



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS ARARAS/SP
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



AMANDA CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA

O USO DE EXTRATO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) NO CONTROLE DE
BACTÉRIAS DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA A PARTIR DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Araras/SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS ARARAS/SP
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



AMANDA CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA

O USO DE EXTRATO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) CONTRA
MICROORGANISMOS CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO DE ETANOL DE
CANA-DE-AÇÚCAR.

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura
em Ciências Biológicas – CCA – UFSCar
Orientador (a): Prof. Dr. Octavio Antonio
Valsechi

Araras/SP

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, essa entidade divina e onipotente, que esteve sempre em meus pensamentos e sempre me ajudando de sua maneira sábia quando ocorre qualquer problema ao longo de minha jornada.

Agradecer a minha família é imprescindível, mas gostaria de agradecer em especial a minha mãe. Mãe, sem você nada disso seria possível! A senhora é a maior apoiadora que eu poderia ter, nos momentos mais difíceis sua mão e suas palavras estavam ao meu lado me conduzindo.

Agradeço também ao Octavio e sua família, que me acolheram em sua casa e em suas vidas. Todos me apoiaram e se tornaram muito importantes.

Ao meu orientador Vico, que acreditou no meu potencial e me ajudou de diversas maneiras nessa jornada. Obrigada por me apoiar e me orientar por esse caminho.

Aos meus companheiros de laboratório, amigos que levarei por toda minha vida, me ajudaram em meio às dificuldades, assim como festejavam ao meu lado a cada obstáculo vencido nessa jornada.

Agradeço também às queridas Tina e Carol, não só companheiras do dia a dia no laboratório, mas pessoas únicas, sempre prontas a ajudar a todos.

À todos àqueles que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse concluído com sucesso, meu muito obrigada, eu não conseguiria isso sem a ajuda de vocês.

RESUMO

O processo fermentativo é uma importante etapa na produção de etanol, entretanto ao longo da produção podem ocorrer contaminações que influenciam diretamente na qualidade e quantidade de etanol produzida. O principal grupo de bactérias contaminantes na produção de etanol na fermentação são os *Lactobacillus*, eles podem comprometer a eficiência do processo, tornando necessário o uso de antibióticos. Diante deste cenário o presente trabalho objetivou avaliar a utilização do extrato de orégano (EO) como antibacteriano natural visando o controle desses microrganismos. O extrato de orégano foi produzido no laboratório em condições estéreis com 24 horas de antecedência ao seu uso. Ele foi aplicado em quatro concentrações, 400, 600, 800 e 1000 ppm. A partir destas concentrações avaliou-se o efeito do extrato em bactérias contaminantes, e leveduras, a partir da contagem do número de células iniciais e após a inoculação do extrato, comparando-o com o antibiótico comercial usado em usinas de açúcar e álcool. Para a realização do estudo, a fermentação ocorreu em seis horas. Os resultados revelaram que após a fermentação o extrato de orégano apresentou efeito de controle nas bactérias contaminantes. Na maior concentração testada (1000 ppm) o EO reduziu aproximadamente 73% da carga microbiana inicial. Desta maneira os resultados demonstraram que o extrato de orégano demonstrou ser promissor para o controle das bactérias contaminantes do processo de fermentação etanólica, assim como não comprometeu o desenvolvimento das leveduras fermentativas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Produção do extrato de orégano por infusão quente em ambiente estéril.....	17
FIGURA 2. Número médio de bactérias contaminantes no tempo zero e após 6 horas, nos tratamentos com extrato de orégano de 400 a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle.....	20
FIGURA 3. Número médio de bactérias contaminantes nos tratamentos com extrato de orégano de 400 a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle após 6 horas de fermentação.....	21
FIGURA 4. Crescimento de bactérias contaminantes em meio MRS, tratamento CONT, após 6 horas de fermentação.....	22
FIGURA 5. Crescimento de bactérias contaminantes em meio MRS, tratamento EO 1000 ppm, após 6 horas de fermentação	22
FIGURA 6. Número médio de leveduras com tratamentos de extrato de orégano de 400 ppm, 1000 ppm e o tratamento controle.	25
FIGURA 7. Contagem de leveduras em YEPD, tratamento 1000 ppm 10^{-4} , após 6 horas de fermentação.....	26
FIGURA 8. Contagem de leveduras em YEPD, tratamento CONT 10^{-4} , após 6 horas de fermentação	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Comparação entre contagem de 6 horas dos tratamentos com extrato de orégano de 400 ppm a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle pelo teste de Tukey.....22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Produção de etanol	9
2.2. Contaminantes da fermentação alcoólica	10
2.3. Contaminação por <i>Lactobacillus</i>	11
2.4. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	12
2.5. Extrato de orégano como antimicrobiano natural	13
2.6. Ação dos compostos do Timol e Carvacrol	14
3. OBJETIVO	16
3.1 Geral	16
3.2 Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODO	17
4.1. Extrato de Orégano	17
4.2. Amostra de bactérias contaminantes	17
4.3. Amostra de levedura	17
4.4. Teste de Sensibilidade	18
4.5. Preparo dos tubos para inoculação	18
4.6. Análise microbiológica	18
4.7. Análise estatística	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), desde o período colonial, exerce forte impacto na economia brasileira. Com a estimativa de uma produção de 685,4 milhões de toneladas em 2020, espera-se um aumento de 1,8% em relação ao ano anterior, tornando nossa produção a maior do mundo (IBGE, 2020). Essa matéria-prima é valiosa para economia devido a produção de etanol, açúcar, destilados, dentre outros produtos característicos da cultura brasileira. É comprovado que o uso da cana-de-açúcar na produção de etanol torna o processo um dos mais econômicos dentro da indústria, sendo produzido pela conversão de sacarose ou monossacarídeos em etanol no processo de fermentação, permitindo que nosso país chegue a produzir mais de 30 bilhões de litros de etanol por safra (ZABED *et al.*, 2014; PORTAL BRASIL, 2017).

No Brasil, a partir da década de 70, o forte incentivo ao uso do etanol como combustível automotivo, impulsionou o surgimento de novas tecnologias para conversão dos motores que até então funcionavam somente à gasolina. Entretanto, foi só no início da década de 80 que iniciou a produção de veículos movidos a álcool e que vem sendo produzidos até os dias atuais, incentivando a produção de etanol a base de cana-de-açúcar no país (SOUSA *et al.*, 2010).

Dada a importância da produção de etanol para a economia brasileira, estratégias para minimizar as perdas durante o processo tornam-se relevantes. Na etapa de fermentação, podem ocorrer contaminações por microrganismos que comprometem a qualidade e a quantidade de etanol que é produzido. Dentre os microrganismos deteriorantes estão os pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, com maior incidência do *L. fermentum* (VASECHI, 2005). Com essa constante contaminação que compromete a produção de etanol, a indústria utiliza antimicrobianos para controlar e eliminar esses microrganismos, e os antibióticos mais utilizados atualmente são a base do princípio ativo da monensina.

A monensina é um composto químico produzido pelo fungo *Streptomyces cinnamomensis*. Pode ser usado na indústria veterinária na forma de antibiótico ionóforo, como também no setor sucroalcooleiro como antibiótico no controle de bactérias contaminantes. Por exemplo, a monensina sódica que apresenta excelente ação frente bactérias gram-positivas nas dornas de fermentação alcoólica (NOGUEIRA *et al.*, 2009; RODERO *et al.*, 2016).

Com a crescente demanda por produtos orgânicos também houve um crescimento nos estudos buscando antimicrobianos naturais, a base de plantas, óleos essenciais e em alguns

casos extratos de ervas para substituição desses agentes químicos. Os estudos demonstram a ação de antibióticos naturais em uma significativa variedade de produtos, visando o controle tanto de microrganismos patogênicos quanto deteriorantes (ORAL *et al.*, 2010; MACRI *et al.*, 2014; MARCIAL *et al.*, 2016).

Dentre as ervas conhecidas com atividade antibacteriana está o orégano (*Origanum vulgare*), uma planta comumente usada na alimentação. Entretanto, diversos trabalhos demonstram que o orégano pode apresentar efeito antibacteriano e antioxidante quando usado para produzir óleos essenciais e também extratos. Isso ocorre devido ao alto percentual de Carvacrol e Timol presente tanto no óleo essencial, como no extrato de orégano (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Essas substâncias são responsáveis por afetarem diretamente a membrana celular dos microrganismos, provocando a lise da célula e assim comprometendo a proliferação celular das bactérias (BURT, 2004).

Devido às características antimicrobianas do orégano, o presente trabalho consistiu em avaliar o potencial antimicrobiano do extrato de orégano no mosto do processo de fermentação na produção de etanol como uma alternativa ao uso de antibióticos convencionais na indústria do etanol, comparando ainda sua ação com o antibacteriano comumente utilizado na indústria sucroalcooleira, para avaliar se o extrato seria uma alternativa viável na indústria de etanol natural.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. Produção de etanol

A cana-de-açúcar, de nome científico *Saccharum officinarum*, oriunda de regiões quentes e tropicais está presente no Brasil desde o período colonial quando o produto era de grande valor comercial, sendo exportado para Europa, ilhas do Atlântico e para o Oriente. (PRADO JUNIOR, 1970; CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2008). Ela é matéria prima de produtos que vão desde a área alimentícia, destilados, produção de etanol e mais recentemente na geração de energia como a bioeletricidade (SOUSA *et al.*, 2010).

Com o aumento da demanda energética, muitos países buscam alternativas ao uso de energias fósseis, visto que o combustível fóssil contribui com o aumento de CO₂ na atmosfera. Como alternativa de combustíveis que apresentam redução na emissão de CO₂ quando comparado com os combustíveis convencionais são biodiesel, biogás e o etanol (WBA, 2013; WWF, 2020).

Apesar de já existir o incentivo ao uso do etanol e apoio para o surgimento de novas tecnologias, foi apenas no início da década de 80 que o Brasil começou a produzir veículos movidos a álcool, os quais vem sendo produzidos até os dias atuais, incentivando a produção de etanol a base de cana-de-açúcar no país (SOUSA *et al.*, 2010).

O etanol produzido a partir da cana de açúcar é considerado o combustível com melhor capacidade de atender a característica de energia renovável que também apresenta uma boa relação custo/efetividade e é de baixo poder poluente. O etanol de 1ª geração emite 60% menos gases na queima quando comparado a gasolina, e ainda quando a queima ocorre em regiões próximas a plantações de cana parte desse CO₂ é absorvido pela planta (CORTEZ, 2010; FILHO *et al.*, 2013).

Outras características vantajosas da cana são as quantidades significativas de nutrientes orgânicos e minerais que possui, assim como açúcares livres, a sacarose, glicose e em menor quantidade frutose. Desse modo, ela se tornou a principal matéria-prima utilizada na indústria brasileira (WHEAL *et al.*, 1999). Quando comparado com a produção de etanol de milho nos Estados Unidos, o etanol proveniente da cana apresenta um custo significativamente inferior, além de que o subproduto do processo, o bagaço de cana, pode ser aproveitado para a produção de energia, somando mais vantagens ao processo (KOHLHEPP, 2010).

Na safra 2019/2020 o Brasil atingiu sua marca de maior produção de etanol em sua história, com 35,6 bilhões de litros produzidos. Desse total 34 bilhões corresponde a produção

de bioetanol a partir de cana-de-açúcar, um aumento de 5,1% em relação à safra anterior. Enquanto o etanol anidro de cana-de-açúcar que é misturado com 27% de gasolina apresentou um total de 10,1 bilhões de litros, 8,5% acima da produção 2018/2019 (CONAB, 2020). Esses dados demonstram que o Brasil é forte e continua crescendo nesse setor, e que com os avanços tecnológicos a indústria pode reduzir mais suas perdas e atingir números ainda mais expressivos.

2.2. Contaminantes da fermentação alcoólica

Na produção de etanol o microrganismo utilizado com maior eficiência na fermentação é a cepa *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 é específica para a indústria, escolhida devido a sua melhor eficiência na transformação de açúcar em álcool (KOSARIC *et al.*, 1995). Existem outras opções de microrganismos, todos se caracterizando por serem heterotróficos que necessitam de carbono e nitrogênio para sua proliferação e desenvolvimento. Entretanto, a escolha do microrganismo e das condições do meio afetarão diretamente no resultado do caldo de fermentação (ZABED *et al.*, 2014).

O processo de fermentação depende dessas condições específicas e ideais para que a *S. cerevisiae* tenha condições ótimas para se estabelecer e proliferar de maneira contínua no mosto (TOSETTO, 2008). Entretanto a produção de etanol, e conseqüentemente, o processo de fermentação, não ocorrem em condições estéreis, de modo que a contaminação do mosto é esperada (SKINNER & LEATHERS, 2004).

Esses microrganismos contaminantes podem surgir ao longo de todo o processo de produção, podendo comprometer diretamente a qualidade do etanol produzido. Essa contaminação pode ser proveniente de diversas fontes como o solo, os utensílios e equipamentos para o manuseio da cana-de-açúcar. (AMORIN *et al.*, 1996). A diversidade microbiana pode variar conforme o processo de produção avança, mas chama a atenção que o início do processo apresenta uma alta diversidade bacteriana, e que essa alta carga vai aumentando no decorrer das etapas seguintes do processo (COSTA *et al.*, 2014).

Essa carga microbiana naturalmente encontrada no caldo de cana durante a fermentação pode variar principalmente entre fungos e bactérias, pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium*, *Leuconostoc* produzindo ácidos orgânicos como butírico, acético, fórmico. Outras leveduras também podem contaminar o processo como a *Dekkera bruxellensis*. Recentemente também foram encontrados filos pertencentes ao domínio Archaea presentes no mosto misto. Entretanto um dos grupos de contaminantes mais importantes são as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, caracterizadas por produzir

ácido láctico e competir com as leveduras fermentadores no processo de fermentação (Valsechi, 2005; Beckner *et al.*, 2011; Caetano *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014).

O gênero é *Lactobacillus* é abundante no processo fermentativo, dentro do grupo temos *Lactobacillus plantarum*, *L. manihotivorans*, *L. fermentum*, *L. vini*, *L. ferintoshensis*, *L. diolivorans*, *L. nagelii*, entre outros ao longo de todo o processo (Lucena *et al.*, 2010). Sendo as espécies *L. plantarum* e *L. fermentum* muito prejudiciais às leveduras do processo (Basso *et al.*, 2014).

As contaminações podem interferir diretamente na produtividade do processo, provocando a inibição da atividade metabólica e viabilidade das leveduras, maior tempo de fermentação e interferindo também no rendimento final de álcool devido a degradação da sacarose para produção de ácidos orgânicos, o que pode acarretar na intoxicação das leveduras responsáveis pela fermentação (Chin *et al.*, 1994; Hynes *et al.*, 1997; Godoy, 2002; Ceballos-Schiavone, 2009). Valsechi (2005) cita em seu trabalho que a presença de contaminantes também podem influenciar a polarização e assim no controle químico, na viscosidade de produtos intermediários, perda de sacarose e ainda em problemas operacionais.

Além de todos esses microrganismos competirem pelo substrato, as bactérias também podem produzir metabólitos que além de inibir as leveduras, podem provocar floculação, provocando perda de rendimento no processo fermentativo (De Carvalho & Monteiro, 2011).

2.3. Contaminação por *Lactobacillus*

A contaminação por bactérias no mosto fermentativo na produção de etanol é amplamente conhecida pela indústria. Esse processo é bastante estudado para sanar problemas que a contaminação causa. Vários estudos demonstraram que há a coexistência de diferentes cepas bacterianas com diferentes metabolismos na fermentação, dentre elas as bactérias produtoras de ácido láctico, como o grupo pertencente ao gênero *Lactobacillus*, os mais abundantes no mosto (Basso *et al.*, 2014).

As bactérias *Lactobacillus* contaminantes podem se diferenciar em dois grupos por suas características metabólicas. Elas podem ser bactérias homofermentativas, vão transformar as hexoses em ácido láctico a partir da glicose, ou podem ser heterofermentativas, que produzem tanto ácido láctico, quanto etanol, acetato e dióxido de carbono a partir das hexoses fermentadas (Basso *et al.*, 2014).

Isso faz com que essas bactérias possam prejudicar a produção de etanol das mais variadas formas. As bactérias podem comprometer diretamente as leveduras do processo fermentativo, ao competir por substrato durante a fermentação. Isso implica num mosto caracterizado por uma concentração de frutose sempre superior ao de glicose, devido ao consumo da glicose pelos contaminantes. Como as leveduras recorrem a utilização de frutose em último caso a fermentação pode ser comprometida (BASSO *et al.*, 2014).

O ácido láctico produzido por essas bactérias pode também causar efeitos tóxicos nas leveduras, agindo diretamente no declínio da viabilidade das leveduras, além de também provocar a queda do nível de pH do mosto. Estudos relevam que ambos os grupos afetam negativamente o rendimento do etanol, e a presença de *Lactobacillus fermentum* chegou a reduzir em até 27% da produção total de etanol. Além desses problemas, também é possível que as bactérias lácticas influenciem a estrutura espacial da população microrganismos durante a fermentação (BISCHOFF *et al.*, 2009; BASSO *et al.*, 2014).

Com todos os prejuízos que as bactérias produtoras de ácido láctico representam na produção de etanol, principalmente as pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, esse grupo de contaminantes preocupa a indústria sucroalcooleira, obrigando-o a procurar alternativas para o controle, promovendo assim um processo de fermentação mais produtivo e conseqüentemente uma produção com alta rentabilidade e qualidade.

2.4. Orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano pertence à família *Lamiaceae*, com um total de 38 espécies pertencentes ao gênero *Origanum*. As espécies desse gênero têm a característica de crescer em encostos de rochas e em áreas montanhosas. Mais de 75% delas são encontradas no Mediterrâneo Oriental, assim como também podem ser encontrados em regiões da Europa e Ásia (ALIGIANNIS *et al.*, 2001; ŞAHIN *et al.*, 2004).

O orégano (*O. vulgare*) é uma especiaria comumente usada na culinária em todo o mundo, caracterizado por seu aroma e sabor, ou ainda na produção de cosméticos, na composição de produtos como hidratantes e perfumes. Entretanto, o uso dessa erva não se restringe apenas ao uso na gastronomia ou na indústria cosmética, o orégano também demonstrou interessantes características para sua aplicação medicinal. Diferentes pesquisas investigaram a atividade anti-inflamatória, anticâncer, citotóxica, antiproliferativa, antioxidante e antimicrobiana do orégano (KRUPPA & RUSSOMANNO, 2008; PEZZANI *et al.*, 2017).

Com um significativo volume de estudos pré-clínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstram o potencial do orégano como uma fonte de produtos naturais bioativos promissora. Há uma diversidade da aplicação do orégano tanto como óleo essencial, extratos ou compostos puros para o controle tanto de doenças preexistentes como contra agentes infecciosos (PEZZANI *et al.*, 2017).

2.5. Extrato de orégano como antimicrobiano natural

Historicamente o uso de plantas e remédios naturais são usados para sanar doenças. Com o desenvolvimento tecnológico a ciência passou a estudar o efeito desses produtos e como os compostos dessas plantas funcionavam e suas aplicações. Diversas indústrias passaram a se interessar pelos efeitos antimicrobianos e fúngicos desses produtos, aumentando os estudos do uso de diversas plantas, principalmente preparadas como extratos ou óleos essenciais, aplicados como antimicrobianos naturais (BURT, 2004; SHAN *et al.*, 2009).

Com a popularização do efeito secundário de algumas plantas e seus extratos diversas indústrias se interessaram em suas possíveis aplicações. Estudos demonstraram efeito dos extratos em pragas fitopatogênicas e controle de enfermidades, ou ainda na indústria alimentícia interessada no uso de extratos como antimicrobianos naturais, visando processos mais suaves e novas alternativas que possam substituir conservantes químicos. (BURT, 2004; BUSTAMANTE *et al.*, 2018).

Desse modo existe uma abundante quantidade de estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais com diferentes plantas, em diferentes processos contra microrganismos tanto patogênicos quanto deteriorantes. Alguns estudos avaliam a ação individual do extrato de uma planta ou a ação combinada de diferentes especiarias e plantas (SHAN *et al.*, 2009; MOSTAFA *et al.*, 2018; SOLAK, A. *et al.*, 2019).

Na composição do orégano (*Origanum vulgare*) há componentes, em diferentes concentrações, com propriedades antibacterianas como Carvacrol, Timol, Y-Terpineno e ρ -Cimeno. É comprovado que o óleo essencial de orégano atua na inibição dos microrganismos, agindo diretamente na membrana celular. O acúmulo dos compostos na bicamada lipídica causam desarranjo na função estrutural, penetram a célula e exercem atividade de inibição em seu citoplasma causando lise, resultando na baixa proliferação de microrganismos (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

A produção do extrato de orégano pode apresentar diferentes metodologias, utilizando apenas água em diferentes temperaturas ou ainda utilizando etanol para extrair os compostos

responsáveis por suas propriedades antibacterianas ou antioxidante. Dependendo do método utilizado o extrato pode apresentar variação de sua maior efetividade contra determinadas bactérias (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Radhakrishna *et al.*, (2014) relatam em seu trabalho o potencial do extrato de orégano no aumento da vida de prateleira de produtos cárneos e possível atividade antioxidante, devido aos compostos fenólicos presentes no orégano. Todos esses fatores contribuem para que o extrato de orégano também possa atuar controlando bactérias contaminantes na fermentação alcoólica.

2.6. Ação dos compostos do Timol e Carvacrol

Os óleo e extratos do orégano apresentam majoritariamente dois componentes conhecidos por sua ação antimicrobiana, o timol e o carvacrol. Diversos estudos demonstraram a ação dos extratos de orégano controlando determinados microrganismos deteriorantes e patógenos (BEVILACQUA *et al.*, 2012). Estruturalmente os dois compostos são semelhantes, se diferenciando apenas pela posição do grupo hidroxila no anel fenólico, mas ambos atuam tornando a membrana celular permeável (LAMBERT *et al.*, 2001).

Estudos que utilizaram o carvacrol contra *Bacillus cereus* demonstram que o composto interage diretamente com a membrana celular e atua dissolvendo a bicamada fosfolipídica, o que nos leva a presumir que ele se alinhe entre as cadeias de ácidos. Essa interferência na estrutura provoca a desestabilização da membrana aumentando a fluidez da membrana, aumentando a permeabilidade passiva. O carvacrol irá agir formando canais pela membrana da célula, ocorrendo a separação dos ácidos graxos dos fosfolipídeos e os íons saem do citoplasma (ULTEE *et al.*, 2000; ULTEE, 2000; ULTEE *et al.*, 2002).

O carvacrol e o timol também se mostraram eficazes contra bactérias gram-negativas, são capazes de desintegrar a membrana externa, liberando os lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática, afetando diretamente a célula bacteriana (HELANDER *et al.*, 1998). O timol mostra-se com maior eficácia em pHs baixos, nessa condição a molécula do composto é mais indissociada a caracterizando mais hidrofóbica, permitindo que o timol se ligue mais facilmente as áreas hidrofóbicas das proteínas e se dissolve com mais facilidade na fase lipídica (JUVEN *et al.*, 1994).

Esses compostos podem ainda atuar inibindo os efeitos dos contaminantes nos produtos, por exemplo o carvacrol que apresentou sucesso na interferência da produção de biofilmes por *Chromobacterium violaceum*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. O carvacrol pode ainda interferir na redução de motilidade em bactérias e em sua

virulência em determinadas concentrações (INAMUCO, *et al.*, 2012; VAN ALPHEN *et al.*, 2012). Ambos os compostos podem também inibir a produção de toxinas pelas bactérias, o carvacrol foi capaz de inibir a produção de toxina diarreica por *B. cereus* em caldos e sopas (ULTEE & SMID, 2001).

3. OBJETIVO

3.1 Geral

- A realização da pesquisa teve por objetivo analisar a ação antimicrobiana do extrato de orégano sobre bactérias contaminantes do mosto no processo de fermentação na produção de etanol.

3.2 Específicos

- Avaliar a ação antimicrobiana do extrato de orégano em bactérias lácticas, principalmente às pertencente ao gênero *Lactobacillus*.
- Identificação do percentual de extrato de orégano necessário para inativação dos microrganismos lácticos.
- Avaliar o efeito da aplicação do extrato em diferentes concentrações.
- Avaliação do comportamento da *S. cerevisiae* PE-2 na presença do extrato de orégano.
- Obter o extrato de orégano.
- Isolar as bactérias contaminantes do processo de fermentação etanólica.
- Comparação do extrato de orégano com o antimicrobiano comumente usado na indústria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extrato de Orégano

O extrato de orégano utilizado nos ensaios foi elaborado por meio de infusão segundo SILVA *et al.*, (2008). Foram adicionadas 100 gramas de folhas desidratadas de orégano em 500 mL de água destilada esterilizada. O orégano utilizado foi adquirido comercialmente desidratado em lotes fechados de 1kg. Então a solução foi aquecida a 100°C por 15 minutos e filtrada em papel filtro com poros de 14µm, com 24 horas de antecedência da realização dos testes. Foram utilizadas as seguintes concentrações de Extrato de Orégano (EO) 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm e 1000 ppm.

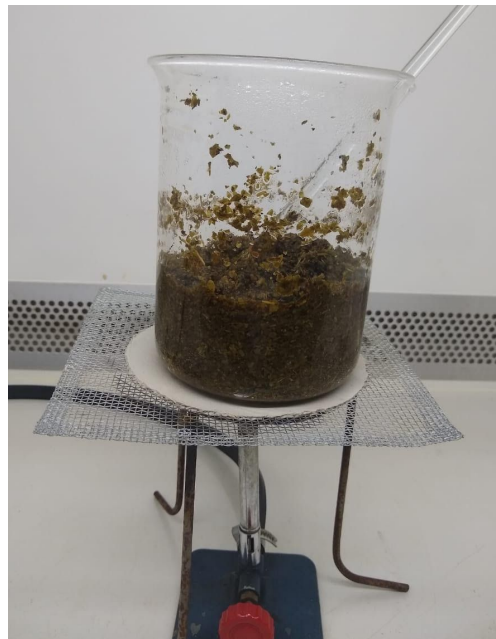


Figura 1. Produção do extrato de orégano por infusão quente em ambiente estéril

Fonte: Arquivo pessoal

4.2. Preparo do inóculo de bactérias contaminantes

O inóculo de bactérias foi preparado a partir de amostras de mosto fermentado coletado nas dornas de fermentação de uma unidade produtora de etanol. Em laboratório os microrganismos foram isolados em meio sintético ágar Man Rogosa & Sharpe (MRS), do ágar foram retiradas 4 colônias com características morfológicas diferentes e inoculadas em 20 ml de caldo de cana de açúcar estéril à 4° Brix, utilizadas no dia da inoculação.

4.3. Amostra de levedura

O inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (levedura industrial) comumente utilizada na fermentação para a produção de etanol, foi preparado em meio de caldo de cana-de-açúcar clarificado, diluído a 4° Brix esterilizado à 120°C por 15 minutos, em seguida as leveduras foram inoculadas e mantidas à temperatura de 30°C, por 24 horas (Moreira *et al.*, 2013). A linhagem de levedura utilizadas pertenciam a coleção de cultura do LAMAM - Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – UFSCar – Campus de Araras.

4.4. Teste de Sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade das bactérias contaminantes e da levedura *S. cerevisiae*, foi utilizado o método de diluição em caldo por macrodiluição com adaptações (SAHM & WASHINGTON II, 1991; ANVISA, 2006). O caldo sintético utilizado foi meio de extrato de levedura e peptona - GLT (2,5 g/L de extrato de levedura, 5,0 g/L de peptona, 1,0 g/L de dextrose, em água destilada). Os testes foram realizados em triplicata em cinco repetições, usando concentrações de 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm e 1000 ppm.

Para comparação com o extrato de orégano foi utilizado o antibiótico mais usado nas unidades industriais de produção de etanol a base de monoensina (ANTI) a 4 ppm seguindo as recomendações do fabricante. Também foi realizado um controle (CONT), para comparar o resultado da proliferação bacteriano sem agente antimicrobiano, e com o antimicrobiano natural e o antibiótico.

4.6. Preparo dos tubos para inoculação

- Tratamento com extrato de orégano: 1,0 mL de bactérias contaminantes + dose de extrato + GLT completando 10 mL.
- Tratamento com extrato de orégano: 1,0 mL de leveduras PE-2 + dose de extrato + GLT completando 10 mL.
- Tratamento com antibiótico padrão: 1,0 mL de bactérias contaminantes + dose de antibiótico + 9 mL de GLT.
- Controle: 1,0 mL de bactérias contaminantes + 9 mL de GLT.
- Controle: 1,0 mL de leveduras + 9 mL de GLT.

4.7. Análise microbiológica

Para a leitura do crescimento dos lactobacilos contaminantes foi utilizado o meio de cultura sólido Man Rogosa & Sharpe (MRS), e para as leveduras meio sólido de extrato de

levedura YEPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L de ágar, em água destilada), ambos pela técnica de *spread plate*, incubadas a 35°C por 48 horas. A leitura do crescimento microbiano foi realizada às 0 horas e após 6 horas de fermentação de etanol, de acordo com a metodologia de Bassi *et al.*, (2016).

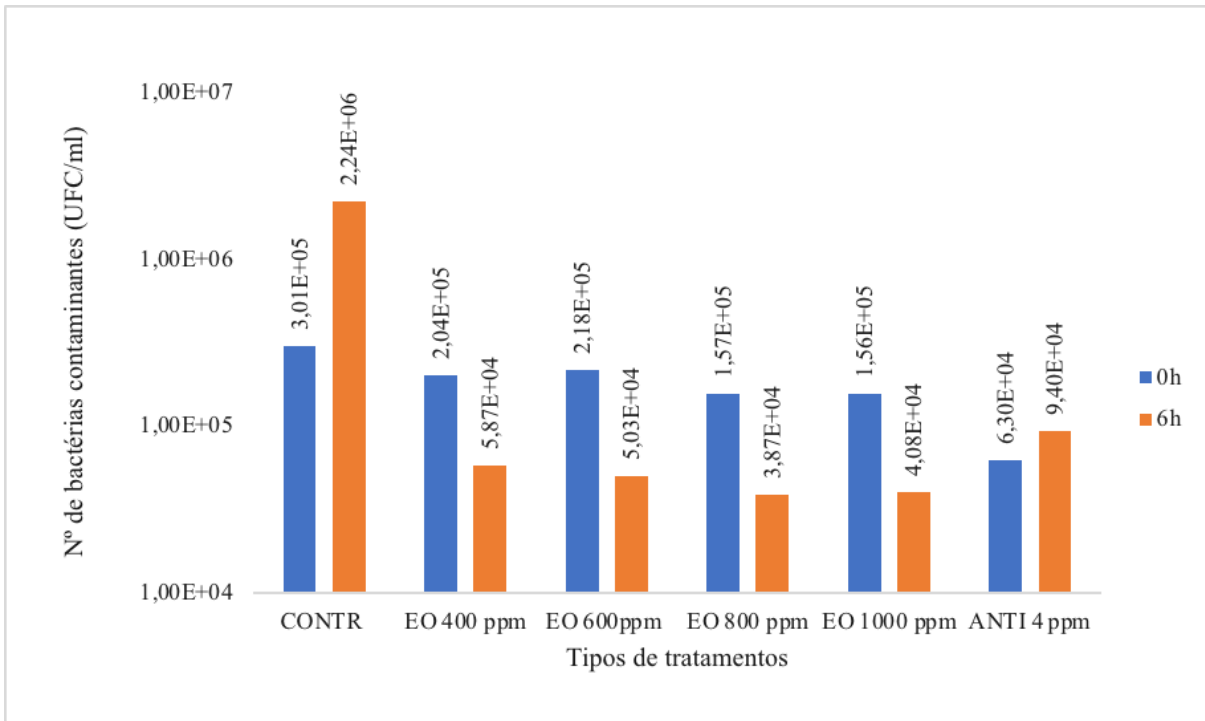
4.8. Análise estatística

Para avaliar o efeito do extrato de orégano nas bactérias contaminantes e leveduras da fermentação, foi realizado teste de ANOVA e de Tukey na comparação de cada tratamento. Os testes foram feitos no programa Bioestat[®] versão 5.4 (IDSM, 2020), e para a elaboração dos gráficos e tabelas foi usado o software Excel da Microsoft[®], assim como realizado no trabalho de Bassi *et al.* (2016).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito dos tratamentos tanto com o extrato de orégano, como com o antibiótico padrão, respectivamente às 0 e 6 horas são apresentados nos figura 2 e 3.

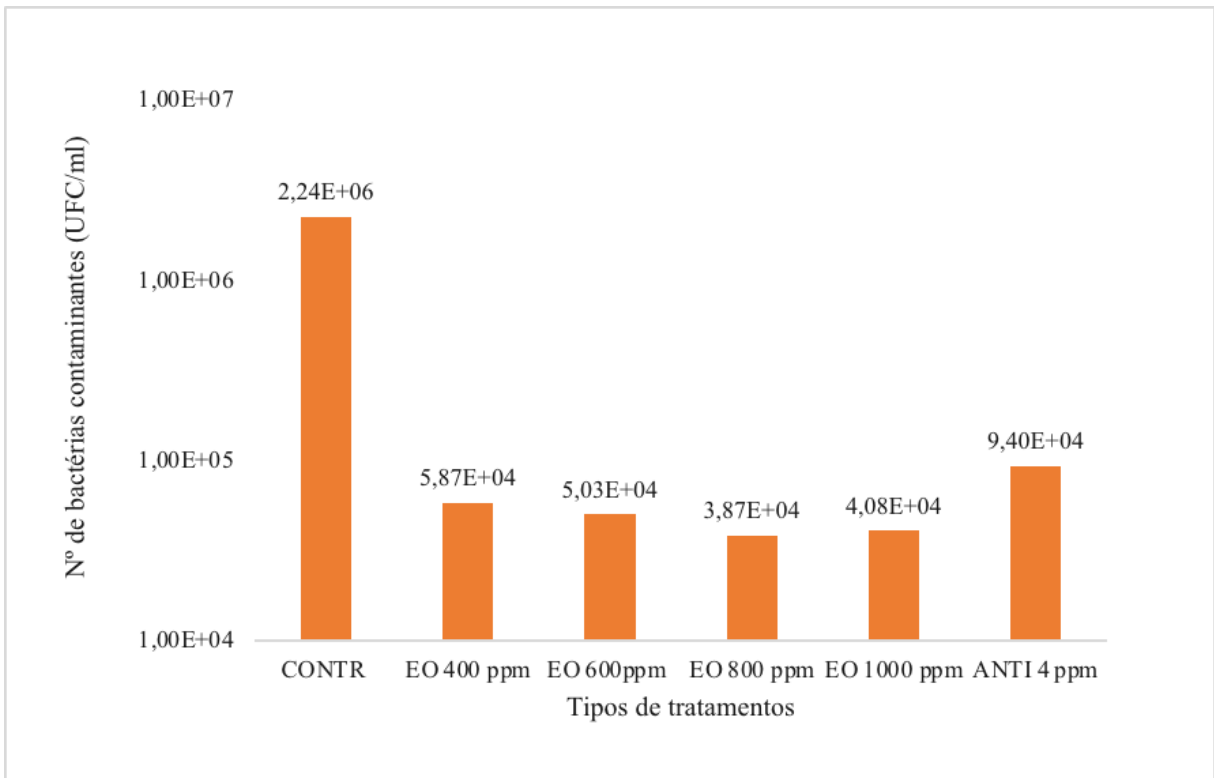
Figura 2. Número médio de bactérias contaminantes no tempo zero e após 6 horas, nos tratamentos com extrato de orégano de 400 a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle.



Os resultados demonstraram que o tratamento CONTR às 6h apresenta um número de bactérias significativamente superior ao apresentado pelo mesmo tratamento às 0h, com 2,24E+06 UFC/ml. Esse número de bactérias foi superior também ao apresentado por todos os outros tratamentos. Já os tratamentos com o EO, em todas as concentrações (400 ppm, 600 ppm, 800 ppm e 1000 ppm), após 6 horas apresentaram carga bacteriana inferior a carga inicial.

A utilização do extrato de orégano reduziu a contaminação bacteriana após 6 horas em todos os tratamentos e o maior controle ocorreram nos tratamentos com concentração de 800 e 1000 ppm de EO. Os resultados podem ser observados na figura 3.

Figura 3. Número médio de bactérias contaminantes nos tratamentos com extrato de orégano de 400 a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle após 6 horas de fermentação.



Na figura 3 pode-se observar que o número de bactérias dos tratamentos após as 6 horas, no caso dos tratamentos com EO e o antibiótico, que o número de bactérias foram menores que o CONTR. O tratamento EO 1000 ppm com $4,08 \times 10^4$ UFC/ml e o EO 800 ppm com $3,87 \times 10^4$ UFC/ml apresentaram as menores proliferações das bactérias contaminantes e com resultados muito próximos. Pela análise estatística presente na tabela 1, todos os tratamentos com EO e o antibiótico apresentaram diferenças estatísticas significativas, ao nível de 99% de confiança, quando comparados ao tratamento CONTR, comprovando que o extrato de orégano apresenta atividade antibacteriana contra as bactérias contaminantes do mosto fermentativo.

Como já era esperado o tratamento com o antibiótico (ANTI) apresentou valor inferior ao CONTR (figura 3), com $9,40 \times 10^4$ UFC/ml, controlando as bactérias contaminantes. Apesar do tratamento ANTI apresentar uma carga bacteriana maior de contaminantes em relação as demonstradas por todos os tratamentos com EO após 6 horas, não houve diferença estatística significativa entre eles. Esse resultado demonstra que o extrato de orégano apresenta um desempenho similar ao apresentado pelo antibiótico padrão.

O controle dos microrganismos pelo extrato de orégano pode ser visualizado quando comparamos as figuras 4 e 5. A figura 4 corresponde ao crescimento de bactérias

contaminantes em meio MRS, tratamento CONT, após 6 horas de fermentação sem diluição, enquanto que na figura 5 mostra o crescimento de bactérias contaminantes em meio MRS, tratamento EO 1000 ppm, após 6 horas de fermentação também sem diluição. Na placa do tratamento CONT o crescimento foi tão alto que impediu a contagem das colônias, enquanto que na figura 5 o crescimento foi visivelmente menor.

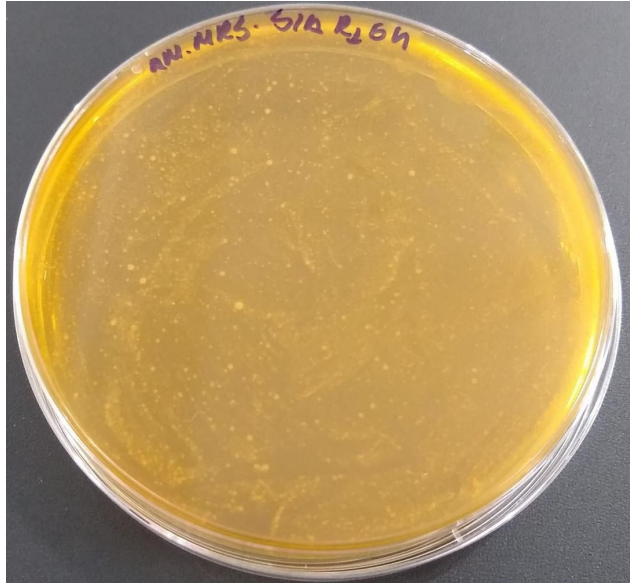


FIGURA 4. Crescimento de bactérias contaminantes em meio MRS, tratamento CONT, após 6 horas de fermentação.

Fonte: Arquivo pessoal

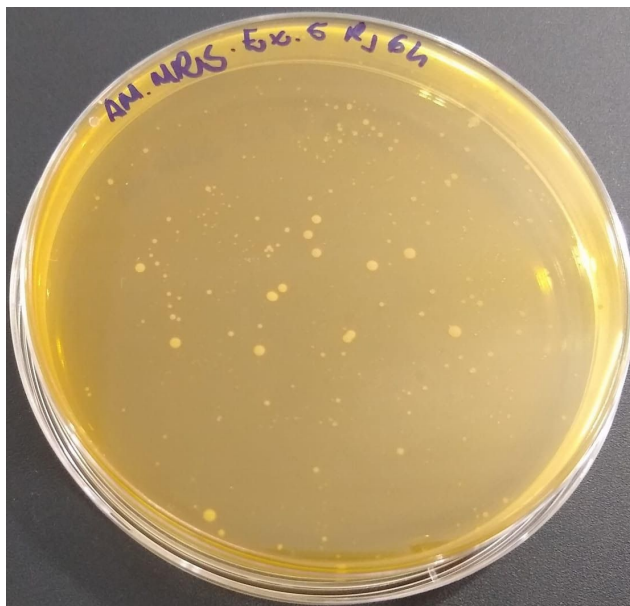


FIGURA 5. Crescimento de bactérias contaminantes em meio MRS, tratamento EO 1000 ppm, após 6 horas de fermentação.

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 1. Comparação entre contagem de 6 horas dos tratamentos com extrato de orégano de 400 ppm a 1000 ppm, antibiótico padrão e tratamento controle pelo teste de Tukey.

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (CONTR 6h a EO 400 ppm 6h) =	3,596	6,0578	< 0,05
Médias (CONTR 6h a EO 600 ppm 6h) =	3,968	6,6845	< 0,01
Médias (CONTR 6h a EO 800 ppm 6h) =	4,347	7,3242	< 0,01
Médias (CONTR 6h a EO 1000 ppm 6h) =	4,618	7,7802	< 0,01
Médias (CONTR 6h a ANTI 4 ppm 6h) =	3,327	5,6052	< 0,05
Médias (EO 400 ppm 6h a EO 600 ppm 6h) =	0,372	0,6267	ns
Médias (EO 400 ppm 6h a EO 800 ppm 6h) =	0,752	1,2664	ns
Médias (EO 400 ppm 6h a EO 1000 ppm 6h) =	1,022	1,7224	ns
Médias (EO 400 ppm 6h a ANTI 4 ppm 6h) =	0,269	0,4526	ns
Médias (EO 600 ppm 6h a EO 800 ppm 6h) =	0,380	0,6396	ns
Médias (EO 600 ppm 6h a EO 1000 ppm 6h) =	0,650	1,0957	ns
Médias (EO 600 ppm 6h a ANTI 4 ppm 6h) =	0,641	1,0794	ns
Médias (EO 800 ppm 6h a EO 1000 ppm 6h) =	0,271	0,456	ns
Médias (EO 800 ppm 6h a ANTI 4 ppm 6h) =	1,020	1,719	ns
Médias (EO 1000 ppm 6h a ANTI 4 ppm 6h) =	1,291	2,175	ns

O efeito positivo do EO, controlando a proliferação das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, corrobora com os registros de sua ação antimicrobiana presente na literatura. O orégano é comumente associado a diferentes ervas, para produção de extratos a fim de serem utilizados como antibacterianos naturais. Radhakrishnan e colaboradores (2014) demonstraram o efeito do extrato de quatro especiarias, entre elas o *Origanum vulgare*, prolongando a vida útil de prateleira de carnes, agindo no controle da proliferação dos microrganismos responsáveis pela deterioração do produto.

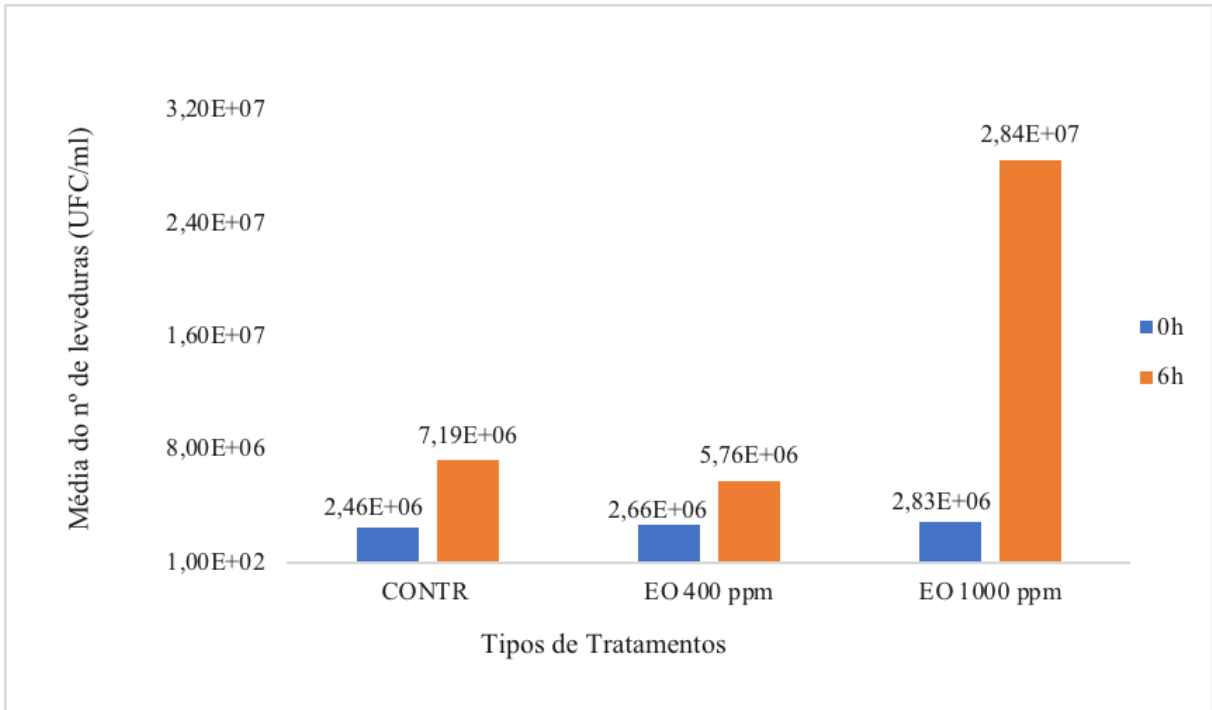
Na literatura também encontramos resultados do efeito do extrato de orégano no controle de bactérias do grupo de *Pseudomonas spp*, bactérias mesofílicas aeróbicas, psicrófilos e coliformes, de maneira que sua eficácia varia conforme as concentrações de orégano usadas e períodos de tratamento do produto com o extrato, além das especificidades de cada estudo (FERNANDES *et al.*, 2016; KHALED *et al.*, 2016).

A ação do extrato de orégano contra *Listeria monocytogenes*, grupo gram-positivo assim como os *Lactobacillus*, também apresentou resultados positivos no controle do crescimento do patógeno. Assim como em nosso trabalho, foram usadas diferentes concentrações de extrato, variando entre 400 ppm e 1600 ppm, e os resultados demonstraram diferenças de desempenho na inibição dos microrganismos conforme as concentrações do extrato, o que corrobora com o entendimento de que o aumento da concentração do extrato aumenta a eficiência antimicrobiana (SEABER *et al.*, 2003).

Outros fatores químicos podem ser associados ao extrato de orégano para seu melhor desempenho como antimicrobiano. O timol, importante componente na ação antibacteriana do orégano, apresentou eficiência no controle de *L. monocytogenes* em caldo com o pH ácido, em torno de 5,5 ou 6,0 (SEABER *et al.*, 2003). Essa é uma característica vantajosa, já que no processo fermentativo de etanol as bactérias contaminantes são produtoras de ácido láctico e podem provocar um meio ácido. Devido a essa característica é possível que mesmo em um pH baixo, o timol presente no extrato de orégano ainda preserve sua característica antimicrobiana e atue controlando as bactérias contaminantes.

Na figura 6 estão os resultados da avaliação do efeito do extrato de orégano na levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, responsável pela fermentação.

Figura 6. Número médio de leveduras com tratamentos de extrato de orégano de 400 ppm, 1000 ppm e o tratamento controle.



Na figura 6 é possível avaliar que mesmo no tratamento com a maior concentração do extrato de orégano (1000 ppm), as populações de leveduras após 6 horas expostas ao antimicrobiano natural não apresentaram déficit em sua proliferação. Todos os tratamentos após 6 horas demonstraram um aumento da carga de leveduras em relação as cargas iniciais de 0h, indicando que o extrato não afetou as leveduras. O tratamento com maior concentração do extrato (1000 ppm), também foi o tratamento que apresentou maior carga de leveduras após o período de fermentação chegando a $2,64 \times 10^7$ UFC/ml.

A análise estatística demonstra que não houve diferença significativa para as leveduras entre o tratamento CONTR e as dosagens de EO após 6 de fermentação, confirmando que nas concentrações testadas o extrato de orégano não prejudicou o desenvolvimento das populações de leveduras fermentativas. O fato do extrato não ter prejudicado o desenvolvimento das leveduras durante as fermentações é uma importante característica para que o mesmo possa se tornar um bom substituto do antibiótico usado atualmente na produção de etanol.

A *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 usada na fermentação é uma cepa estudada e desenvolvida especialmente para a produção de etanol. Ela é usada na maioria das usinas do Brasil e é responsável pela fermentação de etanol de grande parte do mundo, isso só é possível devido suas características fisiológicas específicas, permitindo que a PE-2 tenha

robustez e tolere variações no ambiente, resistindo a diferentes fontes de estresse (ARGUESO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011).

Essas características da PE-2 permitem que ela resista não apenas às adversidades da produção de etanol durante a fermentação, como também aos agentes químicos utilizados para o controle dos microrganismos contaminantes. Os resultados desse trabalho demonstram que além das características de robustez da PE-2, que permite certa resistência da levedura, os componentes presentes no extrato de orégano, carvacrol e timol, não apresentaram efeito na levedura, mas apenas nas bactérias contaminantes, atuando realmente como antibacteriano.

A figura 7 mostra o crescimento de leveduras em YEPD, tratamento 1000 ppm 10^{-4} , após 6 horas de fermentação, enquanto que na figura 8 mostra o crescimento de leveduras em YEPD, tratamento CONT 10^{-4} , após 6 horas de fermentação. Comparando as duas imagens é possível que visualmente o crescimento de colônias é parecido.

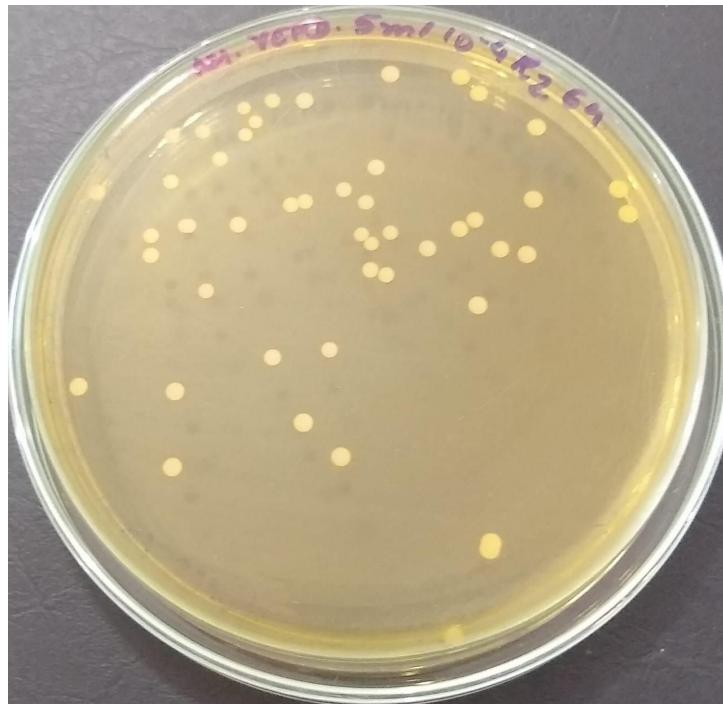


FIGURA 7. Contagem de leveduras em YEPD, tratamento 1000 ppm 10^{-4} , após 6 horas de fermentação.

Fonte: Arquivo pessoal

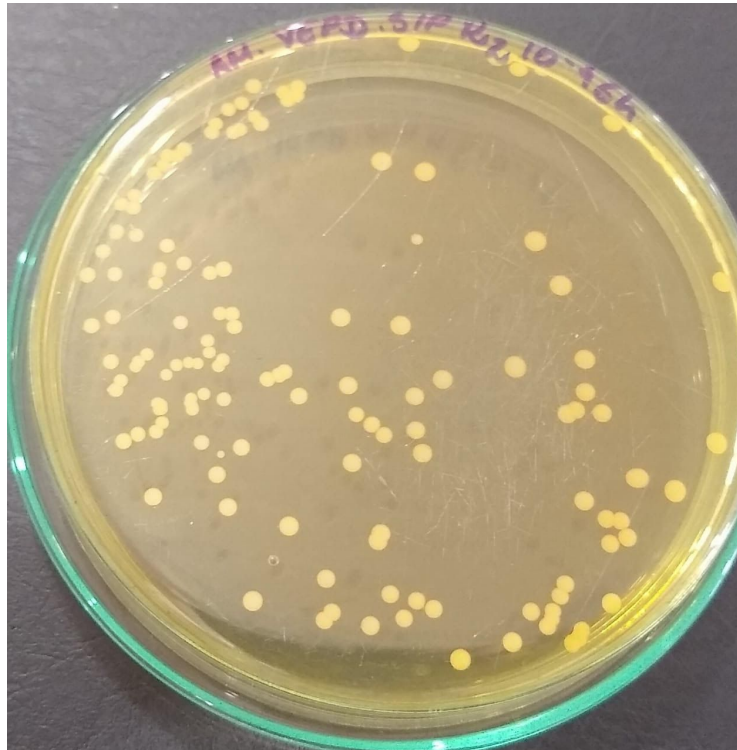


FIGURA 8. Contagem de leveduras em YEPD, tratamento CONT 10^{-4} , após 6 horas de fermentação.

Fonte: Arquivo pessoal

6. CONCLUSÃO

O extrato de orégano apresentou efeito no controle de bactérias lácticas contaminantes em todas as dosagens, com efeito similar ao antibiótico mais largamente utilizado nas fermentações industriais. Assim como também não interferiu no crescimento das leveduras.

A utilização do extrato de orégano em todas as dosagens não prejudicou a proliferação das leveduras. O fato do antimicrobiano natural não ter prejudicado o desenvolvimento das leveduras durante as fermentações é uma importante característica para que o mesmo possa substituir o antibiótico usado atualmente na produção de etanol.

Novos estudos devem ser realizados com concentrações mais altas de extrato para a determinação da melhor concentração de extrato contra bactérias lácticas contaminantes, assim como mais experimentos que testem tanto a ação do extrato de orégano diretamente no mosto em uma fermentação etanólica de bancada, como também estudos que caracterizem a composição química do extrato de orégano, para uma melhor determinação dos componentes antimicrobianos presente no extrato seguindo esse processo de extração.

7. REFERÊNCIAS

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. v. 49, p. 4168-4170. 2001.
- AMORIM, H.V.; BASSO L.C.; ALVES, D.M.G. Processos de Produção de Álcool - Controle e Monitoramento. **2ª ed. Fermentec/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba**, p.75-76. 1996.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (Versão 1.2). 2006. Disponível em: <encurtador.com.br/uDHO1 > Acessado em: 30 agosto.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V. C.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G. L.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; ALÇARDES-VOS, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res**. v. 19, p. 2258–2270, 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, A.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 446 – 475, 2008.
- BASSI, A. P. G. Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle. 117 f. Tese (doutorado) **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2016.
- BASSO, T.O.; EGGLESTON, G.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; GOMES, F.S.; BASSO, L.C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 169-177, 2014.
- BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D. Worthington RE, Rich JO: Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnol Bioeng**. v. 103, p. 117-122. 2009.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Lett Appl Microbiol**. v. 53, p. 387-394. 2011.
- BUSTAMANTE, G. A.; DÍAZ, L. C.; CATZIM, C. E. A.; SÁNCHEZ, C. L. D. T.; FLORES, J. B.; RANGEL, P. P.; RUIZ, F. E. M.; PUENTE, E. R. Potencial de los extractos de orégano y cachanilla para el control de hongos fitopatógenos en frutos de tomate. **ITEA**. v. 114, n. 04, p. 344-352, 2018.
- BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. Use of natural antimicrobials and high pressure homogenization to control the growth of *Saccharomyces bayanus* in apple juice. **Food Control**. v. 24, p. 109-115. 2012.

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

CARVALHO JUNIOR, A. M.; RAMUNDO, J. C. M.; CAVALCANTI, C. E. de S.; ROSA, S. E. S. da; MILANEZ, A. Y.; GALVÃO, A. C.; POPPE, M. K. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/organização BNDES e CGEE**. - Rio de Janeiro: BNDES, p. 314, 2008.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. A. D. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando à redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus*** – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol. 2009. 177 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

CHIN, P.M.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactic acid bacteria on wheat mash fermentation prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 16, p. 311 – 317, 1994.

DE CARVALHO, G. G.; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 47-54, 2011.

FERNANDES, RPP.; TRINDADE, MA.; LORENZO, JM.; MUNEKATA, PES.; MELO, MP de. Effects of oregano extract on oxidative, microbiological and sensory stability of sheep burgers packed in modified atmosphere. **Food control**. v. 63, p. 65-75. 2016.

GODOY A. Contaminação bacteriana: efeitos na fermentação. Em: 23^a Reunião Anual Fermentec – **A Ciência na Prática**, Piracicaba, p. 3, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. **Brasília**. v. 1, p.62, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/31590_6cfbbc41aa04783c69113c50fa499cba>.

CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade. **Edgard Blücher Ltda**: São Paulo, 2010, cap. 3 parte 4.

COSTA, O. Y. A.; SOUTO, B. M. S.; TUPIANAMBÁ, D. D.; BERGMANN, J. C.; KYAW, C. M.; KRUGER, R. H.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 42, n. 1, p. 73-84. 2014.

FILHO, S. R.; JULIANI, A. J. Sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. **Estudos Evançados**. v. 27, n 78, p. 195-212. 2013.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. WRIGHT, A. V. Characterization of the action of

selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p. 3590–3595. 1998.

HYNES S.H.; INGLEDEW W.M.; NARENDRANATH, N.V.; THOMAS K.C. 1997. Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, nr. 11, p. 4158 – 4163, 1997.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Levantamento sistemático da produção agrícola estatística da produção agrícola. 2020.

INAMUCO, J.; VEENENDAAL, A. K. J.; POST, J. A.; BOKHOVEN, T. V.; HAAGSMAN, H. P.; VELDHUIZEN, E. J. A. Sub-inhibitory levels of carvacrol reduce Salmonella Typhimurium motility and invasion of IPEC-J2 epithelial cells. **Vet Microbiol**. v. 157, p. 200–207. 2012.

IDSM. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2020. **Instituto Mamirauá Documentos Institucionais**. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br/downloads/programas/>> Acessado em: 15 julho.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 76, p. 626-631. 1994.

KHALED, H.; AZIZIAH, A.; MARI, A. Effect of oregano extract on shelf-life, microbiological quality of chilled chicken carcasses. *International Food Research Journal*. v. 23, p. 1296-1299. 2016.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**. v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KRUPPA, P.C.; RUSSOMANNO, O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 1, p. 45–51. 2008.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 453–462. 2001.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M. dos; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology, Nottingham**, v. 10, p. 298-306, 2010.

MACRI, R. de C. V.; COSTA, G. H. G.; MONTIJO, N. A.; SILVA, A. F.; MUTTON, M. J. R. Moringa extracts used in sugarcane juice treatment and effects on ethanolic fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 13, n. 42, p. 4124-4130, 2014.

MARCIAL, G. E.; GEREZ, C. L.; KAIRUZ, M. N. de; ARAOZ, V. C.; SCHUFF, C.; VALDEZ, G. F. de. Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures. **Revista Argentina De Microbiología**. v. 48, n. 3, p. 229-235, 2016.

- MOREIRA, B. L.D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L. F.; LOPES, J. J. C. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 29, p. 1672-1677, 2013.
- NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PAIXOTO, P. V. Intoxicação por antibióticos ionóforo em animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 23, n. 3, p. 191-197. 2009.
- ORAL, N. B.; VATANSEVER, L.; AYDIN, B. D.; SEZER, Ç.; GÜVEN, A. A.; GÜLMEZ, M.; BASER, K. H.; KÜRKÇÜOĞLU. Effect of oregano essential oil on biofilms formed by *Staphylococci* and *Escherichia coli*. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**. v. 16, p. 23-29, 2010.
- PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **J. Biosci. Bioeng**. v. 112, p. 130–136. 2011.
- PEZZANI, R.; VITALINI, S.; IRITI, M. Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. **Phytochem. Rev**. v. 16, p. 1253-1268. 2017.
- PORTAL BRASIL. **Safra de cana 2016/17 cresce em produção e área**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/04/safra-de-cana-2016-17-cresce-em-producao-e-area>> Acesso em: set. 2017.
- PRADO JUNIOR, C. História econômica do Brasil. **São Paulo: Brasiliense**, 1970.
- RADHAKRISHNAN, K.; BABUSKIN, S. BABU, P. A. S.; SASIKALA, M. SABINA, K.; ARCHANA, G.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 171, p. 32-40, 2014.
- RODERO, J. M.; RODRIGUES, A.; SOUZA, A. E. M. Análise da contaminação microbiana nas etapas de processamento e fermentação da cana de açúcar em uma usina sucroalcooleira. **Função Científica - Multidisciplinar**, Santa Fé do Sul, v. 5, n. 7, p. 12-22. 2016.
- ŞAHİN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D. SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**. v. 15, pp. 549-557. 2004.
- SAHM, D. F.; WASHINGTON II, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shamody, H.J. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 1105-1116., 1991.
- SEABERG, A. C.; LABBE, R. G.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Elite Clonal Extracts of Oregano (*Origanum vulgare*). **Food biotecnologia**. v. 17, n. 2, p. 129–149, 2003.
- SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **J Sci Food Agric**. v. 89, p. 1879-1885. 2009.

SILVA, F. C.; MAJEWSKI, M.; YAMAMOTO, L. T.; JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C. Y. Atividade antimicrobiana da tintura e infusão de *Origanum vulgare* (Orégano). **Salusvita, Bauru**, v. 27, n. 3, p. 353-361, 2008.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. de M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, 2010.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D.; Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 31, n. 9, p. 401–408. 2004.

SOUSA, E. L. L. de; MACEDO, I. de C. **Etanol e Bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, p. 313. 2010.

TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; SERRANO, C.; MATOS, O.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **J Sci Food Agric**. v. 93, n. 11, p. 2707-2714. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23553824/>> .

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. 258 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

ULTEE, A. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. A Case Study of a Novel Approach to Mild Food Preservation. Wageningen University, Wageningen, **The Netherlands**. 97 pp, 2000.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233–238. 2000.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 4, p. 1561–1568. 2002.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**. v 64, p. 373–378. 2001.

VALSECHI, O. A. Efeito da radiação de microondas sobre *Lactobacillus fermentum*; linhagens: CCT4143; CCT4144; CCT4145; CCT4146 E FT038B / Octavio Antonio Valsechi. – Rio Claro : [s.n.], 2005. 101 f. Tese (doutorado) – **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro**, 2005.

VAN ALPHEN, L. B.; BURT, S. A.; VEENENDAAL, A. K. J.; BLEUNINK-PLUYM, N. M. C.; VAN PUTTEN, J. P. M. The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. **PLoS One**. v. 7, n. 9, p. e45343. 2012.

WBA - **WORLD BIOENERGY ASSOCIATION**. Biofuels for Transport. 2013. Acessado em 30 de novembro de 2020. Disponível em: <<https://worldbioenergy.org/uploads/Factsheet%20-%20Biofuels%20for%20transport.pdf>>.

WHEAL, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H.V. Etanol combustível após 25 anos. **Trends in Biotechnology**. Ed. 12. v. 17, p. 482-487. 1999.

WWF - **WORLD WIDE FUND FOR NATURE**. As mudanças climáticas. 2020. Acessado em: 30 de novembro de 2020. Disponível em: <https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/reducao_de_impactos2/clima/mudancas_climaticas2/>.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J. N.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A. N. Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. **The Scientific World Journal**. p. 11. 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/957102/>>.