme NISHIYAMA *et al.*, 2010).

5.4 Preparo das diluições do extrato

Depois de liofilizado, o extrato foi pesado para realizar as diluições. As concentrações empregadas no teste de atividade antimicrobiana foram $0,1\text{ mgxmL}^{-1}$, $0,25\text{ mgxmL}^{-1}$, e $0,5\text{ mgxmL}^{-1}$ dispostas em Eppendorfs. Para preparar as soluções que foram utilizadas nos testes de difusão utilizou-se água destilada esterilizada.

5.5 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram meios nutritivos que permitem o crescimento dos microrganismos. Para as bactérias foi utilizado caldo MRS e caldo MacConkey e para a levedura YEPD, autoclavados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 atmosfera por 20 min.

5.6 Material microbiano

Para teste de eficiência no controle de contaminação foi utilizada uma bactéria isolada, como contaminante frequente do processo industrial de fermentação alcoólica, na usina São Fernando, pelo Centro de Pesquisa e Tecnologia em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. O isolado foi identificado até o nível de gênero por método molecular de análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S, no laboratório Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP - Bactéria teste (Apêndice 1).

Como controle, foram utilizadas a bactéria Gram-positiva *Stafilococcus aureus* (ATCC 25923) e a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922). A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* Pedra-2 (PE-2).

Tais isolados integram o Laboratório de Biotecnologia Aplicada do campus da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), onde estavam mantidas em banco estoque congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7 Manutenção dos microorganismos

As bactérias foram cultivadas em meios diferentes, utilizou-se o caldo MRS (meio de cultura seletivo) para o *Bacillus sp.* e o caldo MacConkey para *S. aureus* e *E. coli*. Para cada 100 mL de meio preparado, transferiu-se 1 ml de suspensão bacteriana em cada frasco, e incubou-se a 42°C por 48 horas. A levedura foi cultivada em YPD (Yeast Extract Pepton Dextrose) contendo 1% de peptona e extrato de levedo, e 2% de glicose.

5.8 Ativação das bactérias

Realizou-se a ativação das bactérias em caldo BHI (suspensão em meio líquido) com os inóculos bacterianos e colocou-se os tubos na estufa a 35 °C por 24 horas. Após isso realizou a diluição em salina 0,5 % e fez-se a padronização para obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, isso significa que há aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) x mL⁻¹ com a escala de McFarland.

5.9 Ativação da levedura

A levedura (0,10 g) foi previamente ativada em meio líquido YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) contendo 1% de peptona e extrato de levedo, e 2% de glicose. Após isso, foi incubada em Shaker a 30 °C por 10 horas.

5.10 Teste de difusão em ágar

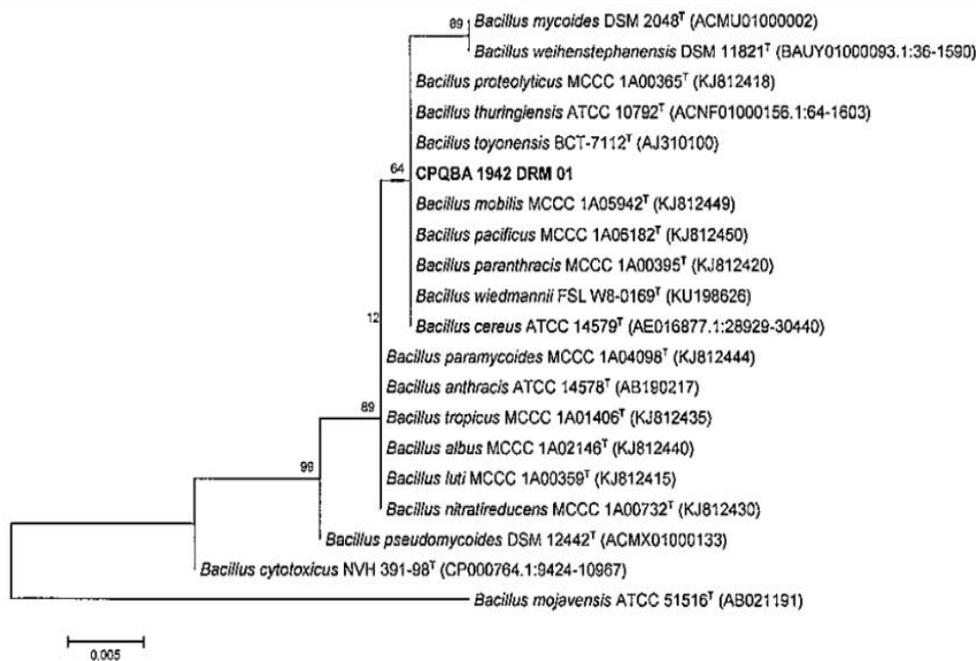
A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela metodologia de difusão em disco, utilizando-se discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, para conhecer o perfil de atividade do extrato. As bactérias avaliadas foram *Bacillus cereus* e *S. aureus* (Gram-positivas), e *E. coli* (Gram-negativa), e também a levedura *S.*

cerevisiae PE-2. Foram utilizados 25 mL de meio sólido (Ágar Mueller-Hinton para as bactérias, e o YEPD para a levedura) em placa de Petri e espalhou-se uma suspensão do microrganismo teste com o auxílio de Swab ($1,5 \times 10^8$ UFCx mL^{-1} para bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC x mL^{-1} para leveduras) que foi determinada através de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland. Posteriormente, foram adicionados sobre as placas inoculadas 3 discos impregnados em 20 μL dos extratos a quente e à frio (um para cada concentração avaliada 0,1 mg x mL^{-1} , 0,25 mg x mL^{-1} e 0,50 mg x mL^{-1}). As placas foram incubadas a 36 °C por 24 h (bactérias) e a 28 °C por 48 h (levedura) (PROCOP *et al.*, 2017; ABREU; ONOFRE, 2010). Após este período foi realizada a leitura visual observando-se o halo de inibição de crescimento microbiano quantificado em mm com o auxílio de um paquímetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e como controle positivo, foi utilizado o antibiótico Cloranfenicol na concentração 30 $\mu\text{g}\times\text{mL}^{-1}$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação da espécie de bactéria contaminante utilizada neste estudo demonstrou que a espécie pertence ao gênero *Bacillus*, grupo Cereus e está relacionada geneticamente com as espécies *Bacillus toyonensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. proteolyticus* (Dendrograma 1, Apêndice 1). Identificada, esta linhagem, por ser o contaminante mais frequente na região, foi utilizada para os testes de sensibilidade ao extrato de *B. dracunculifolia*.

Dendrograma 1 - Análise de distância genética



Legenda: Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene RNA ribossômico 16S demonstrando a relação entre a amostra CPQBA 1942-19 DRM 01 e linhagens de microrganismos relacionados nas bases de dados RDP e GenBank.

Fonte: Apêndice 1, Laboratório do CPQBA (2019).

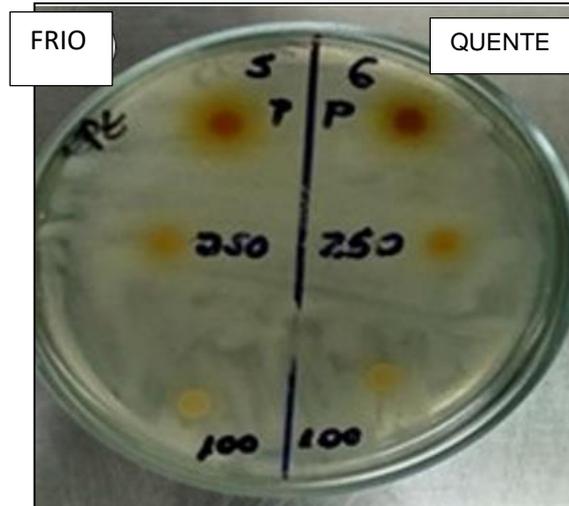
Na metodologia da difusão em disco os extratos à frio e a quente tiveram perfil de inibição diferentes, visto que o extrato de *B. dracunculifolia* na concentração de $0,50 \text{ mgx mL}^{-1}$ se mostrou com maior eficiência frente as bactérias testadas (os resultados estão expressos na Tabela 1), e eficaz para o estudo pois todas concentrações não inibiram a atividade da *S. Cerevisiae* PE-2, como pode-se observar na Fotografia 3.

Tabela 1 - Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo método de difusão em disco frente ao extrato de *Baccharis dracunculifolia*

<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Diâmetro do Halo (mm)							
	<i>Bacillus sp.</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
Concentração (mgx mL^{-1})								
Método de extração	Frio	Quente	Frio	Quente	Frio	Quente	Frio	Quente
0,10	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	10,0±0,1	14,0±0,2	0	0
0,50	18,0±0,1	20,0±0,2	10±0,1	12±0,3	17,0±0,3	18,0±0,2	0	0
Cloranfenicol	19,0 ± 0,1		19,5 ± 0,2		19,0 ± 0,1		0	

Fonte: O Autor.

Fotografia 3 - Representa a ação do extrato aquoso da *B. dracunculifolia* à frio e a quente, observando-se que a levedura PE-2 não apresenta sensibilidade frente aos extratos.



Fonte: O autor.

Realizando-se um comparativo com o estudo desenvolvido por Bonin *et al.* (2020), onde foi utilizado extratos aquoso, metanólico e etanólico em duas concentrações diferentes. Foram avaliados em *B. subtilis*, *S. aureus* e *Salmonella* enterica, mostrando que o extrato etanólico foi considerado o mais eficaz, seguido pelo metanólico e extratos aquosos (SCAVO *et al.*, 2019). Além disso, todos os extratos nas concentrações mais altas (1,002 e 0,837 mgxmL⁻¹) foram capazes de inibir o crescimento de espécies Gram-positivas, mas não teve efeitos sobre as bactérias Gram-negativas. Esses efeitos podem ser atribuídos à atividade de compostos antioxidantes (CASAGRANDE *et al.*, 2018).

No presente estudo, o extrato da *B. dracunculifolia* apresentou ótimos resultados, tanto com bactérias Gram-positivas ou Gram-negativa, esta diferença pode estar relacionada as menores concentrações utilizadas e aos métodos de extração à frio e a quente. Conforme descrito por Rasheed *et al.* (2018), a escolha do método de extração constitui uma das etapas mais importantes para a obtenção de um extrato rico em metabólitos bioativos, na extração a frio preserva-se compostos antioxidantes, enquanto na extração a quente, resulta-se em uma eficiência de extração de alguns ácidos que possuem a ação de proteção da planta.

Realizando uma análise mais detalhada das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus sp.*) percebe-se que o extrato só apresentou atividade frente a concentração de 0,50 mg x mL⁻¹ comparando os dois métodos. Já com a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) observa-se uma ação nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg x mL⁻¹.

Os melhores resultados obtidos com o experimento foram com a extração a quente na concentração de $0,5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ com o *Bacillus sp.* $20,0 \pm 0,2 \text{ mm}$, *S. aureus* $12 \pm 0,3 \text{ mm}$ e com a *E. coli* $18,0 \pm 0,2 \text{ mm}$. Desses valores, o mais expressivo foi com o *Bacillus sp.* onde sugere que o extrato teria um grande potencial para sua utilização em indústrias sucroenergéticas, porém necessita-se de estudos mais aprofundados para ter a confirmação de seu uso em escala industrial verificando custos a médio e longo prazo.

7 CONCLUSÃO

O teste de difusão em disco mostrou que o extrato aquoso das folhas de *B. dracunculifolia* apresenta atividade antibacteriana frente as cepas de *Bacillus sp.*, *E. coli* e *S. aureus* na concentração mais elevada de $0,50 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ através do processo de extração a quente. Este extrato é uma boa alternativa a ser utilizada pois não apresentou inibição em relação a levedura *S. Cerevisiae* PE-2.

O uso dessa planta pode constituir-se uma alternativa sustentável para o tratamento antimicrobiano podendo substituir os antibióticos convencionais. Porém estudos mais aprofundados devem ser realizados para avaliar sua acessibilidade e viabilidade perante os processos de fermentação industrial.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. A. P. de; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* D. C. (ASTERACEAE). **SaBios - Revista de Saúde e Biologia**, v.5, p.1-6, jul. /dez, 2010.
- ALCARDE, A. R.; HORII, J.; NOBRE, T. P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.27, n.1, p. 20-25, 2007.
- ALENCAR, S. M. D.; AGUIAR, C. L. D.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the States of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: Ingledew WM, Kelsall DR, Austin GD, Kluhspies C (eds) *The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries*. **Nottingham University Press**, v. 1, p. 39–46, 2009.
- 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**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.15, n.6, p.32-35, 1997.
- AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**,20(1): p.185-194, 2006.
- BASÍLIO, A. C.; DE ARAÚJO, P. R.; DE MORAIS, J. O.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, M. A.; DA, JR. S. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol**, v.56, p. 322–326, 2008.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Santos Bernardes, M. A- Biofuel Production- Recent Developments and Prospects. **InTech**, cap. 5, p. 85-100, 2011. DOI: 10.5772/17047.

BASTOS, R. G. Tecnologia das Fermentações: fundamentos de bioprocessos. **Editora EdUFSCcar**, 1ª ed., p. 162, 2010.

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 Biotechnology**, vol. 62, p. 498-502, 2003.

BONIN, E.; CARVALHO, V. M.; AVILA, V. D.; APARECIDA DOS SANTOS, N. C.; BENASSI-ZANQUETA, É.; CONTRERAS LANCHEROS, C. A.; SANTOS PREVIDELLI, I. T.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALVES DE ABREU FILHO, B.; NUNES DO PRADO, I. *Baccharis dracunculifolia*: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **LWT**, v. 120, p. 108-920, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108920>

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

CANCELLI, R. R.; EVADT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição a Morfologia Polínica da Família Asteraceae Martinov no Rio Grande do SUL- RS. **Pesquisas Botânica**, n.58, p.347-374, 2007.

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J. WAGNER JÚNIOR, A.; BUSSO, C.; WOUK, J.; IURCKEVICZ, G.; MONTANHER, P. F.; YAMASHITA, F.; MANECKMALFATTI, C. R. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 207-219, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.088>.

FAMASUL. Acordos Internacionais e Oportunidades para o MS. 2021. **Federação da agricultura e pecuária- Mato Grosso do Sul**. Disponível em: <https://portal.sistemafamasul.com.br/artigos/acordos-internacionais-e-oportunidades-para-o-ms>. Acesso em: 02 de novembro de 2021.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200016>

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v.315, p.808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086 – 2097, 2008.

GUILFOILE, P. G. Antibiotic-Resistant Bacteria. **Chelsea House Publishers**. 1^a ed, p. 10-37, 2007.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, p.2450 – 2456, 2009.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Chapter 3 - Yeast Biotechnology. **Elsevier**, The Yeasts- 5^a Ed., p. 21-44, 2011.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; AKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**,v.51, p.740-742, 2003. DOI: 10.1248/cpb.51.740

LEMOS, M.; BARROS, M. P. de; BARRETO, J.P; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, p.603-608, 2007.

LUCENA, B. T.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; DE MORAIS, M. A. JR. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v.10, p. 298, 2010.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 14, n. 4, p. 350-357, 1992.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; ONKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, JUN-ICHI; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v.1, p.1452-1454, 2003.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactocilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 581-584, 2004.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; DA COSTA, A. M.; DE SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Food Science and Technology [online]**, v. 30, p.191-196, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000500029>. Acesso em: 01 de novembro de 2021.

OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; FASINU, P. S. Antimicrobial and antiprotozoal activities of twenty-four Nigerian medicinal plant extracts. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 240-246, 2018.

OLIVEIRA, D. F.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S.; CARVALHO, H. W. P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v.78, p. 142–145, 2007.

PAULINO, N; ABREU, S. R. L; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.067>

PELCZAR, MICHAEL. Microbiologia - Conceitos e Aplicações. **Editora: Makron Books**, 2ª ed., v. 2, 2005.

PLANTAS QUE CURAM. Alecrim-do-campo. 2013. Disponível em: <http://www.plantasquecuram.blogspot.com/2013/08/alecrim-do-campo.html>. Acesso em: 09 de novembro de 2021.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L.; HALL, G. S.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. CHAPTER 17: Antimicrobial susceptibility testing. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7.ed. **Jones & Bartlett Learning**, Burlington, MA - p.1074 -1171, 2017.

RASHEED, D. M.; PORZEL, A.; FROLOV, A.; EL SEEDI, H. R.; WESSJOHANN, L. A.; FARAG, M. A. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for α -glucosidase inhibition. **Food Chemistry**, v. 250, p. 236-244, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.020

RATH, S.; PADHY, R. N. Monitoring in vitro antibacterial efficacy of 26 indian spices against multidrug resistant urinary tract infecting bacteria. **Integrative Medicine Research**, v. 3, p. 133-141, 2014.

REFLORA. *Baccharis* in Flora do Brasil em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB5151>. Acesso em: 02 de novembro de 2021.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. World Fuel Ethanol Production by Region. **Annual Ethanol Production- U.S. and World Ethanol Production**, 2020. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

ROBERTSON, G. P.; DALE, V. H.; DOERING, O. C.; HAMBURG, S. P.; MELILLO, J. M.; WANDER, M. M.; PARTON, W. J.; ADLER, P. R.; BARNEY, J. R.; CRUZE, R. M.; DUKE, C. S.; FEARNSIDE, P. M.; FOLLETT, R. F.; GIBBS, H. K.; GOLDEMBERG, J.; MLADENOFF, D. J.; OJIMA, D.; PALMER, M. W.; SHARPLEY, A.; WALLACE, L.; WEATHERS, K. C.; WIENS, J. A.; WILHELM, W. W. Sustainable biofuels redux. **Science, Agriculture**, v.322, p.49-50, 2008. DOI: 10.1126/science.1161525

RODMAN, A. D.; GEROGIORGIS, D. I. Multi-objective process optimisation of beer fermentation via dynamic simulation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 255- 274, 2016.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, 13^a Ed., v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SCAVO, A., PANDINO, G., RESTUCCIA, C., PARAFATI, L., CIRVILLERI, G., MAUROMICALE, G. Antimicrobial activity of cultivated cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *altilis* DC.) leaf extracts against bacterial species of agricultural and food interest. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 206-211, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.005>.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; MORAIS. J. O. F.; MORAIS. Jr. M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics on industrial fuel ethanol fermentation processes assessed by PCR fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.88, p.13-23, 2005.

SINGLETON, P.; SAINSBURY, D. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. **John Wiley & Sons Ltd.**, 3ª ed., p.39, 2006.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 401-408, 2004.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 819-828, 2001.

TIBAYRENC, P.; PREZIOSI-BELLOY, L.; ROGER, J -M.; GHOMMIDH, C. Assessing yeast viability from cell size measurements. **Journal of Biotechnology**, v. 149(1–2): p. 74–80, 2010. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.06.019

VENTURINI FILHO, W.G. Tecnologia de bebidas. **Editora Blucher**, p. 525, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VIDAL, FATIMA. Produção e Mercado de Etanol. Banco do Nordeste, caderno setorial Etene, nº 121, 2020.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.

APÊNDICE 1

Metodologia utilizada pelo laboratório CPQBA:

Repique das amostras. A mesma recebida foi repicada em placa de Petri contendo meio de cultura apropriado.

Extração do DNA genômico. O DNA genômico da cultura foi obtido utilizando o protocolo baseado na extração com fenol (AAMIR *et al.*, 2015).

Amplificação do gene RNA ribossomal (RNAr) 16S. A amplificação parcial do gene RNAr 16S da cultura foi realizada pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram 10f e 1100r.

Sequenciamento. O produto da amplificação foi purificado em coluna (GFX PCR DNA *and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático AB13500XL Series (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram 10f e 1100r.

Análise de distância genética. As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas com diferentes *primers* foram montadas em *contig* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas sequências de microrganismos relacionados ao microrganismo desconhecido para construção do dendrograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997) inserido no software BioEdit 7.2.6 (Hall, 1999) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendrograma a partir da distância calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção das distâncias genéticas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 reamostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

As colônias isoladas obtidas em cultivo apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica revelou a presença de bastonetes com coloração Gram-positiva.

Os fragmentos do gene RNAr 16S foram amplificados e sequenciados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras CPQBA 1942-19 DRM 01.

O dendrograma de distância genética construído a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra CPQBA 1942-19 DRM 01 esta apresentada no Dendrograma 1.

A sequência parcial do gene RNAr 16S obtidas para as amostras CPQBA 1942-19 DRM 01 esta apresentada no Anexo I.

Amostra	Descrição do Cliente	Identificação
CPQBA 1942-19 DRM 01	Amostra I	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn 1872)

Comentários:

A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra CPQBA 1942-19 DRM 01 apresentou 100% de similaridade com a sequência do gene RNA ribossomal 16S de várias linhagens de *Bacillus toyonensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. proteolyticus*, *B. pacificus* e *Bacillus* sp. contidos nas bases de dados consultados GenBank e RDP.

A análise filogenética (Dendrograma 1) recuperou a amostra CPQBA 1942-19 DRM 01 em um agrupamento com as linhagens tipo *Bacillus toyonensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. proteolyticus*, entre outras, não sendo possível a identificação em nível de espécies de *Bacillus*, as quais são filogeneticamente muito próximas entre si.

Estas bactérias são Gram-positivas, anaeróbicas facultativas e pertencem ao chamado grupo *Bacillus cereus*, Família Bacillaceae. Estas espécies apresentam características genotípicas e fenotípicas muito semelhantes, e ocasionalmente podem ser diferentes através de propriedades fisiológicas, bioquímicas, ou genes marcadores específicos, como o gene da DNA girasse, ou ainda *Multilocus Sequence Typing* (LIU *et al.*, 2017).

Com essa análise identificou-se a bactéria como *Bacillus* sp. Gram-positiva. Para identificar essas linhagens, foi gerado um dendrograma filogenético desse microrganismo, utilizando suas sequências gênicas específicas Dendrograma 1.

REFERÊNCIAS APÊNDICE 1

AAMIR, S.; SUTAR, S.; SINGH, S. K.; BAGHELA, A. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine** 5(2), 74–81, 2015. Doi 10.5943/ppq/5/2/6.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, series 41: 95–98, 1999.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotid sequences. **Jornal of Molecular Evolution**, 16: 111-120, 1980.

LIU, Y.; XING, Z.; YANG, H. Effect of biological soil crusts on microbial activity in soils of the Tengger Desert (China). **Journal of Arid Environments**, 144, 201–211, 2017. Doi 10.1016/j.jaridenv.2017.04.003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406–25, 1987.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30(12):2725–2729, 2013.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** (Online) 25: 4876-4882,1997.