



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TANGERINA 'FREMONT' NO CONTROLE DE
Lactobacillus fermentum NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

AMANDA VARANO

Araras
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TANGERINA 'FREMONT' NO CONTROLE DE
Lactobacillus fermentum NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

AMANDA VARANO

ORIENTADORA: PROFa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2021

Varano, Amanda

Efeito do óleo essencial de tangerina 'Fremont' no controle de *Lactobacillus fermentum* na fermentação alcoólica / Amanda Varano -- 2021.
57f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca Examinadora: Sandra Regina Ceccato Antonini, Sabrina Gabardo, Osania Emerenciano Ferreira

Bibliografia

1. Contaminação da fermentação etanólica. 2. Produção de bioetanol. 3. Óleo essencial cítrico. I. Varano, Amanda. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda Varano, realizada em 24/06/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar)

Profa. Dra. Sabrina Gabardo (UFSCar)

Profa. Dra. Osania Emerenciano Ferreira (UEMG)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini pela oportunidade e orientação. Desejo que todo pós-graduando tenha a chance de ter uma orientadora que sirva de inspiração, assim como a Sandra é para mim.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) pela convivência, troca de conhecimentos e toda a ajuda prestada sempre que necessário.

Ao Dr. Fernando Alves de Azevedo, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC Cordeirópolis, por ceder o óleo essencial utilizado nesse trabalho.

À minha família pelo apoio na continuação dos estudos.

Aos meus amigos pelo apoio e por sempre se fazerem presentes, mesmo que não fisicamente.

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PPGPVBA) e a Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias – *Campus* de Araras, pela estrutura cedida e pela oportunidade de realizar o mestrado, e a todos os docentes que fizeram parte dessa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 (recursos e bolsa de mestrado), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2018/19139-2).

Nesse trabalho tem um pouco de cada um de vocês, muito obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
LISTA DE SIGLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3.1 Fermentação alcoólica.....	05
3.2 Contaminação do processo fermentativo.....	09
3.3 Óleos essenciais cítricos.....	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Obtenção do OE de tangerina.....	17
4.2 Análise do OE de tangerina por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).....	17
4.3 Análise do teor de compostos fenólicos totais (CFT) no OE.....	18
4.4 Micro-organismos.....	18
4.5 Preparação dos inóculos bacteriano e da levedura.....	18
4.6 Otimização da concentração de Tween 80 como emulsificante do OE....	18
4.7 Efeito do OE de tangerina em meio sólido em <i>L. fermentum</i> (disco-difusão).....	19
4.8 Efeito do OE sobre <i>L. fermentum</i> em condições proliferativas (ensaio de microdiluição).....	19
4.9 Efeito do pH em adição com OE para o controle de <i>L. fermentum</i> em condições não-proliferativas.....	20
4.10 Efeito do OE sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em condições proliferativas e não-proliferativas (ensaios <i>time-kill</i>).....	21
4.11 Efeito da concentração de OE sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em condições não-proliferativas.....	22
4.12 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em co-cultura em condições não-proliferativas.....	22
4.13 Aplicação do OE na concentração de 0,05% v/v no tratamento celular	

	entre os ciclos fermentativos com caldo de cana.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
	5.1 Análise do OE por GC-MS.....	25
	5.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) no OE.....	27
	5.3 Otimização da concentração de Tween 80 como emulsificante do OE.....	27
	5.4 Efeito do OE de tangerina em meio sólido em <i>L. fermentum</i> (disco-difusão)	28
	5.5 Efeito do OE sobre <i>L. fermentum</i> em condições proliferativas (ensaio de microdiluição).....	29
	5.6 Efeito do pH em adição com OE para o controle de <i>L. fermentum</i> em condições não-proliferativas.....	33
	5.7 Efeito do OE sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em condições proliferativas e não-proliferativas (ensaios <i>time-kill</i>).....	35
	5.8 Efeito da concentração de OE sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em condições não-proliferativas.....	39
	5.9 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em co-cultura em condições não-proliferativas.....	40
	5.10 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre o processo fermentativo conduzido por <i>S. cerevisiae</i> e contaminado com <i>L. fermentum</i> , com adição no tratamento celular realizado entre os ciclos fermentativos.....	41
6	CONCLUSÕES	46
7	LITERATURA CITADA	48

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Analitos identificados no OE de Tangerina.....	26

LISTA DE SIGLAS

ADNS: Ácido 3,5-dinitrossalicílico;
ART: Açúcar redutor total;
ATR: Açúcar total recuperável;
BOT: do inglês *Brazilian Orange Terpenes*;
CCA: *Campus* de Ciências Agrárias;
CFT: do inglês *Content of phenolic compounds* (Teor de compostos fenólicos);
CIM: Concentração inibitória mínima;
CLSI: do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de padrões clínicos e laboratoriais);
COVID-19: do inglês *Corona virus disease 2019* (Doença do coronavírus);
CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas;
CT: do inglês *Citrus terpenes*;
DO: Densidade óptica;
EAG: Equivalente de ácido gálico;
GC-MS: do inglês *Gas chromatography – mass spectrometry* (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas);
IAC: Instituto agrônômico de Campinas;
LAB: do inglês *Lactic acid bacteria* (Bactérias do ácido láctico);
LAMAM: Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular;
MBP: metabissulfito de potássio;
NCCLS: do inglês *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Comitê Nacional para padrões de Laboratórios Clínicos);
OE: Óleo essencial;
OOPE: do inglês *Orange Oil Phase Essence*;
OPO: do inglês *Orange peel oil*;
OPOFF: do inglês *Orange peel oil five fold*;
PIB: Produto interno bruto;
UFC: Unidades formadoras de colônias;
UFSCar: Universidade Federal de São Carlos;
UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cromatograma expandido (4 – 24 min) da amostra de OE.....	25
Figura 2. Efeito das diferentes proporções de Tween:óleo na emulsificação do OE de tangerina.....	28
Figura 3. Teste de difusão em disco do OE de tangerina em meio MRS inoculado com <i>L. fermentum</i>	29
Figura 4. Curvas de crescimento de <i>L. fermentum</i> na presença de OE de tangerina nas concentrações de 0 a 12,8% v/v, em meio MRS, a 35 °C.....	31
Figura 5. Velocidade específica de crescimento (μ , h ⁻¹) e duração da fase <i>lag</i> (h) de <i>L. fermentum</i> na presença de OE de tangerina nas concentrações de 0 a 12,8% v/v, em meio MRS, a 35 °C.....	31
Figura 6. Efeito da concentração de OE de tangerina sobre o crescimento de <i>L. fermentum</i> , em meio MRS, a 35 °C.....	32
Figura 7. Efeito do pH e da adição de OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre <i>L. fermentum</i> , em condição não-proliferativa, após 2 horas de incubação a 35 °C.....	34
Figura 8. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre <i>L. fermentum</i> , em condição não-proliferativa, ao longo de 6 horas de cultivo, a 35 °C, em comparação com os tratamentos sem óleo (0%), com Tween (0,066%) e com monensina (3 mg/L).....	37
Figura 9. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre <i>L. fermentum</i> , em condição proliferativa (meio MRS), ao longo de 6 horas de cultivo, a 35 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).....	37
Figura 10. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre <i>S. cerevisiae</i> , em condição não-proliferativa, ao longo de 6 horas de cultivo, a 30 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).....	38
Figura 11. Efeito da concentração do OE de tangerina sobre <i>L. fermentum</i> (A) e <i>S. cerevisiae</i> (B), em condição não-proliferativa, por 2 horas, a 35 °C e 30 °C, respectivamente, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).....	39

Figura 12. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,05% v/v sobre <i>L. fermentum</i> e <i>S. cerevisiae</i> em co-cultura, em condição não-proliferativa, por 2 horas, a 30 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).....	41
Figura 13. Número de <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> durante fermentação de caldo de cana com reciclo celular, em co-cultura, a 30 °C, com adição de 0,05% v/v de OE de tangerina no tratamento celular entre os ciclos fermentativos.....	43
Figura 14. pH final, teor alcoólico e ART após fermentação de caldo de cana com reciclo celular, em co-cultura de <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> , a 30 °C, com adição de 0,05% v/v de OE de tangerina no tratamento celular entre os ciclos fermentativos.....	43

EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE TANGERINA 'FREMONT' NO CONTROLE DE *Lactobacillus fermentum* NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autor: AMANDA VARANO

Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

RESUMO

Dentre os micro-organismos contaminantes mais frequentes na produção de etanol estão as bactérias do gênero *Lactobacillus*. O controle da contaminação é realizado com antibióticos e tratamento ácido, porém apesar de eficazes, essas técnicas apresentam limitações, o que estimula a procura por outros antimicrobianos. Nesse trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de tangerina 'Fremont' IAC 543 (cultivada em porta-enxerto *Poncirus trifoliata*) sobre a bactéria contaminante *Lactobacillus fermentum* e a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. O OE foi obtido por hidrodestilação e foram estudados os efeitos: do OE sobre *L. fermentum* em condições proliferativas (testes de microdiluição e disco-difusão); do pH em adição com OE para o controle de *L. fermentum* em condições não-proliferativas; do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em condições proliferativas e não-proliferativas (*time-kill*); da concentração de OE em condições não-proliferativas para o controle de *L. fermentum* de modo a exercer mínimo efeito sobre a viabilidade de *S. cerevisiae*; do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em co-cultura; e da aplicação do OE no tratamento celular entre os ciclos fermentativos. No ensaio de disco-difusão, a ação antibacteriana foi verificada somente com o OE sem diluição, no entanto, no teste de microdiluição em condições proliferativas, o aumento da concentração do OE de 0,05% a 12,8% v/v resultou em diminuição da velocidade específica de crescimento máxima e maior duração da fase *lag*, não havendo inibição do crescimento bacteriano. Em condições não-proliferativas (água), 0,2% v/v do OE causou redução de 4 ciclos logarítmicos em *L. fermentum*, mesmo efeito que o tratamento ácido em 2 horas. Nos ensaios de *time-kill*, houve perda total da viabilidade da bactéria e redução de 1 ciclo logarítmico no número de *S. cerevisiae* após 1,5 hora com 0,2% v/v do OE em água. Com 3 mg/L do antibiótico monensina, a perda total de viabilidade da bactéria ocorreu apenas com 4,5 horas, porém em meio de cultura com OE, não houve perda da viabilidade da bactéria dentro de 6 horas. A eficácia do OE sobre *L. fermentum* se manteve e o efeito foi menor para *S. cerevisiae* com a redução da concentração do OE de 0,2% para 0,05% v/v. Nessa última concentração, observou-se menor efeito do OE sobre ambos os micro-organismos em co-cultura. Em meio de caldo de cana e aplicando o OE nos tratamentos celulares em três ciclos fermentativos, houve redução de cerca de 1,5 ciclo log para a levedura e bactéria, menor produção de etanol, aumento do teor de açúcar residual e do pH do meio de fermentação. Os resultados obtidos inviabilizam a aplicação desse OE no processo fermentativo para o controle de *L. fermentum*, porém, a satisfatória ação antibacteriana apresentada em cultura pura estimula a continuação dos estudos para encontrar alternativas para o emprego desse OE como substituto do ácido sulfúrico no tratamento celular.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, contaminação, *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, bioetanol

EFFECT OF 'FREMONT' MANDARIN ESSENTIAL OIL IN THE CONTROL *Lactobacillus fermentum* IN THE ALCOHOLIC FERMENTATION

Author: AMANDA VARANO

Adviser: Prof. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

ABSTRACT

Bacteria of *Lactobacillus* genus are one of the most frequent biological contaminants in the ethanol production. Contamination control has been performed with antibiotics and acid treatment, although be effective, these techniques have limitations, which promotes the search for other antimicrobials. In this work, the antimicrobial activity of essential oil (EO) from 'Fremont' IAC 543 mandarin (cultivated at *Poncirus trifoliata* rootstock) on *Lactobacillus fermentum*, a contaminant bacterium from the ethanolic fermentation process, and *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, an industrial yeast, have been evaluated. The OE was obtained by hydrodistillation and the following effects were studied: EO on *L. fermentum* in proliferative conditions (microdilution testes and disk diffusion); pH in addition with EO to control *L. fermentum* in non-proliferative condition; EO on *L. fermentum* and *S. cerevisiae* in proliferative and non-proliferative conditions (time-kill); EO concentration in non-proliferative conditions to control *L. fermentum*, in order to have minimal effect on *S. cerevisiae* viability; EO on *L. fermentum* and *S. cerevisiae* in co-culture; and EO application in cell treatment of fermentative cycles. In disk-diffusion assay, antibacterial activity was observed only with EO without dilution. Although, in microdilution test in proliferative conditions, when EO concentration was increased from 0.05% to 12.8% v/v, which has resulted in a decrease of maximum growth specific rate and a longer lag period, there was no inhibition of bacterial growing. In non-proliferative conditions (water), 0.2% v/v EO has resulted in a decrease of four logarithmic cycles on *L. fermentum*, the same effect of acid treatment in 2 hours. In time-kill tests, all the bacterial viability was lost and there was a decrease of one logarithmic cycle on *S. cerevisiae* after 1.5 hour with 0.2% v/v EO in water. When it was used with 3 mg/L of monensin antibiotic, the overall loss of bacteria viability has occurred after 4.5 hours, however in cultivation medium with EO, it was after 6 hours. The efficiency of EO on *L. fermentum* was maintained and the effect was lower for *S. cerevisiae* with the reduction of EO concentration from 0.2% to 0.05% v/v. At the last concentration, EO effect was lower for both microorganisms in co-culture. In sugar cane juice and adding EO to the cell treatments at three fermentative cycles, it was observed a decrease of 1.5 log cycles for yeast and bacterium, a lower ethanol production, increase in residual sugar concentration and pH. The results obtained has invalidated the application of the EO on fermentative process to control *L. fermentum*, nevertheless, the satisfactory antibacterial action revealed in pure cultivation stimulates further studies to discover new alternatives for EO to replace sulfuric acid in the cell treatment during fermentation process for bioethanol production.

Key-words: alcoholic fermentation, contamination, *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol

1 INTRODUÇÃO

O setor sucroenergético, que consiste na produção de energia a partir da cana-de-açúcar, é um dos principais ramos do agronegócio brasileiro, contribuindo diretamente com o Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O Brasil está entre os maiores produtores de etanol, juntamente com os Estados Unidos. O estado de São Paulo é o que mais contribui nessa esfera, concentrando os principais centros de pesquisa e empresas fabricantes de bens de produção para a indústria sucroalcooleira e maior área canavieira (BACCARIN; OLIVEIRA; MARDEGAN, 2020).

O etanol é produzido por fermentação alcoólica a partir de açúcares fermentescíveis, utilizando produtos agrícolas, materiais celulósicos ou resíduos de plantas como matérias-primas. No Brasil, a produção desse biocombustível é realizada utilizando a cana-de-açúcar, que contém cerca de 12 – 17% de açúcares solúveis no caldo, dos quais 90% são sacarose, o açúcar de reserva da cana, e 10% são glicose e frutose em proporções iguais. A cana é moída, obtendo-se o caldo rico em sacarose, que é convertido em etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, que são convertidas em piruvato, formando, posteriormente, acetaldeído e CO₂. Por fim, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima desidrogenase alcoólica (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2020).

No Brasil, o sistema de fermentação utilizado por cerca de 85% das destilarias para a produção do etanol é o de batelada alimentada, com reciclo de células. Nesse processo, a adição do substrato à dorna é realizada aos poucos. Essa menor concentração do substrato na dorna permite a adaptação do micro-organismo ao meio, obtendo maior produtividade, já

que o processo é conduzido em condições que evitam a repressão que pode ocorrer devido à alta concentração de substrato, através do controle da velocidade de alimentação (LEMOS *et al.*, 2020).

Há também o processo de batelada simples, em que a dorna é completada com o substrato e ocorre a inoculação do micro-organismo. Caracteriza-se como um processo econômico e seguro em relação à manutenção do equipamento e condições assépticas, diminuindo os índices de contaminação. Porém, como a adição do substrato é realizada uma única vez no início do processo, este pode apresentar baixas eficiência e produtividade, pois a elevada concentração do substrato pode exercer efeitos de inibição, repressão ou desvio do metabolismo a produtos que não são de interesse do processo (CRUZ, 2015).

Uma outra característica da produção do etanol é o reciclo de células. Esse fator, associado com o alto volume de substrato processado, dificuldade no controle de condições assépticas e com as alterações que ocorrem durante o processo da fermentação alcoólica no próprio meio fermentativo e no ambiente, tornam as células vulneráveis. Isso favorece a ocorrência de contaminações por outros micro-organismos, geralmente ocasionadas por leveduras nativas e bactérias. Esses contaminantes competem pelos açúcares e nutrientes presentes no substrato, inibindo a fermentação. A maioria das bactérias relacionadas com as contaminações são Gram-positivas, sendo o gênero *Lactobacillus* o mais frequente. Dentre eles, pode-se citar *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vini* como os principais agentes contaminantes (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A presença de *Lactobacillus* no processo de produção do bioetanol leva a produção de ácidos orgânicos e outros metabólitos, podendo causar inibição do crescimento da levedura; desvio dos açúcares da produção do etanol, comprometendo o rendimento fermentativo; e favorecimento da ocorrência de floculação da levedura (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; CECCATO-ANTONINI, 2018).

Para manter a eficiência fermentativa, o controle da contaminação bacteriana é realizado através do tratamento ácido. Esse método consiste na mistura da massa celular centrifugada após a fermentação, com uma solução de ácido sulfúrico, pH 2,0 a 2,5, por cerca de 2 horas. Essa massa tratada retorna, então, para as dornas de fermentação para um novo ciclo fermentativo. No entanto, esse tratamento pode não ser suficiente para diminuir os níveis de contaminação, o que leva as indústrias a buscarem outras alternativas, como o emprego de antibióticos. Porém, seu uso indiscriminado e contínuo pode ocasionar seletividade nas cepas de bactérias, tornando-as mais resistentes (LOPES *et al.*, 2016).

Uma alternativa ao controle com antibióticos é o emprego de produtos naturais, como os óleos essenciais (OEs). Esses compostos apresentam diferentes propriedades biológicas, entre elas, ações fungicida e bactericida (AL-SHUNEIGAT *et al.*, 2020).

Na produção mundial de OEs, o Brasil tem lugar de destaque devido aos derivados de frutas cítricas (subprodutos da indústria do suco), sendo o estado de São Paulo o principal produtor do óleo de laranja, responsável por 86% das exportações de OEs cítricos no país, com valor aproximado de US\$ 2/kg. Esses óleos são compostos majoritariamente pelo limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Quanto à atividade antimicrobiana dos OEs de *Citrus*, são encontrados na literatura trabalhos que estudaram sua ação frente a diversas cepas de *Lactobacillus*, entre elas *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. brevis* e *L. helveticus*, em que é possível ver a ação antibacteriana dos diversos OEs cítricos empregados nos estudos (AJAYI-MOSES; OGIDI; AKINYELE, 2019; AMBROSIO *et al.*, 2019; FANCELLO *et al.*, 2016; LEMES *et al.*, 2018; PEDROSA *et al.*, 2019; VITO *et al.*, 2020).

Em relação às leveduras, Braddock (1999), Wilkins *et al.* (2007) e Vito *et al.* (2020) estudaram o efeito de OEs cítricos em *Saccharomyces cerevisiae*. No trabalho de Wilkins *et al.* (2007), foi levantada a hipótese de que a levedura é capaz de se adaptar ao óleo presente no meio e retomar o crescimento e produção de etanol.

Devido à atividade antimicrobiana apresentada pelos OEs, o fato de serem subprodutos de indústrias da região e a necessidade de propor uma alternativa ao tratamento ácido e aos antibióticos na fermentação para produção de etanol combustível, procurou-se avaliar neste trabalho a aplicação do OE de tangerina 'Fremont' IAC 543 cultivada em porta-enxerto *Poncirus trifoliata* na fermentação alcoólica para o controle da contaminação pela bactéria *Lactobacillus fermentum*.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a aplicação do OE de tangerina 'Fremont' cultivada em porta-enxerto *P. trifoliata* como substituto ou adjuvante do ácido sulfúrico no tratamento celular realizado na fermentação alcoólica para controle da contaminação por *L. fermentum*.

Específicos:

Avaliar o efeito do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae*, em condições proliferativas e não proliferativas, em cultura pura e co-cultura, sendo:

1. Condições proliferativas: avaliar o efeito do OE no ensaio de microdiluição, teste de difusão em disco e ensaios *time kill*, para cultura pura de *L. fermentum*;
2. Condições não-proliferativas: avaliar o efeito do pH em adição com OE para cultura pura de *L. fermentum*; e avaliar o efeito da concentração do OE em ensaios *time kill* (concentração pré-determinada em um período de 6 horas), e variando a concentração em tratamento de 2 horas, em cultura pura de *L. fermentum* e *S. cerevisiae*;
3. Co-cultura: avaliar o efeito do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em co-cultura, em condições não-proliferativas, simulando o tratamento celular; e avaliar o efeito do OE no processo fermentativo conduzido por *S. cerevisiae* e contaminado com *L. fermentum*, com adição no tratamento celular realizado entre os ciclos fermentativos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fermentação alcoólica

Devido ao esgotamento dos combustíveis fósseis tradicionais e a crescente preocupação com questões ambientais, a demanda por fontes alternativas de energia vem aumentando. O bioetanol (etanol derivado da fermentação de materiais vegetais) como energia limpa renovável pode contribuir para a diminuição dessa crise energética e da poluição ambiental (DONG; LIN; LI, 2015).

O etanol é composto por moléculas de carbono, hidrogênio e oxigênio, e sua principal característica química é um grupo hidroxila ligado a um radical alquil. É um líquido incolor, límpido, com aroma característico, altamente inflamável e um combustível viável com menor pressão de vapor que a gasolina, o que resulta na redução de emissões de gases poluentes. Devido a sua alta octanagem, o etanol pode ser adicionado à gasolina como regulador do potencial de detonação, substituindo aditivos tóxicos, como o tetraetil e o tetra metil chumbo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

O etanol é o biocombustível mais utilizado no segmento de transporte e o Brasil é o segundo maior produtor do mundo, atrás dos Estados Unidos. A principal diferença entre os processos produtivos desses dois países está na matéria-prima: enquanto no Brasil a maior produção de bioetanol é realizada a partir da cana-de-açúcar, nos Estados Unidos a matéria-prima é o milho (BONATELLI *et al.*, 2017).

Na safra 2020/2021, a região Centro-Sul do Brasil processou 605,46 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, registrando crescimento de 2,56% sobre as 590,36 milhões de toneladas da safra de 2019/2020. A expansão da moagem e melhora da qualidade da

matéria-prima refletiram na maior disponibilidade de produto, obtendo ganho de 7,11% na produção de açúcar e etanol comparando com o ciclo anterior. Do total de ATR (Açúcar Total Recuperável) processado na safra (144,72 kg de ATR por tonelada de cana-de-açúcar), 46,1% foram destinados à produção de açúcar, 18,0% à fabricação de etanol anidro e 35,9% à produção de etanol hidratado. Nessa safra foi obtida produção recorde de açúcar, mas a maior parcela da cana foi direcionada para a fabricação do biocombustível (UNICA, 2021).

Em função das medidas de restrição à mobilidade e menor demanda por combustíveis devido à pandemia da COVID-19, houve um recuo na produção de etanol na safra 2020/2021. A produção brasileira do biocombustível alcançou 30,37 bilhões de litros, sendo 8,70% menor em relação à safra 2019/2020. Deste total, 9,69 bilhões de litros foram de etanol anidro (-2,65%) e 20,68 bilhões de litros de etanol hidratado (-11,31%). Mesmo com essa queda, o volume produzido ainda é o terceiro maior registrado até então. Em relação ao etanol proveniente do milho, foram obtidos 2,57 bilhões de litros nesse ciclo, registrando aumento de 58,13% em relação à safra 2019/2020. Isso corresponde a 8,45% de participação na fabricação total de biocombustível no Centro-Sul (UNICA, 2021).

Em relação aos EUA, no último ano-safra do milho, o uso do cereal para a fabricação de etanol recuou 11% comparado com a média dos 3 anos anteriores, devido à redução da demanda por combustíveis. No atual ano de 2020/21, o uso do milho para a produção de etanol deve cair 9% em relação à mesma média. Porém, em junho de 2021, a indústria de etanol começou a operar em níveis próximos dos normais desde o início de 2020, devido à flexibilização das restrições relacionadas à pandemia de COVID-19. A produção atingiu 1,067 milhão de barris por dia (bpd), registrando uma máxima de 15 meses, com a quarta semana consecutiva superando a marca de 1 milhão de bpd. Ainda assim, os estoques permanecem no patamar mais baixo desde 2014 para este período do ano (UDOP, 2021).

O processo de produção de bioetanol a partir de caldo de cana ou melaço tem início com a limpeza e preparação da matéria-prima para obter o caldo rico em sacarose, através de lavagem a seco ou com água. Como a lavagem com água resulta na perda de açúcares fermentescíveis da cana para a água e esse processo também contribui para o aumento da contaminação microbiana no caldo, essa etapa foi substituída pela limpeza a seco, que ocorre através da remoção mecânica de partículas com a aplicação de ventiladores, e separação dos contaminantes minerais em mesas especiais (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Após a limpeza, a cana é processada para redução do tamanho das partículas e melhor extração de sacarose através da moagem. O caldo obtido é peneirado e é realizada a adição de dióxido de enxofre e hidróxido de cálcio, para a remoção de compostos indesejáveis no processo fermentativo. Para isso, a mistura é aquecida para floculação e sedimentação de impurezas, degradação do amido e proteínas e remoção de gases. O

caldo é então decantado para remoção de compostos não fermentescíveis. O teor de açúcar fermentescível é ajustado com a adição de melaço. Dessa forma, é obtido o mosto de cana, um substrato rico em sacarose e açúcares redutores de origem vegetal, adequado para a fermentação alcoólica (OLIVA-NETO *et al.*, 2013).

Os micro-organismos responsáveis pela produção do bioetanol por fermentação são as leveduras: fungos unicelulares, com células ovóides, elípticas ou arredondadas e parede celular rígida, com as mesmas organelas eucarióticas encontradas em outras células eucarióticas. A maioria apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20 °C e 30 °C, pH 3,2 – 6,0 e alta tolerância osmótica (BORZANI *et al.*, 2001).

As leveduras capazes de realizar respiração e fermentação são chamadas de aeróbias facultativas, e são capazes de realizar a assimilação do açúcar através de duas vias distintas. Nesses dois processos, a sacarose é clivada em ácido pirúvico na glicólise, através de uma sequência ordenada de reações enzimáticas. A diferença entre eles é o destino do ácido pirúvico na via metabólica e no resultado energético dessa via: na presença de oxigênio, o ácido pirúvico é destinado ao ciclo de Krebs e convertido em biomassa, dióxido de carbono e água, e cada molécula de glicose gera 38 moléculas de ATP; enquanto sob condições anaeróbias, as enzimas piruvato Descarboxilase e álcool-desidrogenase usam ácido pirúvico como substrato para a síntese de etanol e água, produzindo apenas 2 moléculas de ATP. Essas reações necessárias para a síntese de etanol podem ser afetadas por diversos fatores como pH, temperatura, inibidores e concentração de substrato (DONG; LIN; LI, 2015).

Dentre as leveduras capazes de sintetizar etanol, *S. cerevisiae* é a mais utilizada nos processos fermentativos, devido às características que apresenta, tais como, alta capacidade de hidrólise da sacarose, o substrato mais utilizado na produção industrial de bioetanol; alta resistência a condições de estresse ambiental (pH, osmolaridade, temperatura) e sobrevivência na presença de até 18% de etanol; crescimento rápido na presença de oxigênio e produção de etanol sob anaerobiose (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015).

S. cerevisiae possui ampla variação intraespecífica, portanto, apenas as cepas mais adaptadas para os processos industriais devem ser selecionadas. Esse processo de seleção depende de diversas características do processo fermentativo, como a sobrevivência das linhagens em condições de estresse, além do rendimento de etanol exibido. A dominância de uma cepa em relação a outra e a persistência da levedura ao longo dos ciclos da safra dependem de parâmetros cinéticos como rendimento, produtividade, taxa de crescimento específica e resistência ao estresse. Durante a safra, as células de levedura são recicladas duas vezes ao dia, totalizando quase 400 ciclos de fermentação, e devem manter sua viabilidade após o tratamento ácido para eliminação da contaminação bacteriana. Dessa

forma, a pressão seletiva exercida por esse tratamento celular influencia na obtenção de cepas adaptadas ao estresse e com altos rendimentos de etanol (CECCATO-ANTONINI; COVRE, 2020).

Duas cepas nativas de *S. cerevisiae*, PE-2 e CAT-1, isoladas do processo de fermentação industrial, demonstraram dominância, persistência e alto rendimento de etanol. Desde então, elas vêm sendo utilizadas em vários processos industriais em todo o Brasil. A linhagem PE-2, utilizada nesse trabalho, é altamente tolerante a ambientes ácidos, o que indica que o tratamento celular com ácido sulfúrico exerceu pressão seletiva sobre as populações microbianas nos tanques de fermentação (REIS *et al.*, 2017).

Uma outra característica interessante de cepas selecionadas, como a PE-2, é que em condição de depleção de carbono durante a fermentação, trealose e glicogênio são mobilizados via fermentação endógena, aumentando o conteúdo de proteína das células e a produção de etanol, o que é benéfico para a fermentação etanólica (CRAY *et al.*, 2013).

A caracterização genômica de três cepas de leveduras industriais, entre elas a PE-2, em comparação com uma cepa de referência, revelaram características interessantes, como genoma diplóide, natureza altamente heterozigótica e cepas heterotáticas; alta frequência de polimorfismos de nucleotídeo único; polimorfismos em tamanho, número e estrutura de cromossomos de cepas industriais; ausência de genes relacionados à floculação e diferença na sequência gênica de outros genes da família *FLO*; e várias cópias dos genes *SNO* e *SNZ* envolvidos na biossíntese de vitaminas (COUTOUNÉ *et al.*, 2017).

A fermentação industrial ocorre em três etapas: pré-fermentação (preparação), fermentação (fase tumultuada) e pós-fermentação (fase complementar). A pré-fermentação é caracterizada pela fase *lag* das células de levedura após a inoculação no mosto, com ocorrência de um aumento lento e gradual da temperatura e pequena liberação de dióxido de carbono, para obtenção de grande quantidade de células com poder máximo de fermentação em cerca de cinco horas. A fase tumultuada dura cerca de dez horas, com um rápido aumento de temperatura, liberação de grandes quantidades de dióxido de carbono, aumento da acidez, diminuição da densidade do mosto devido à produção de álcool e consumo equivalente de açúcares. A fase complementar dura cerca de sete horas, e é caracterizada pela liberação contínua de dióxido de carbono e diminuição lenta e constante da temperatura (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

No Brasil, a fermentação em batelada alimentada e a fermentação contínua são os processos mais utilizados, sendo que o primeiro método é o empregado na maioria das usinas de bioetanol (aproximadamente 80%). A fermentação em batelada alimentada consiste na alimentação do biorreator com substrato fermentescível sob condições controladas, para manutenção da levedura e do produto até o final da fermentação. Dessa forma, esse é um processo flexível, que possibilita a aplicação de diferentes taxas de

alimentação e controle dos nutrientes adicionados, favorecendo a via metabólica de interesse (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Uma característica do processo fermentativo que permitiu um grande avanço na produção de etanol foi o reciclo celular. Esse processo, denominado "Melle-Boinot", foi criado nos anos 30 por Firmino Boinot na França, e consiste na reutilização das células de levedura que são separadas do vinho fermentado através de centrifugação. Antes da reutilização, as células de levedura são submetidas a um processo de descontaminação com ácidos. Durante a safra, a levedura pode ser reciclada cerca de 400 a 600 vezes, dependendo da viabilidade celular e da contaminação bacteriana (LOPES *et al.*, 2016).

A produção do bioetanol é finalizada com a destilação, um processo de separação de misturas líquidas, para obtenção de maiores concentrações de bioetanol. A destilação é realizada com a vaporização e condensação do mosto fermentado, que originalmente apresenta 7% a 12% em volume de etanol e 88% a 93% em volume de água. Essa purificação é extremamente importante, pois o mosto fermentado pode conter glicerol, álcoois superiores, furfural, aldeído acético, ácidos e sólidos como fragmentos de cana de açúcar, açúcares não fermentescíveis e gases como CO₂ e SO₂ (BORZANI *et al.*, 2001).

3.2 Contaminação do processo fermentativo

No processo de produção industrial do bioetanol combustível não é viável a manutenção de condições assépticas, pois devido ao alto volume de substrato que é processado, seria necessária uma alta demanda de energia para a esterilização. Dessa forma, o desenvolvimento de bactérias e outras leveduras é frequente durante o processo (REIS *et al.*, 2018). O nível de contaminação pode ser influenciado por diversos fatores, como condições ambientais, qualidade e práticas aplicadas à matéria-prima e o reciclo de células de levedura durante a safra. Conseqüentemente, os parâmetros de fermentação e o desempenho da levedura serão afetados, influenciando no rendimento e produtividade do processo (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

A cana-de-açúcar como matéria-prima, assim como seus produtos (caldo de cana e melaço) e outras fontes, como água de lavagem e diluição, podem representar fontes importantes de contaminação do processo de fermentação. A cana-de-açúcar transportada do campo para a planta de processamento pode transportar microbiota presa externamente ao caule, raízes e rizoides ou endofiticamente ao caule; o armazenamento inadequado do caule colhido representa perdas de processo, pois quando a matéria-prima não é processada imediatamente, a cana-de-açúcar armazenada apresenta deterioração devido ao aumento dos níveis de contaminantes; a microbiota encontrada na cana não processada pode ser transferida para o caldo e persistir durante o processo; a água de lavagem e de

diluição também podem carregar micro-organismos indesejáveis no processo (SHARMIN *et al.*, 2013).

As características físico-químicas da matéria-prima e do processo de fabricação (78% a 86% de água, 10% a 20% de sacarose, 0,1% a 2% de açúcares redutores, 0,3% a 0,5% de cinza e 0,5% a 1,0% de compostos nitrogenados e micronutrientes minerais, pH na faixa de 4,5 - 5,5 e temperatura de 26 °C a 35 °C, no caldo de cana) favorecem o estabelecimento de várias bactérias (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

Devido às mudanças no metabolismo da sacarose, foi mostrado que a presença de bactérias contaminantes acima da concentração de 10^7 UFC/mL, pode levar a perdas de 1,5% a 5% no rendimento, podendo chegar a 30% em casos mais extremos, ocasionando perda da viabilidade comercial (BREXÓ; SANT'ANA, 2017). Em uma destilaria brasileira de tamanho médio, estima-se que cerca de 20.000 litros de etanol são perdidos por dia quando a contaminação bacteriana atinge cerca de 10^8 células/mL (BASSO *et al.*, 2014).

Os principais contaminantes da produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar são as bactérias do ácido lático (LAB). As LABs geralmente não são móveis, não esporulam, são catalase negativas e se destacam pela produção de ácido lático como principal metabólito fermentativo. São anaeróbias, capazes de crescer rapidamente e tolerar altas temperaturas (30 - 45 °C) e pH baixo. São bactérias aerotolerantes e classificadas em homofermentativas quando o único produto de fermentação é o ácido lático ou heterofermentativas, quando outros produtos metabólicos são formados (RICH *et al.*, 2015).

Entre as LABs contaminantes do processo fermentativo, estão os *Lactobacillus*. Eles apresentam células em forma de bastonete, com comprimento, espessura e curvatura variáveis, classificados em homo ou heterofermentativos de acordo com seus produtos metabólicos, resistentes a pH baixo, baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de etanol, o que justifica a prevalência desses micro-organismos na produção de etanol (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

Bonatelli *et al.* (2017) caracterizaram a comunidade bacteriana contaminante do processo de fermentação de etanol de cana-de-açúcar por meio de método independente de cultivo, e foram identificadas mais de 98% das sequências pertencentes ao filo *Firmicutes* (Domínio Bacteria). Foram relatados mais de 35 gêneros, dos quais 92% a 99% das sequências correspondiam ao gênero *Lactobacillus*.

Costa *et al.* (2015) caracterizaram os contaminantes presentes em todas as etapas do processo de produção industrial de cana-de-açúcar, e *Lactobacillus* foi o gênero predominante nas amostras mistas de caldo e vinho (16,7 a 62,6% das sequências). Os autores concluíram que, devido ao elevado número de sequências desse gênero em vinho, quando comparado com os estágios anteriores do processo, o aumento desses micro-organismos deve ocorrer durante o processo. Eles parecem ter vantagem seletiva sobre

outras bactérias no final do processo, provavelmente devido à tolerância ao etanol que apresentam e à produção de ácidos que podem matar outras bactérias e leveduras. Assim, parece que o próprio processo seleciona fortemente os *Lactobacillus*. A fonte de contaminação pode ser por meio dos equipamentos das fermentações anteriores, já que esse gênero é capaz de produzir biofilmes.

Basso *et al.* (2014) investigaram as interações entre *Lactobacillus* homo e heterofermentativo e *S. cerevisiae*. Enquanto a cepa homofermentativa (*L. plantarum*) apresentou maior efeito inibitório sobre a levedura quando presente em igual número de células (10^6 células viáveis/mL) em condições de laboratório, nas fermentações simulando o processo industrial de etanol combustível, utilizando cana-de-açúcar e alta densidade de células de levedura ($\sim 5 \times 10^8$ células de levedura/mL e 10^7 células de bactéria/mL), a cepa heterofermentativa (*L. fermentum*) foi mais prejudicial sendo, portanto, mais eficiente na competição com a levedura pelos açúcares durante a fermentação. Ambos os tipos metabólicos bacterianos causaram redução no rendimento de etanol durante a fermentação da levedura, mas esse efeito foi maior com a cepa heterofermentativa. O aumento da produção de glicerol pela levedura, associado a maior concentração de metabólitos produzidos pelas bactérias (ácidos lático e acético, e manitol) e maior crescimento bacteriano, levaram à diminuição do rendimento de etanol na fermentação contaminada com a cepa heterofermentativa.

Esses contaminantes reduzem a viabilidade celular da levedura devido à competição por nutrientes e efeitos deletérios de ácidos e outros compostos ativos derivados do metabolismo bacteriano. Outra consequência da contaminação, especialmente por *L. fermentum*, é a floculação. Esse fenômeno pode resultar na diminuição da taxa de fermentação e dificultar as operações de centrifugação, pois a levedura sedimenta e permanece no fundo das cubas de fermentação. Além disso, a floculação da levedura ocasiona perdas devido ao desvio do metabolismo, resultando na formação de goma, ácidos e toxinas, levando à redução da viabilidade das células da levedura, o que afeta negativamente a produtividade (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

Quando a contaminação bacteriana atinge níveis elevados, comprometendo o rendimento e a produtividade de etanol, são necessárias estratégias para o controle do crescimento bacteriano, para manter a eficiência do processo. O método tradicionalmente empregado para o controle da contaminação nas unidades produtoras de etanol é o tratamento celular com ácido sulfúrico. Essa técnica consiste na mistura da massa celular obtida após a centrifugação do mosto fermentado, com uma solução de água com ácido sulfúrico a pH 2,0 – 2,5, por um período de 1 a 2 horas. Após o tratamento, essa massa celular é utilizada novamente na fermentação (COSTA; CERRI; CECCATO-ANTONINI, 2017).

Essa técnica, apesar de diminuir significativamente a carga de bactérias contaminantes, pode não ser totalmente eficaz e afetar também a levedura, comprometendo o desempenho da fermentação. Além disso, o ácido sulfúrico é corrosivo, representa um risco à saúde dos trabalhadores e aumenta o custo de tratamento do efluente do processo (CECCATO-ANTONINI, 2018).

Quando o tratamento com ácido não é suficiente para controlar a contaminação, a aplicação de antibióticos é realizada. Os mais aplicados na fermentação são penicilina, estreptomicina, tetraciclina, monensina e virginiamicina. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Penicilina V para *L. fermentum* foi de 0,1 - 0,2 mg/L, porém, na produção de etanol combustível, esse antibiótico é adicionado em concentrações acima de 1,5 mg/L, pois algumas bactérias podem degradá-lo enzimaticamente, é instável em pH abaixo de 5 e rapidamente inativado a 35 °C. Para virginiamicina, a CIM para *L. fermentum* é de 2 mg/L ou menos. A monensina, agente antibacteriano mais utilizado nas destilarias brasileiras, sendo o Kamoran® HJ sua forma comercial mais conhecida, apresenta dose recomendada para controlar a contaminação bacteriana de 0,3 – 3 mg/L adicionado ao caldo de fermentação (OLIVA-NETO *et al.*, 2013).

O uso de antibióticos é limitado devido ao surgimento de cepas resistentes. Além disso, eles ficam retidos na massa de levedura que pode ser aplicada na alimentação animal, podendo induzir resistência nos patógenos animais, e sua adição em grandes quantidades não é viável economicamente (CECCATO-ANTONINI, 2018).

Assim, são necessários métodos mais seguros, mais eficazes e ambientalmente corretos para controlar contaminantes bacterianos durante as fermentações de bioetanol.

3.3 Óleos essenciais cítricos

O gênero *Citrus* pertence à família *Rutaceae*, que inclui cerca de 140 gêneros e 1300 espécies. Dentre elas, pode-se citar *C. sinensis* (laranja), *C. reticulata* (tangerina), *C. aurantifolia* (lima), *C. limon* (limão), *C. paradisi* (toranja) e *C. bergamia* (bergamota). São originárias das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, como Austrália e África, e foram levadas para a Europa na época das Cruzadas, chegando ao Brasil no século XVI, trazidos pelos portugueses. Assim, tornaram-se as culturas de frutas de maior valor mundial. Suas árvores apresentam porte médio e copa densa, de formato normalmente arredondado, e seus frutos contêm diversos metabólitos secundários como ácido ascórbico, flavonóides, compostos fenólicos e pectina, que são reconhecidos por possuírem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo benéficas para a saúde humana (BORA *et al.*, 2020).

Os maiores produtores de citros são Brasil, China e Estados Unidos, com participação de 21,4%, 10,5% e 8,02% da produção global, respectivamente, representando

cerca de 45% do total mundial (FAOstat 2018). No Brasil, a produção de citros ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde encontram-se cerca de 85% da produção brasileira de laranjas e também, destaca-se a produção de Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott (LATORRE *et al.*, 2019).

A laranja é a fruta mais produzida no Brasil, e seu cultivo ocorre em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal, o que torna o país o maior produtor de laranja doce do mundo, seguido pelos Estados Unidos, China e Índia. No Brasil, o estado de São Paulo, com 77% da produção nacional, é o que mais produz, seguido de Minas Gerais (6%), Paraná (5%) Bahia (4%) e Rio Grande do Sul (2%). No estado de São Paulo e o Triângulo Mineiro (cinturão agrícola), a produção na safra 2019/2020 foi de 384,87 milhões de caixas de 40,8 kg, e quase a totalidade dessa produção é destinada para a indústria do suco (CASERTA *et al.*, 2020).

Em escala mundial, cerca de 40% da produção de frutas cítricas é destinada à produção de suco, o que gera grande quantidade de resíduos. A casca representa cerca de 25% a 40% do peso total dos frutos e, em média, é gerado 0,5 kg de resíduo/kg de fruto durante a produção do suco, sendo que a maior parte desse resíduo gerado se refere à casca dos frutos. Na camada externa das cascas, conhecida como flavedo, ficam localizados os óleos essenciais, reconhecidos por apresentarem propriedades biológicas, como atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica. As cascas são, portanto, um importante subproduto com potencial de aproveitamento (FARAHMANDFAR *et al.*, 2020).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais cítricos. A maior parte das unidades de produção nacionais, 49,15%, se refere a unidades produtoras de óleo essencial de laranja. Porém, o maior montante de produção, em kilogramas, é representado pelos óleos essenciais de limão, atingindo seu ápice em 2017, com 1.413.936 kg (SILVA *et al.*, 2019).

As plantas produzem diversos metabólitos secundários e alguns têm a função de defesa contra ataques de micro-organismos, e os óleos essenciais estão entre esses compostos, apresentando propriedades antimicrobianas (OKUNOWO *et al.*, 2013).

A produção global de OEs cítricos é de aproximadamente 16.000 toneladas/ano e o preço é de cerca de US\$ 14.000/tonelada no mercado internacional, sendo produtos de grande demanda de mercado. Esses compostos se destacam por terem diversas aplicações em produtos agrícolas, farmacêuticos, cosméticos e na indústria de alimentos (DENG *et al.*, 2020).

Os OEs cítricos são uma mistura de hidrocarbonetos complexos e derivados oxigenados de origem terpenóide e não-esteróide, constituídos por grupos funcionais como

aldeídos, álcoois, cetonas e outras moléculas complexas, como ésteres e ácidos orgânicos. Os compostos voláteis compõem 85% a 99%, e o restante corresponde aos não voláteis. Os compostos voláteis contêm monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenóides. A composição varia com a variedade, estação, localização geográfica e estágio de amadurecimento da fruta, mas de modo geral, os principais componentes são os monoterpenos, que representam cerca de 97% dos OEs cítricos, enquanto os álcoois, aldeídos e ésteres representam 1,8% a 2,2%. O componente majoritário mais comum é o limoneno, e sua concentração varia entre 32% e 98%, dependendo da variedade (BORA *et al.*, 2020).

O limoneno é um terpeno monocíclico. Os terpenos são encontrados abundantemente na flora brasileira, estão presentes em óleos voláteis, e apresentam uma estrutura básica de isopropeno (C_5H_8). O limoneno, 4-metil-1-isoprenil ciclohexeno, faz parte da estrutura de mais de 300 plantas, possui duas formas com atividade óptica: L-limoneno, com odor de pinho, e D-limoneno, com odor cítrico. A forma mais comum na natureza é o D-limoneno, presente em diversas frutas cítricas, muito utilizado como aditivo de fragrância e sabor na indústria alimentícia, de cosméticos e de produtos de limpeza. O limoneno possui atividades antifúngica e antibacteriana, e essas propriedades são devidas à sua afinidade com a membrana lipídica, o que contribui com o aumento da fluidez das bicamadas lipídicas (MARQUEZIN *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2018).

Os OEs são obtidos a partir da matéria-prima através de diversas técnicas, como hidrodestilação, destilação a vapor, destilação a seco ou processos mecânicos (HASHMINYA; DEGHANNYA, 2020). Esses métodos convencionais são econômicos e de fácil implementação. Existem, também, outras técnicas mais modernas, como extração com fluido supercrítico, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom. Cada técnica apresenta suas vantagens e desvantagens, e a escolha do método depende das características do composto de interesse. Na hora da escolha, deve ser levado em consideração que o método e o solvente utilizados afetarão a qualidade e quantidade do produto em questão, portanto devem ser selecionados com cuidado (LIANG; ZHANG; FANG, 2020; SURESH *et al.*, 2020).

A hidrodestilação é um dos métodos convencionais mais simples para extração de OEs e apresenta a vantagem de a água ser imiscível com a maior parte das moléculas terpênicas presentes no óleo essencial. Nessa técnica, a matéria prima é imersa em água e exposta à água fervente, liberando o OE por evaporação. Apesar dessa exposição, a água circundante atua como uma barreira protetora, evitando que o OE extraído superaqueça. O princípio de operação dessa técnica é a destilação azeotrópica: a água e as moléculas do OE formam uma mistura heterogênea, formando um vapor que se liquefaz no condensador através do resfriamento indireto com a água. A mistura do condensador, então, é transferida

para o separador, onde o OE é recuperado através de decantação simples (SURESH *et al.*, 2020).

A atividade antibacteriana dos OEs pode ser atribuída à natureza hidrofóbica da estrutura dos hidrocarbonetos e a hidrofobicidade dos grupos funcionais presentes. O limoneno, por ser um monoterpene hidrofóbico, consegue passagem entre os lipídeos das membranas celulares bacterianas e mitocôndrias, rompendo suas estruturas e aumentando a permeabilidade, levando ao vazamento de íons e outros componentes celulares. A despolarização da membrana diminui as atividades fisiológicas das células, e o dano causado ao DNA sob condições de estresse compromete a replicação. As bactérias são capazes de tolerar a liberação de quantidades limitadas desses materiais, mas uma perda significativa pode levar à morte celular. Porém, se parte da população microbiana permanece sem danos, a exposição ao antimicrobiano não necessariamente resultará em morte celular e inativação. A permeabilização pode, também, facilitar a absorção dos constituintes do OE através das membranas, permitindo que atinjam seus alvos, comprometendo diversas funções fisiológicas nas células, levando à morte celular (HASHEMINYA; DEGHANNYA, 2020; PEDROSA *et al.*, 2020).

A atividade antibacteriana também está correlacionada com os compostos fenólicos presentes em menor quantidade, como α -pineno, sabineno, β -mirceno e linalol que, desempenham um efeito sinérgico, apresentando um amplo espectro de atividade antimicrobiana, como observado no trabalho de Farahmandfar *et al.* (2020). Os compostos fenólicos podem inibir o crescimento de bactérias, fungos e protozoários, dependendo da estrutura química do composto e da espécie do micro-organismo (LANDETE, 2012).

Estudos demonstram que os OEs agem sobre a parede celular e membrana plasmática dos micro-organismos. Fanello *et al.* (2020) testaram o vapor do OE da folha de limão em *Listeria monocytogenes*, e as imagens obtidas por microscopia eletrônica das amostras não tratadas com OE revelaram a presença de estruturas fibrilares que não eram observadas nas amostras tratadas com o OE, provavelmente devido à atividade do OE na estrutura celular da bactéria. Além disso, foram visualizadas estruturas coaguladas nas células tratadas, que eram, provavelmente, proteínas expulsas da membrana celular e citoplasma, empurradas através de orifícios formados na parede celular pelo óleo.

Gao *et al.* (2020) também avaliaram as alterações morfológicas causadas por um OE cítrico. Foi observado o efeito do OE de cidreira em células de biofilme de *L. monocytogenes*: enquanto as células do grupo controle apresentaram superfície lisa, as células expostas ao OE apresentaram superfície enrugada e colapsada. Foi observada, também, a ocorrência de lise celular.

O OE utilizado nesse estudo foi extraído da tangerina 'Fremont' IAC 543 cultivada em porta-enxerto *Poncirus trifoliata*. O Brasil é o sexto maior produtor mundial de tangerinas,

com cerca de 49 mil hectares de área plantada, e produção de aproximadamente 998 mil toneladas por ano. Nas regiões sul e sudeste concentram-se mais de 94% da produção nacional de tangerinas. O cultivo de tangerineiras desempenha um expressivo papel socioeconômico, pois sua cultura gera grande quantidade de empregos diretos, na produção da fruta, e também emprega mão de obra nas indústrias que processam o fruto para obtenção de suco, néctar, refresco, óleos essenciais, essência, semente e bagaço (FAO, 2018).

A tangerina 'Fremont' IAC 543 é um híbrido resistente à mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*), doença fúngica que mais afeta a cultura. Essa variedade foi obtida a partir do cruzamento das tangerinas Clementina (*C. clementina* hort. ex Tanaka) e Ponkan (*C. reticulata* Blanco), e é cultivada em diferentes porta-enxertos, como limão cravo, citrumelo swingle, trifoliata e trifoliata *Flying Dragon*. A enxertia é um método empregado na propagação de plantas frutíferas, e pode influenciar nas características dos frutos, como composição e conteúdo dos OEs (MARQUES, 2019).

Diante do exposto, fica clara a vantagem que os OEs apresentam quando comparados com as técnicas tradicionais de controle da contaminação na produção do bioetanol: é pouco provável que induzam resistência microbiana, quando comparados aos antibióticos, pois são compostos por diversas moléculas, e são ambientalmente corretos e não apresentam riscos para o manipulador, comparados ao ácido sulfúrico.

Há poucos trabalhos na literatura mostrando a ação dos OEs cítricos sobre *L. fermentum*, um dos contaminantes bacterianos mais frequentes da fermentação etanólica. O presente trabalho se propõe a avaliar o potencial de uso do OE de tangerina 'Fremont' cultivada em porta-enxerto *P. trifoliata* (doravante chamado de OE de tangerina) para reduzir a contaminação por essa bactéria, mas que afete minimamente a levedura do processo, *S. cerevisiae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do OE de tangerina

O OE foi obtido de tangerinas 'Fremont' cultivadas em porta-enxerto *P. trifoliata*. As frutas foram colhidas no Sítio Lagoa Bonita, situada no município de Mogi Mirim – SP, sob as coordenadas geográficas 22°25'22.94''S, 47°05'35.61''O e altitude de 652 m, de forma aleatória de pelo menos 3 diferentes árvores e em diferentes alturas das copas das árvores. A colheita das amostras foi realizada no mês de setembro de 2017. O OE foi extraído via hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado. Para o procedimento, 120 g de casca foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm², inseridos em um balão de fundo redondo de 2 L e a amostra foi hidrodestilada durante 1 hora. As extrações foram realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) – Cordeirópolis, sob a supervisão do Dr. Fernando Alves de Azevedo.

4.2 Análise do OE de tangerina por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

Para a preparação da amostra, foi transferida uma alíquota de 30 mg do OE para um vial de 2 mL, onde foi adicionado 1 mL de acetato de etila, e essa solução foi levada para análise por GC-MS. A coluna capilar utilizada foi a HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), as temperaturas foram de 220 °C no injetor, 60 °C na coluna, aumentando 3 °C / min até atingir 240 °C, e 250 °C no detector, volume injetado de 1 µL e vazão do gás de arraste (He) de 1 mL/min. A análise foi realizada no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,

Biológicas e Agrícolas), da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) em dezembro de 2020.

4.3 Análise do teor de compostos fenólicos totais (CFT) no OE

Foi usado o método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações, conforme descrito por Hasheminya e Dehghannya (2020). Foram adicionados aos poços da microplaca, 10 µL do OE e 25 µL do reagente Folin-Ciocalteu, e essa mistura foi incubada a 25 °C por 5 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 25 µL de uma solução carbonato de sódio 20% (m/v) e 140 µL de água destilada. A absorbância das amostras foi lida após 30 minutos a 760 nm, utilizando o leitor de microplacas Tecan Infinite® M 200. A microplaca utilizada foi a “Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene” esterilizada, com 96 poços.

A curva padrão foi preparada com ácido gálico (0 – 100 µg/mL) e os resultados foram expressos em mg de equivalência de ácido gálico por g (mg EAG/g), conforme a equação linear obtida a partir da curva padrão: $y = 0,0028x + 0,0042$ ($R^2 = 0,9791$), em que y e x representam a absorbância e a concentração de AG, respectivamente.

4.4 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram a bactéria *L. fermentum* CCT0559 (ATCC9338) e a levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2, pertencentes ao banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras. A bactéria é mantida em meio MRS (10 g/L peptona, 8 g/L extrato de carne, 4 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 1 g/L Tween 80, 2 g/L fosfato de potássio, 3 g/L acetato de sódio anidro, 2 g/L citrato de amônia dibásico, 0,2 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês e 20 g/L ágar, em água destilada) e a levedura em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L ágar, em água destilada), a 4 °C.

Esses meios foram utilizados em todas as etapas descritas posteriormente, com remoção do ágar para o meio na forma líquida. Os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C, 1 atm, por 20 minutos.

4.5 Preparação dos inóculos bacteriano e da levedura

Para o preparo do inóculo da levedura, foram transferidas duas alçadas da levedura recém-crescida em placa de Petri com o meio YPD, para 50 mL do meio líquido em frascos Erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C e 160 rpm por 16 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer utilizando a solução do corante azul de metileno-citrato de sódio (LEE; ROBINSON; WANG, 1981) para padronização do inóculo em 10^7 ou 10^9 células viáveis/mL, dependendo do experimento a ser realizado.

Para o preparo do inóculo da bactéria, foram transferidas duas alçadas da cultura da bactéria recém-crescida em placa de Petri com o meio MRS, para 50 mL do meio líquido em frascos Erlenmeyers de 125 mL. Os frascos foram mantidos a 35 °C e 150 rpm por 16 horas. Após a incubação, a padronização do número de bactérias foi realizada através da leitura da absorbância (a 540 nm) em espectrofotômetro ThermoBiomate®, com base em uma curva-padrão “Absorbância *versus* número de UFC/mL”, de forma que um valor de absorbância de aproximadamente 0,6 é equivalente a aproximadamente 10⁸ UFC/mL. As concentrações variaram em 10⁷ e 10⁸, dependendo do experimento a ser realizado.

4.6 Otimização da concentração de Tween 80 como emulsificante do OE

Foram preparadas diluições com Tween 80 e OE nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 (Tween:OE), completando o volume final para 5 mL com água destilada. As misturas foram agitadas e permaneceram em descanso durante 5 minutos. Após esse tempo, a condição das emulsões formadas foi verificada visualmente, verificando em qual proporção obteve-se mistura adequada do óleo com a água.

4.7 Efeito do OE de tangerina em meio sólido em *L. fermentum* (disco-difusão)

O experimento de disco-difusão foi realizado a partir de metodologia adaptada de NCCLS (2003). A bactéria foi cultivada em meio MRS sólido durante 48 horas, a 35 °C, e transferida para tubo Falcon com 5 mL de meio MRS, incubado por 24 horas, a 35 °C e 150 rpm. Após esse tempo, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 540nm, e foi realizada diluição para obter DO_{540nm} de aproximadamente 1,0.

Foram preparadas soluções de OE nas concentrações de 0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2% e 100% v/v, com emulsificante Tween 80 na proporção de 1:3 (tween:OE), completando o volume final para 500 µL com água destilada. Discos de filtro de papel de 5 mm de diâmetro foram saturados com 20 µL das soluções preparadas.

Para a montagem do experimento, foram adicionados 100 µL do inóculo padronizado na placa de petri com meio de cultura, espalhando o conteúdo com alça de Drigalski. Os discos com as soluções de OE foram adicionados na superfície das placas, após a secagem do inóculo, sendo 5 discos da mesma concentração por placa. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C, e após esse tempo foi observada a formação de halo de inibição do crescimento.

4.8 Efeito do OE sobre *L. fermentum* em condições proliferativas (ensaio de microdiluição)

As curvas de crescimento da bactéria *L. fermentum* em meio MRS líquido acrescido de diferentes concentrações do OE foram obtidas através do teste de microdiluição,

segundo metodologia adaptada de CLSI (2012), utilizando o leitor de microplacas Tecan Infinite® M200. A microplaca utilizada foi a “Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene” esterilizada, com 96 poços.

O inóculo bacteriano foi padronizado em DO_{540nm} entre 0,2 e 0,4. Foram adicionados assepticamente aos poços da microplaca 161 μ L de meio MRS estéril, 28 μ L das soluções do OE nas concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4% e 12,8% v/v diluído em água destilada e 21 μ L do inóculo de *L. fermentum*. As concentrações de OE foram calculadas em relação ao volume total do poço da microplaca (210 μ L). Foram também realizados dois tratamentos controle: meio MRS sem inoculação da bactéria e sem adição de OE; e meio MRS com inoculação da bactéria e sem adição do OE, sendo utilizados 210 μ L de meio MRS ou 161 μ L de meio MRS, 28 μ L de água destilada e 21 μ L de inóculo de *L. fermentum*, respectivamente. Todos os tratamentos foram realizados com 3 repetições.

A microplaca foi levada ao leitor de microplacas e incubada a 35 °C e 150 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital) por 21 horas. O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorvância a 540 nm a cada 15 minutos. A concentração inicial de bactérias foi de aproximadamente $1,7 \times 10^7$ UFC/mL.

Com os resultados obtidos de absorvância ao longo do tempo, foi calculada a velocidade específica de crescimento máxima (μ , h^{-1}) por meio da regressão linear dos dados de \ln da absorvância *versus* tempo na fase exponencial, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica de crescimento máxima. Foi também avaliada a duração da fase *lag* de crescimento (em h) e calculada a variação de absorvância (absorvância ao final de 21 horas – absorvância inicial) para cada concentração de OE testada.

4.9 Efeito do pH em adição com OE para o controle de *L. fermentum* em condições não-proliferativas

O inóculo bacteriano foi padronizado em $DO_{540nm} \sim 0,6$ (10^8 UFC/mL). Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 45 mL de solução ácida pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0, e água destilada sem ajuste de pH. A solução ácida foi preparada com a adição de ácido sulfúrico concentrado à água destilada até obtenção do pH desejado, monitorando os valores de pH em pH-metro digital. Os frascos com a solução ácida ou água foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Às soluções ácidas e água já esterilizadas foram adicionados 5 mL do inóculo (concentração final $\sim 10^7$ UFC/mL), 100 μ L de OE e 33 μ L de Tween 80 (proporção 1:3 Tween:OE), para o volume final de 50 mL (OE na concentração final de 0,2% v/v). Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 35 °C e 150 rpm por 2 horas. Foram

feitos dois tratamentos controle: pH 2,0, e água sem ajuste de pH, ambos sem adição do OE.

Foram retiradas amostras da massa celular antes e após o tratamento para análise da viabilidade celular. As amostras foram plaqueadas em meio MRS e incubadas a 35 °C por 48 horas para contagem do número de UFC/mL. Os resultados foram expressos em log do número de UFC de bactérias/mL.

4.10 Efeito do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em condições proliferativas e não-proliferativas (ensaios *time-kill*)

Os ensaios *time-kill* foram realizados a partir da metodologia adaptada de GUCWA *et al.* (2018). O inóculo bacteriano foi padronizado em $DO_{540nm} \sim 0,6$ (10^8 UFC/mL), a seguir diluído 10 vezes para obter a concentração de 10^7 células/mL. O inóculo da levedura foi padronizado em 10^7 células viáveis/mL por meio de contagem em câmara de Neubauer após coloração com solução de azul de metileno.

Para os ensaios em condições não-proliferativas para *L. fermentum*, em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 45 mL de água esterilizada, 5 mL do inóculo e o OE na concentração de 0,2% v/v diluído em Tween 80 na proporção de 1:3 (Tween:óleo) em relação à concentração de OE. Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 35 °C e 150 rpm, durante 6 horas. Além do tratamento com OE foram realizados três controles: sem adição do óleo; com adição de 3 mg/L do antibiótico monensina sódica; e com adição de 33 µL de Tween 80 (mesmo volume utilizado para o preparo da solução de OE, concentração 0,066%).

Foram retirados 5 mL de amostras da massa celular a cada 1,5 hora para análise da viabilidade celular. As amostras foram plaqueadas em meio MRS e incubadas a 35 °C para contagem do número de UFC/mL.

Para o preparo da solução do antibiótico monensina sódica, foram pesados 0,03 g do produto Kamoran®, diluindo em algumas gotas de etanol e completando com 100 mL de água destilada estéril (concentração 300 mg/L). Dessa solução estoque, 0,5 mL foi adicionado aos frascos contendo 50 mL como volume final (concentração final de 3 mg/L Kamoran®).

Para os ensaios em condições proliferativas para *L. fermentum*, foram realizados os tratamentos com OE na concentração de 0,2% e sem óleo, em MRS líquido. Os procedimentos foram os mesmos descritos anteriormente para os testes em condições não-proliferativas.

Para a levedura *S. cerevisiae*, foram realizados somente os testes em condições não-proliferativas na presença (0,2% v/v) e na ausência do OE da mesma forma descrita

para a bactéria, sendo que a temperatura de incubação dos frascos e das placas foram 30 °C e agitação de 160 rpm.

Os resultados foram expressos em log do número de UFC de bactérias ou leveduras/mL.

4.11 Efeito da concentração de OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em condições não-proliferativas

O inóculo bacteriano foi padronizado em $DO_{540nm} \sim 0,6$ (10^8 UFC/mL), a seguir diluído 10 vezes para obter a concentração de 10^7 UFC/mL. O inóculo da levedura foi padronizado em 10^7 células viáveis/mL por meio de contagem em câmara de Neubauer após coloração com solução de azul de metileno.

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 45 mL de água esterilizada, 5 mL do inóculo e o OE nas concentrações de 0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,2% v/v, diluído em Tween 80 na proporção de 1:3 (Tween:óleo). Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 35 °C e 150 rpm para a bactéria, e 30 °C e 160 rpm para a levedura, por 2 horas.

Foram retiradas amostras da massa celular antes e após o tratamento para análise da viabilidade celular. As amostras foram plaqueadas em meio MRS e incubadas a 35 °C para a bactéria, e meio YPD a 30 °C para a levedura, por 48 horas para contagem do número de UFC/mL. Os resultados foram expressos em log do número de UFC de bactérias ou leveduras/mL.

4.12 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em co-cultura em condições não-proliferativas

O inóculo bacteriano foi padronizado em $DO_{540nm} \sim 0,6$ (10^8 UFC/mL), e o inóculo de levedura em 10^9 células viáveis/mL por meio de contagem em câmara de Neubauer após coloração com solução de azul de metileno.

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 40 mL de água esterilizada, 5 mL do inóculo de cada micro-organismo e o OE na concentração de 0,05% v/v, diluído em Tween 80 na proporção de 1:3 (Tween:óleo). Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 30 °C e 160 rpm por 2 horas.

Nessa etapa, foi reavaliada a ação do OE na concentração de 0,05% v/v sobre a bactéria em cultura pura, repetindo o experimento conforme descrito no item 4.11.

Foram retiradas amostras da massa celular antes e após o tratamento para análise da viabilidade celular. As amostras foram plaqueadas em meio MRS com actidione (concentração final 5 mg/L) e incubadas a 35 °C para a bactéria, e meio YPD com cloranfenicol (concentração final 50 mg/mL) a 30 °C para a levedura, por 48 horas para

contagem do número de UFC/mL. Os resultados foram expressos em log do número de UFC de bactérias ou leveduras/mL.

4.13 Aplicação do OE na concentração de 0,05% v/v no tratamento celular entre os ciclos fermentativos com caldo de cana

Para a fermentação, o inóculo de levedura foi padronizado em 10^9 células viáveis/mL e a bactéria em 10^8 células/mL. As células foram ressuspensas em caldo de cana 17 °Bx, pH 5,5. O caldo de cana utilizado foi obtido na Usina São João, safra 2018/2019, e permaneceu armazenado em garrafas plásticas em temperatura de freezer (-10 °C) até o momento do uso, quando foi autoclavado.

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em triplicata, foram adicionados 40 mL do caldo de cana, 1 mL/L de solução de sais estéril (50 g/L de sulfato de amônio, 20 g/L de fosfato monobásico de potássio, 10 g/L de sulfato de magnésio, 1 g/L de sulfato de zinco e 1 g/L de sulfato de manganês), e 5 mL do inóculo padronizado de cada micro-organismo, mantidos em estufa sem agitação, a 30 °C. Foram realizados 3 ciclos de fermentação de 9 horas, intercalados com o tratamento celular.

Ao término do ciclo fermentativo, as células foram centrifugadas a 8000 rpm e 4 °C por 15 minutos e a massa obtida foi ressuspensa em 5 mL de água destilada. Esse conteúdo foi adicionado em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 45 mL de água destilada e o OE de tangerina na concentração de 0,05% v/v com tween 80 na proporção de 1:3 (tween:OE) para o tratamento celular. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 160 rpm, por 2 horas.

Após o tratamento celular, a massa celular foi centrifugada a 8000 rpm e 4 °C por 15 minutos, ressuspensa em caldo de cana 17 °Bx e inoculada no caldo de cana com solução de sais para um novo ciclo fermentativo. No total, foram realizados 3 ciclos fermentativos e 3 tratamentos de células.

Para as análises microbiológicas, foi retirado 1 mL de amostra no fim de cada ciclo fermentativo e de cada tratamento celular, e para as análises físico-químicas, o caldo fermentado foi centrifugado ao final de cada ciclo fermentativo (8000 rpm, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi armazenado em tubos Falcon, a -10 °C, até a realização das análises.

As análises microbiológicas consistiram na contagem de colônias por meio do plaqueamento e diluição em série. As amostras retiradas ao fim dos ciclos fermentativos e dos tratamentos celulares foram diluídas em série em solução salina (NaCl 0,85% m/v) e foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio YPD com adição de cloranfenicol (concentração final de 50 mg/mL) e meio MRS com adição de actidione (concentração final 5 mg/L). As placas com YPD foram incubadas a 30 °C e com MRS a 35

°C, por 48 horas, para contagem de UFC/mL. Foram plaqueadas 3 diluições, em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações e dos tratamentos.

O sobrenadante do caldo fermentado, separado para as análises físico-químicas, foi analisado quanto ao pH, utilizando pH-metro digital MS Tecnopon mPA210; etanol (em g/100 mL), por meio da destilação de 10 mL das amostras em microdestilador Tecnal TE-012 e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital Anton-Paar®, conforme Amorim (1997); e açúcar redutor total (ART) pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) conforme procedimento abaixo descrito (MILLER, 1959, modificado).

Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, onde foram adicionados 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Os balões foram levados para banho-maria a 65 °C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida, foram adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mol/L e o volume do balão foi completado até o menisco com água destilada. Foi retirado 1 mL de cada solução preparada e transferido para tubos de ensaio, onde foram adicionados 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, e em seguida foram resfriadas em água corrente. Após, foram adicionados 5 mL de água destilada, totalizando um volume de 8 mL. Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate®). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se água destilada ao invés da amostra para se obter o branco da reação, necessário para calibrar o aparelho. Para o cálculo do ART foi elaborada uma curva padrão utilizando-se solução de glicose em concentrações variando de 0,12 a 1,2 g/L ($R^2 = 0,9938$). A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação:

$$\text{ART (g/100mL)} = [(\text{absorbância da amostra} + 0,0545)] / 0,6863 \times \text{diluição da amostra}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do OE por GC-MS

Na análise do OE por GC-MS foram reportados 17 compostos voláteis, sendo 1 álcool, 4 aldeídos, 11 monoterpenos e 1 composto não identificado, conforme Figura 1 e Tabela 1.

Figura 1. Cromatograma expandido (4 – 24 min) da amostra de OE obtido por GC-MS.

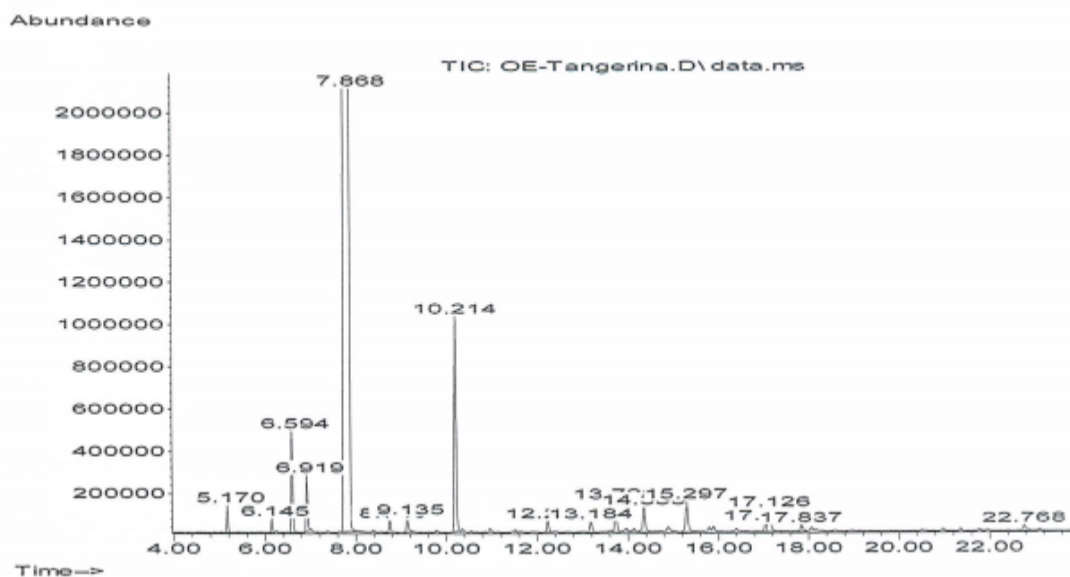


Tabela 1. Analitos identificados no OE de tangerina.

tr (min)	IR	Identificação	% rel.
5,17	932	alfa-pineno	0,36
6,15	972	sabineno	0,19
6,60	990	beta-mirceno	1,48
6,92	1002	octanal	0,82
7,87	1030	limoneno	89,19
8,75	1056	gama-terpineno	0,22
9,14	1068	1-octanol	0,30
10,22	1100	linalol	3,80
12,23	1151	citronelal	0,23
13,18	1175	terpin-4-ol	0,25
13,73	1189	alfa-terpineol	0,63
14,35	1204	decanal	0,58
15,30	1227	citronelol	0,77
17,04	1268	geranial	0,20
17,13	1270	perilil aldeído	0,59
17,84	1287	M = 152	0,19
22,77	1407	dodecanal	0,21

tr: tempo de retenção; IR: índice de retenção; % rel.: fração em porcentagem da área total integrada para o cromatograma; M: massa molar

Os compostos identificados em maiores quantidades e suas porcentagens relativas foram limoneno (89,19%), linalol (3,80%), beta-mirceno (1,48%), octanal (0,82%) e citronelol (0,77%). O componente majoritário foi o limoneno, o que está de acordo com a literatura (ARAÚJO *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos estão entre as substâncias que atuam como inibidores de micro-organismos, podendo impedir o crescimento microbiano e a síntese de etanol durante a fermentação alcoólica. Há relatos na literatura que esses compostos comprometem a integridade da membrana biológica, afetando sua capacidade de servir como barreira seletiva, promover o crescimento celular e assimilar açúcar (COLOMBI; ZANONI; TAVARES, 2018).

O rendimento do OE em questão, obtido através de hidrodestilação, foi de 0,007 mL/g.

5.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) no OE

Como diversos trabalhos na literatura reportam que a atividade antimicrobiana dos OEs cítricos é devida não apenas ao limoneno, mas a uma sinergia com os compostos presentes em menores quantidades, como os fenólicos, foi determinado o teor de CFT do OE em questão, que foi de 0,115 mg EAG/g de OE de tangerina.

Araújo *et al.* (2020) obtiveram teor de CFT entre 6,43 – 10,53 mg EAG/g, em microesferas com OE de laranja doce microencapsulado, formuladas com maltodextrina e gelatina. Değirmenci e Erkurt (2020) analisaram o teor de CFT do OE de laranja amarga, que apresentou 1,54 mg EAG/g. Farahmandfar *et al.* (2020) avaliaram o efeito de diferentes métodos de secagem na casca de laranja doce, e o teor de CFT dos OEs obtidos a partir dessas cascas variaram de 10 a 60 mg EAG/g.

Os compostos fenólicos naturais, como ácidos fenólicos, taninos e flavonóides, contribuem para a atividade biológica que os materiais vegetais, como os OEs, apresentam (DEĞIRMENCI; ERKURT, 2020). Esses compostos apresentam atividade antioxidante e são responsáveis pela eliminação e prevenção da formação de radicais livres. Essa propriedade antioxidante dos fenóis é devida à oxidação e redox, que permite que essas moléculas funcionem como um agente redutor e doador de hidrogênio. Os fenólicos de alto peso molecular, como hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, apresentam maior potencial de inibição dos radicais livres, e essa questão está relacionada com o número de anéis aromáticos e da natureza dos grupos hidroxila (HASHEMINYA; DEHGHANNYA, 2020).

No OE cítrico avaliado nesse estudo, o teor de CFT foi inferior aos apresentados nos OEs aqui citados. Mesmo assim, o OE de tangerina apresentou considerável atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos estudados, indicando que outros compostos presentes, além dos fenólicos, também influenciam nessa propriedade, devido ao efeito sinérgico que desempenham.

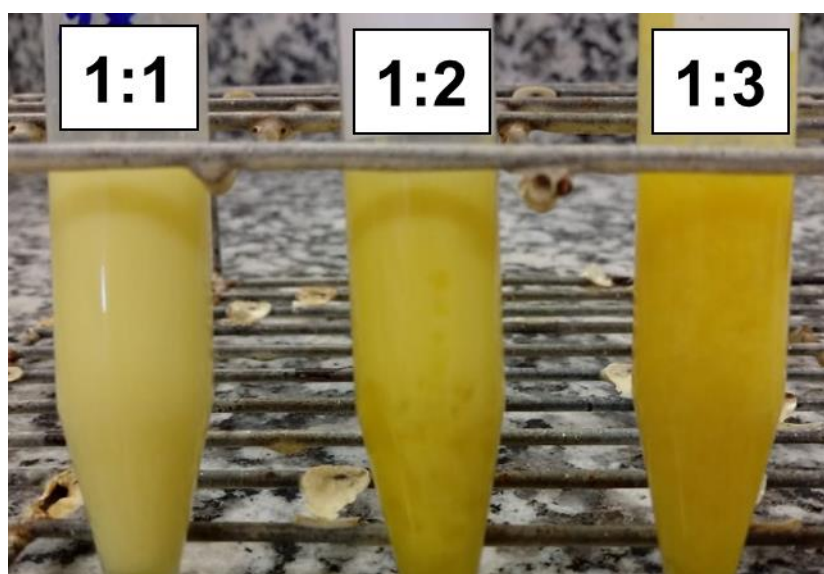
5.3 Otimização da concentração de Tween 80 como emulsificante do OE

Com a finalidade de utilizar a menor quantidade possível de Tween 80 como agente emulsificante, o qual possibilita maior homogeneidade da solução diluída de OE, foram realizados testes com diferentes proporções Tween:óleo. Na proporção 1:1 formou-se uma emulsão mais uniforme, e nas proporções 1:2 e 1:3 ocorreu formação de grumos, porém houve mistura da água com o óleo (Figura 2). Dessa forma, a proporção 1:3 (Tween:óleo) foi selecionada para os experimentos com adição de Tween 80 como agente emulsificante.

Campolo *et al.* (2020) estudaram o efeito de diferentes surfactantes em nanoemulsões com OEs, e também utilizaram a proporção de 3:1 (óleo:surfactante), por apresentar boa estabilidade ao longo do tempo.

Tweens são uma classe de surfactantes não iônicos derivados de ésteres de sorbitano, solúveis ou dispersíveis em água. As emulsões (combinação do OE com um surfactante adequado) são eficientes para aumentar a estabilidade física dos compostos ativos, devido principalmente à repulsão estérica, aumentando sua bioatividade, pois, dessa forma, os OEs conseguem atingir os micro-organismos alvos localizados na fase aquosa do sistema (CAMPOLO *et al.*, 2020).

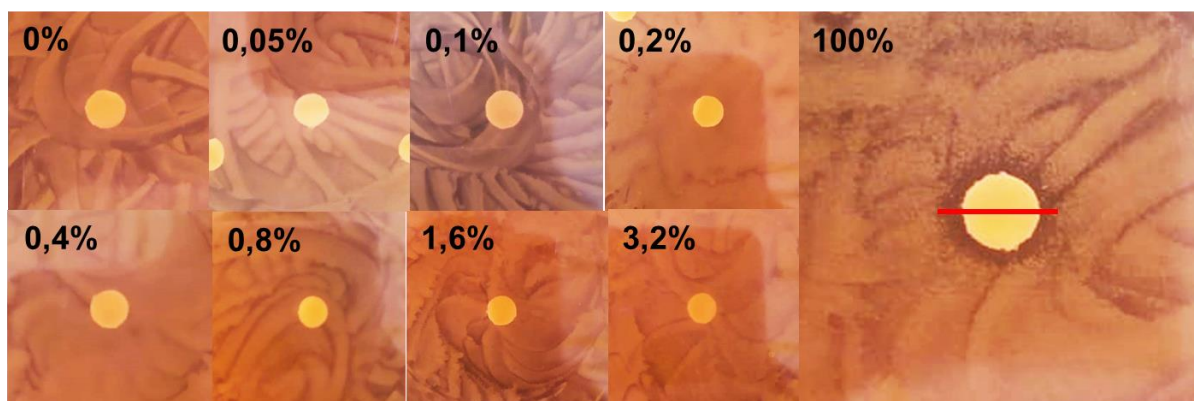
Figura 2. Efeito das diferentes proporções de Tween:óleo na emulsificação do OE de tangerina.



5.4 Efeito do OE de tangerina em meio sólido em *L. fermentum* (disco-difusão)

Utilizando o teste de difusão em disco (NCCLS 2003), nas concentrações aqui testadas (0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1,6%, 3,2% e 100% v/v), só foi observada a formação de halo de inibição em *L. fermentum* com o disco de papel saturado com a solução de 100% v/v do OE, e mesmo nessa condição, o halo formado foi bem discreto, aproximadamente 7,5 mm, descontando o diâmetro do halo (Figura 3).

Figura 3. Teste de difusão em disco do OE de tangerina em meio MRS inoculado com *L. fermentum*. Os números indicam a concentração do OE.



Ajayi-moses, Ogidi e Akinyele (2019) avaliaram as atividades inibitórias de OEs cítricos através do método de difusão em poço de ágar com *L. plantarum* e verificou inibição de 9,8 mm na concentração de 100 mg/mL, com a combinação dos óleos de lima e limão. Ambrosio *et al.* (2019) estudaram a atividade antibacteriana de OEs cítricos sobre *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, através de difusão em disco. Com 90% v/v de OE, foram obtidas zonas de inibição de 9,1 mm para *L. plantarum*, com 151% de inibição em relação ao controle positivo colistina, e 10,9 mm para *L. rhamnosus* com 182,4% de inibição, com o óleo CT (*Citrus terpenes*). Não foram encontrados na literatura testes de disco-difusão com a bactéria *L. fermentum*.

Os resultados obtidos por meio de testes de difusão do OE em meio sólido podem diferir bastante do que é observado em líquido, uma vez que o OE tem sua difusão dificultada em meio sólido, quando comparada com líquido, devido a viscosidade e insolubilidade em água que apresentam. Além disso, como são voláteis, o fato de estarem na superfície da placa pode aumentar a perda do OE por volatilização. Dessa forma, foi também realizado o teste de atividade antimicrobiana em meio líquido (ensaio de microdiluição) que será apresentado a seguir.

5.5 Efeito do OE sobre *L. fermentum* em condições proliferativas (ensaio de microdiluição)

As curvas de crescimento de *L. fermentum* mostraram o efeito do aumento da concentração do OE sobre o crescimento da bactéria. No intervalo entre 0,05% a 12,8% v/v, não houve inibição do crescimento bacteriano, observando-se crescimento mais lento e aumento da fase *lag* (Figuras 4 e 5). A velocidade específica de crescimento se manteve na faixa de 0,40 h⁻¹ até a concentração de 0,2% v/v, aumentando para cerca de 0,42 h⁻¹ na concentração de 0,4% v/v, e começando a diminuir a partir de 0,8% v/v. Na faixa de 1,6% a

12,8% v/v de OE, a velocidade específica de crescimento ficou entre 0,32 a 0,35 h⁻¹. A duração da fase *lag* aumentou de 1,25 para 7 horas na faixa de 0,8% a 12,8% v/v de OE. Dessa forma, verifica-se que o OE começou a ter efeito sobre *L. fermentum* a partir de 0,8% v/v considerando-se o aumento da fase *lag* (Figura 5).

Ambrosio *et al.* (2019) estudaram a atividade antibacteriana de OEs cítricos em *L. rhamnosus*, e também determinaram parâmetros cinéticos. Na concentração sub-inibitória de 1,85 mg/mL, a densidade máxima da cultura (OD_{600nm}) foi de 1,176 sem a adição de óleo e 1,143 com a adição do óleo; a taxa máxima de crescimento específica (h⁻¹) foi de 0,148 e 0,165 sem e com a adição do óleo, respectivamente; e a duração da fase *lag* passou de 16,61 horas para 26,61 horas com a adição do óleo.

A Figura 6 mostra que a relação entre crescimento de *L. fermentum* e concentrações de OE tem tendência a ser linear, de forma que o crescimento (expresso como variação de absorbância ao longo de 24 horas) diminui na faixa de 0,05% a 12,8% v/v de OE (R²=0,8936). Simulando variação de absorbância igual a zero (y=0), o que determinaria a concentração mínima inibitória (CIM), obtém-se a concentração de 38% v/v de OE para causar inibição no crescimento da bactéria, nas condições aqui testadas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos com OEs cítricos com *L. fermentum*, apenas com outras espécies de *Lactobacillus*. Para *L. plantarum*, foram obtidas CIMs de 75 mg/mL com óleo de lima, 20 µL/mL com óleo de limão, e 2 µL/mL com óleos de limão e tangerina (AJAYI-MOSES; OGIDI; AKINYELE, 2019; FANCELLO *et al.*, 2016; PEDROSA *et al.*, 2019), muito inferiores ao valor estimado para *L. fermentum* com o OE de tangerina aqui testado.

A maioria dos estudos encontrados na literatura destaca a maior efetividade dos OEs em bactérias Gram-positivas. Essa diferença na ação antimicrobiana é baseada nas estruturas celulares que esses dois grupos bacterianos apresentam. A parede celular de bactérias Gram-positivas é constituída por peptidoglicano, pela qual os OEs são capazes de penetrar e destruir as células. Já as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa que cobre a camada de peptidoglicano. Essa membrana externa é hidrofílica e, portanto, impermeável ao OE. A presença dessa membrana externa é o que torna as bactérias Gram-negativas mais resistentes aos OEs (AL-SHUNEIGAT *et al.*, 2020).

Figura 4. Curvas de crescimento de *L. fermentum* na presença de OE de tangerina nas concentrações de 0 a 12,8% v/v, em meio MRS, a 35 °C.

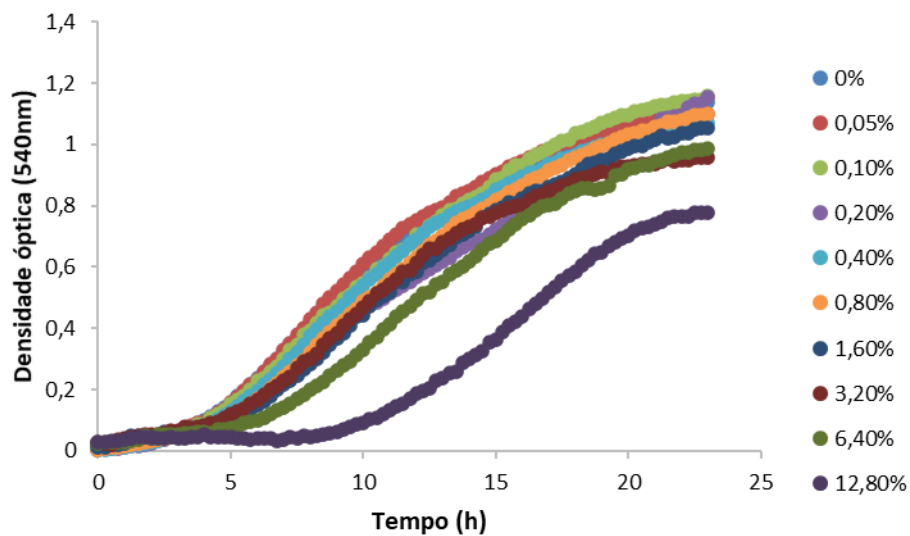


Figura 5. Velocidade específica de crescimento (μ , h^{-1}) e duração da fase lag (h) de *L. fermentum* na presença de OE de tangerina nas concentrações de 0 a 12,8% v/v, em meio MRS, a 35 °C.

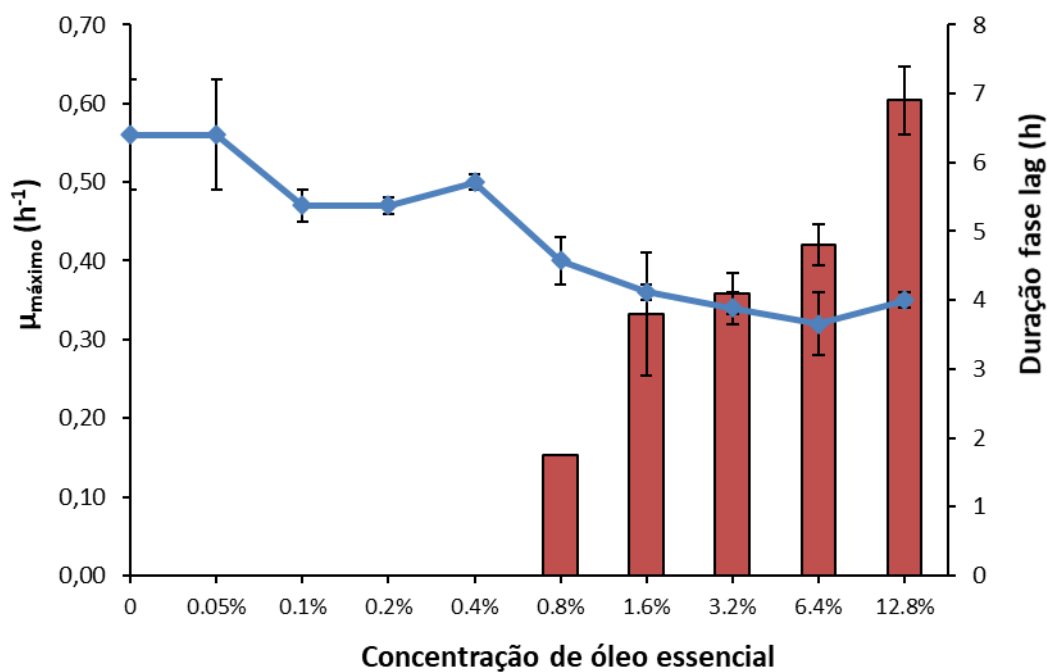
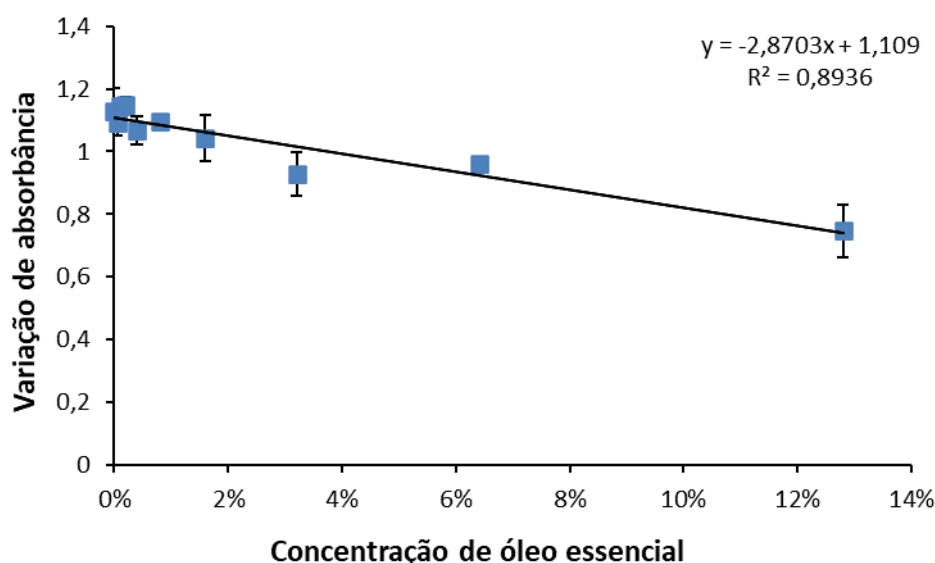


Figura 6. Efeito da concentração de OE de tangerina sobre o crescimento de *L. fermentum*, em meio MRS, a 35 °C¹



¹ A equação contida no gráfico refere-se à equação da reta obtida pela regressão linear dos dados

Além da explicação baseada nas diferenças em relação a estrutura celular dos dois grupos de bactérias, o espectro antibacteriano do OE também depende da especificidade dos grupos funcionais de seus compostos. Os compostos devem ser capazes de danificar a membrana externa dos micro-organismos para liberar o material intracelular e penetrar na célula (HELANDER *et al.*, 1998).

Uma outra observação a ser feita é que os *Lactobacillus*, apesar de serem bactérias Gram-positivas, apresentam resistência aos OEs. Isso pode ser atribuído ao fato de que a parede celular das LABs Gram-positivas, como os *Lactobacillus spp.*, possuem propriedades que podem estar relacionadas à resistência a alguns agentes antimicrobianos. Um exemplo é a resistência dos *Lactobacillus* à vancomicina, que pode estar relacionada com o fato desses micro-organismos apresentarem um D-lactato no lugar de D-alanina como o último aminoácido na cadeia peptídica do peptidoglicano da parede celular, impedindo que o antibiótico se ligue à cadeia peptídica e iniba essas bactérias (CAMPEDELLI *et al.*, 2018).

Ambrosio *et al.* (2019) avaliaram a composição de OEs cítricos, relacionando com a atividade antibacteriana que apresentaram. Nos seis óleos cítricos avaliados nesse trabalho, o limoneno foi detectado como o principal composto. Os óleos BOT (*Brazilian Orange Terpenes*), CT (*Citrus Terpenes*), OOPE (*Orange Oil Phase Essence*), OPO (*Orange Peel Oil*) e OPOFF (*Orange Peel Oil Five Fold*) foram os que apresentaram as maiores quantidades. No entanto, BOT, CT, OOPE e OPO apresentaram perfis de composição próximos e as maiores atividades antibacterianas, enquanto o perfil de OPOFF foi

totalmente diferente dos outros e sua atividade antibacteriana foi a mais fraca. Isso sugere que a atividade antibacteriana dos OEs cítricos não é atribuída especificamente ao limoneno, mas também aos outros compostos comuns encontrados em quantidades menores, como linalol, beta-mirceno, octanal e citronelol, no caso desse OE de tangerina.

Ouwehand *et al.* (2010) investigaram o efeito de alguns constituintes de OEs sobre o crescimento de bactérias, entre elas *L. fermentum*. O limoneno, principal constituinte de OEs de citros, estimulou o crescimento de *L. fermentum* ao invés de inibir. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, é possível que concentrações mais baixas de OE podem resultar em ausência de efeito sobre *L. fermentum*, uma vez que os OEs apresentam não só limoneno, mas outras substâncias potencialmente inibidoras, como linalol e mirceno. À medida que se aumenta a concentração do OE, o efeito do OE começa a aparecer, embora de forma não expressiva e representado por uma menor velocidade de crescimento e aumento da fase *lag*, mas não inibição do crescimento. Um ensaio semelhante poderia ser realizado com a adição de limoneno em variadas concentrações para avaliar se realmente há efeito estimulante para o crescimento de *L. fermentum*, o que poderia explicar a ausência de inibição de crescimento mesmo em concentrações altas do OE.

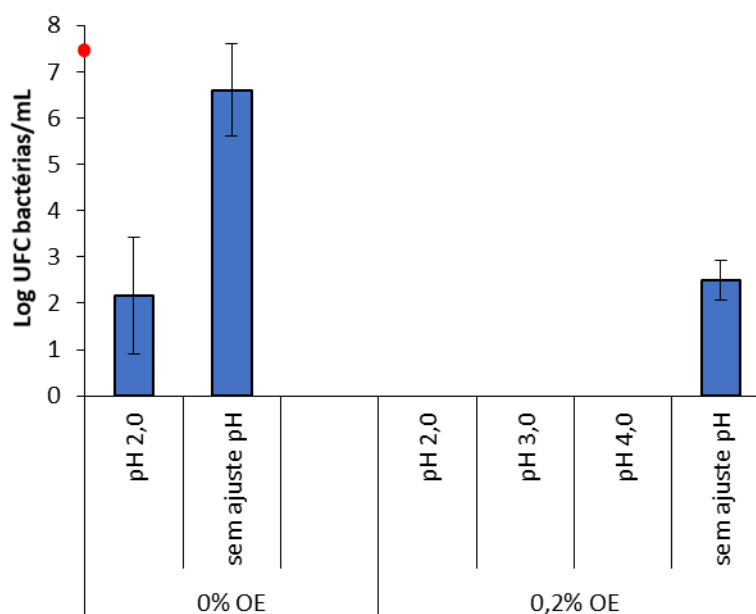
O ensaio de microdiluição é um teste padrão para avaliação de atividade antimicrobiana, realizado em condições proliferativas (CLSI, 2012). Para uma possível aplicação na indústria do bioetanol, o OE poderia ser adicionado à fase do tratamento celular, em substituição ou como adjuvante do ácido sulfúrico para combater a contaminação bacteriana. Nessa condição, utiliza-se água para dissolver o ácido, ou seja, o procedimento é realizado em condição não-proliferativa. Como a mínima concentração que causou algum efeito sobre a bactéria foi de 0,8% v/v, a próxima etapa do presente trabalho foi testar uma concentração menor de OE em água acidificada para avaliar se o baixo pH poderia potencializar o efeito do OE.

5.6 Efeito do pH em adição com OE para o controle de *L. fermentum* em condições não-proliferativas

Para simular o tratamento celular realizado nas destilarias, o OE foi adicionado à água acidificada (pH 2,0; 3,0; 4,0) e sem ajuste de pH (pH 5,8 - 6,1), na concentração de 0,2% v/v. A concentração celular inicial foi na faixa de 10^7 células/mL, para simular o nível de contaminação que ocasionaria problemas no processo fermentativo. Na Figura 7 pode ser observado que o OE na concentração de 0,2% v/v sem acidificação da água teve efeito similar sobre a bactéria do que o tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0, comumente utilizada nas destilarias, causando redução de cerca de 4 ciclos log (99,99% de redução) em comparação com o tratamento onde não foi acrescentado ácido ou OE. O baixo pH, ou seja, a adição de ácido à água, potencializa o efeito do OE pois nos

tratamentos com pH 2,0, 3,0 e 4,0, não houve crescimento da bactéria (perda total de viabilidade celular, ou seja, ausência de colônias no plaqueamento direto). Não foram realizados os testes com pH 3,0 e 4,0 sem a adição de OE, pois trabalho anterior demonstrou que nessas condições não há redução no número de *L. fermentum* (SILVA-NETO *et al.*, 2020), o que reforça o efeito do OE. No tratamento com pH 2,0, a adição de 0,2% v/v de OE causou a perda total de viabilidade da bactéria, o que não ocorreu na ausência do OE.

Figura 7. Efeito do pH e da adição de OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre *L. fermentum*, em condição não-proliferativa, após 2 horas de incubação a 35 °C. O ponto vermelho sobre o eixo Y se refere a concentração celular inicial.



Os resultados obtidos nesses ensaios são contraditórios àqueles observados no ensaio de microdiluição, possivelmente devido ao efeito promotor de crescimento do limoneno em condições proliferativas, ou seja, na presença de uma fonte de carbono e outros nutrientes, como é o caso do meio de cultura MRS.

Um outro fator que pode ter contribuído com essas diferenças nos resultados da ação do OE em condições proliferativas e não-proliferativas, é a presença do emulsificante. Isso pode ter ocorrido pois sua adição é o que possibilita a correta difusão do OE no meio aquoso, fazendo com o composto consiga atingir o micro-organismo alvo (CAMPOLO *et al.*, 2020). Para esclarecer esse ponto, sugere-se a realização desse experimento (ação do OE em condição não-proliferativa) sem a adição do emulsificante, uma vez que é inviável a

realização do ensaio de microdiluição com emulsificante, pois a adição dele inviabiliza a leitura da absorbância do sistema.

Os resultados apontam que o OE poderia ser substituído do ácido sulfúrico para reduzir a população microbiana de 10^7 bactérias/mL a níveis que não ocasionariam problemas no rendimento fermentativo (por volta de 10^3 células/mL). Para causar perda total de viabilidade celular, seria necessário acrescentar ácido, porém em volume bem menor do que o necessário para a solução ácida pH 2,0 comumente utilizada no ambiente industrial. A comparação entre os resultados em condições proliferativas e não-proliferativas indicam também que a aplicação do OE deve ser feita na fase de tratamento celular entre os ciclos fermentativos e não durante o processo fermentativo.

Para fermentações industriais, as contaminações bacterianas acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL são consideradas prejudiciais, acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL os prejuízos econômicos são significativos e acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL ocorre queda no rendimento fermentativo, dificultando operações de centrifugação devido ao aumento da floculação, ocorrendo ainda o aumento do consumo de ácido sulfúrico e de antibióticos (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; BASSO *et al.*, 2014). Portanto, não é necessária a completa eliminação da bactéria contaminante do processo fermentativo. A manutenção da concentração celular abaixo dos níveis que comprometem a eficiência e rendimento do processo (cerca de 10^3 células/mL) já é suficiente.

A próxima etapa foi acompanhar o efeito do OE (concentração de 0,2% v/v) dentro de um período de 6 horas, seguindo-se procedimento do ensaio padrão de *time-kill* conforme GUCWA *et al.* (2018). A concentração inicial de células sugerida para esse ensaio é na faixa de 10^6 células/mL, ou seja, dez vezes inferior à concentração utilizada nos testes de pH. Além disso foi avaliado também o efeito do OE sobre a levedura do processo, *S. cerevisiae*.

5.7 Efeito do OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em condições proliferativas e não-proliferativas (ensaios *time-kill*)

Em condições não-proliferativas (água), houve perda total da viabilidade da bactéria com 1,5 hora com 0,2% v/v do OE. O Tween 80, emulsificante adicionado junto com o OE, não teve efeito sobre a bactéria, mostrando que a ação antimicrobiana é devida apenas ao OE. Observou-se uma pequena diminuição no número de bactérias após 3 horas de cultivo no tratamento com Tween, mas resultado similar foi observado no tratamento controle, somente água. Na presença do antibiótico monensina (3 mg/L), a perda total de viabilidade celular ocorreu apenas com 4,5 horas (Figura 8).

O ensaio com Tween foi realizado por haver indicação de possível efeito redutor da ação antimicrobiana do OE na presença desse emulsificante (NIELSEN *et al.*, 2016). No

entanto, o resultado aqui encontrado foi o mesmo descrito por Okunowo *et al.* (2013), os quais não detectaram efeito adverso do Tween 80 como emulsificante do OE de *grapefruit*.

Com MRS e 0,2% v/v de OE, a concentração celular caiu para a faixa de 10^1 células/mL com 6 horas de tratamento, não havendo perda total da viabilidade da bactéria (Figura 9). Esses resultados reforçam que o OE tem maior ação antimicrobiana em condição não-proliferativa, sendo que a maior eficácia de aplicação deve ocorrer mesmo durante o tratamento celular no processo de fermentação e não durante a fermentação em si.

Vasireddy, Bingle e Davies (2018) estudaram o efeito antimicrobiano do composto terpinen-4-ol e geraniol na presença e ausência de fonte de carbono em *Burkholderia cepacia*. Não foram observadas diferenças perceptíveis quanto ao declínio no número de células da bactéria em condição não-proliferativa em comparação com o tratamento com meio de cultura.

Nesse ensaio houve perda total de viabilidade da bactéria após 1,5 hora de contato com o OE, enquanto no experimento anterior houve redução de cerca de 4 ciclos log após 2 horas de contato com o OE, ambos os experimentos realizados na mesma concentração de OE. A diferença entre os dois experimentos está na concentração inicial de células, que no primeiro caso foi 10 vezes superior à concentração inicial de células no segundo experimento, o que pode explicar o melhor resultado no segundo experimento. De qualquer forma, com uma contaminação na faixa de 10^6 ou 10^7 células de bactérias/mL, o OE tem eficácia similar ou ainda maior que o tratamento com pH 2,0 somente (Figura 7).

Para *S. cerevisiae*, o experimento foi realizado apenas em condição não-proliferativa (água). Houve efeito do OE sobre a viabilidade da levedura, reduzindo cerca de 1 ciclo log após 1,5 hora de contato com OE (Figura 10). No entanto, a levedura é mais resistente do que a bactéria, o que é um ponto positivo para a aplicação do OE para o controle da contaminação por *L. fermentum* no processo fermentativo.

Silva-Neto *et al.* (2020) realizaram tratamento celular em pH 2,0 com ácido sulfúrico, simulando o tratamento convencional realizado nas destilarias, no fim do 1º e 2º ciclos fermentativos realizados com caldo de cana não estéril, em processo contaminado propositalmente com *L. fermentum*. Foi observado, através de contagem celular, que os tratamentos celulares com ácido não afetaram a levedura do processo, *S. cerevisiae*, linhagem industrial PE-2, reforçando a resistência apresentada por essa cepa.

Figura 8. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre *L. fermentum*, em condição não-proliferativa, ao longo de 6 horas de cultivo, a 35 °C , em comparação com os tratamentos sem óleo (0%), com Tween (0,066%) e com monensina (3 mg/L).

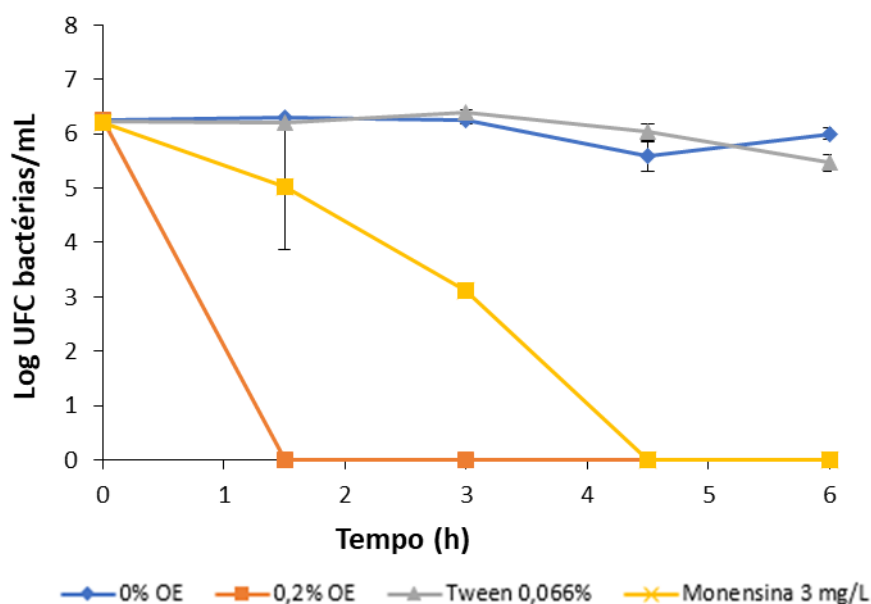


Figura 9. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre *L. fermentum*, em condição proliferativa (meio MRS), ao longo de 6 horas de cultivo, a 35 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).

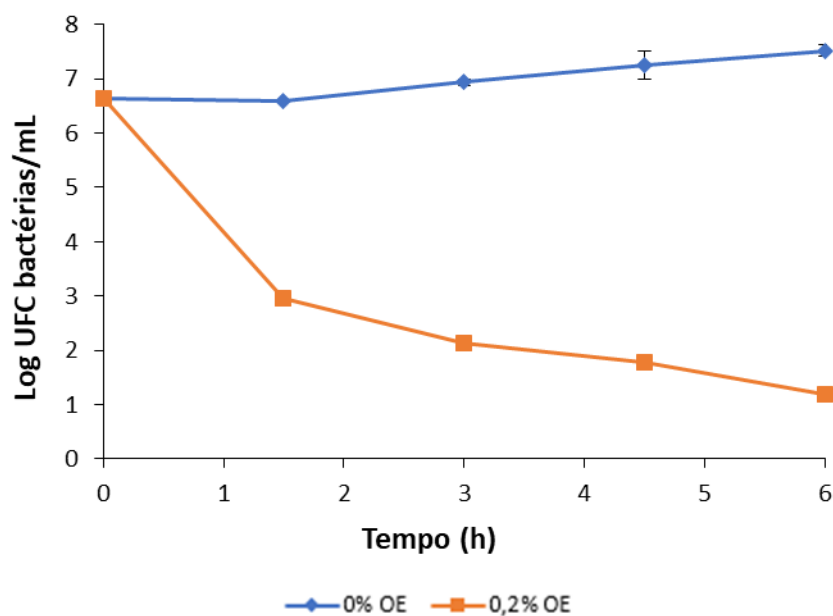
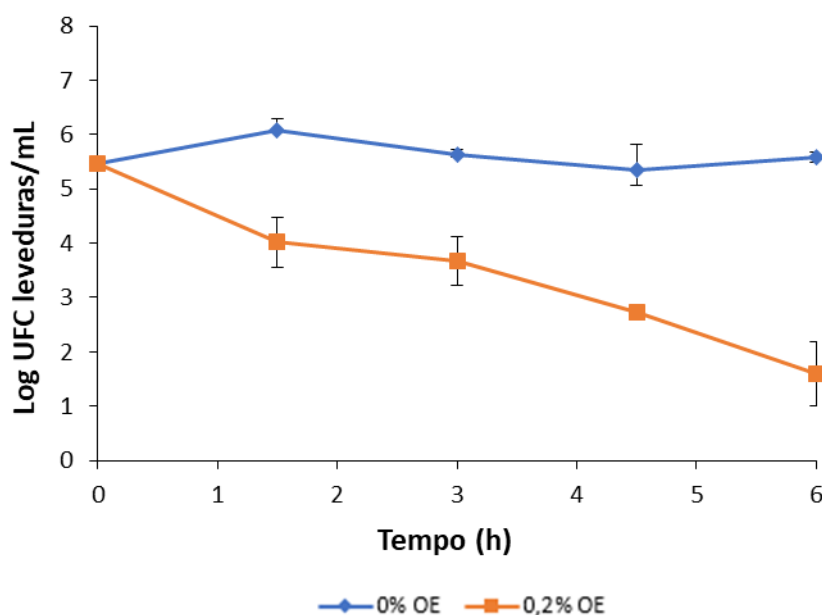


Figura 10. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,2% v/v sobre *S. cerevisiae*, em condição não-proliferativa, ao longo de 6 horas de cultivo, a 30 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).



Na literatura são encontradas, para *S. cerevisiae*, CIMs de 50 mg/mL com OEs de lima, limão e toranja, 1,25 µL/mL com OE de limão, e 1% v/v com OE de laranja (AJAYI-MOSES; OGIDI; AKINYELE, 2019; FANCELLO *et al.*, 2016; VITO *et al.*, 2020). Porém, Wilkins *et al.* (2007) e Vito *et al.* (2020) mostraram que *S. cerevisiae* é capaz de se adaptar ao óleo presente no meio e retomar seu crescimento.

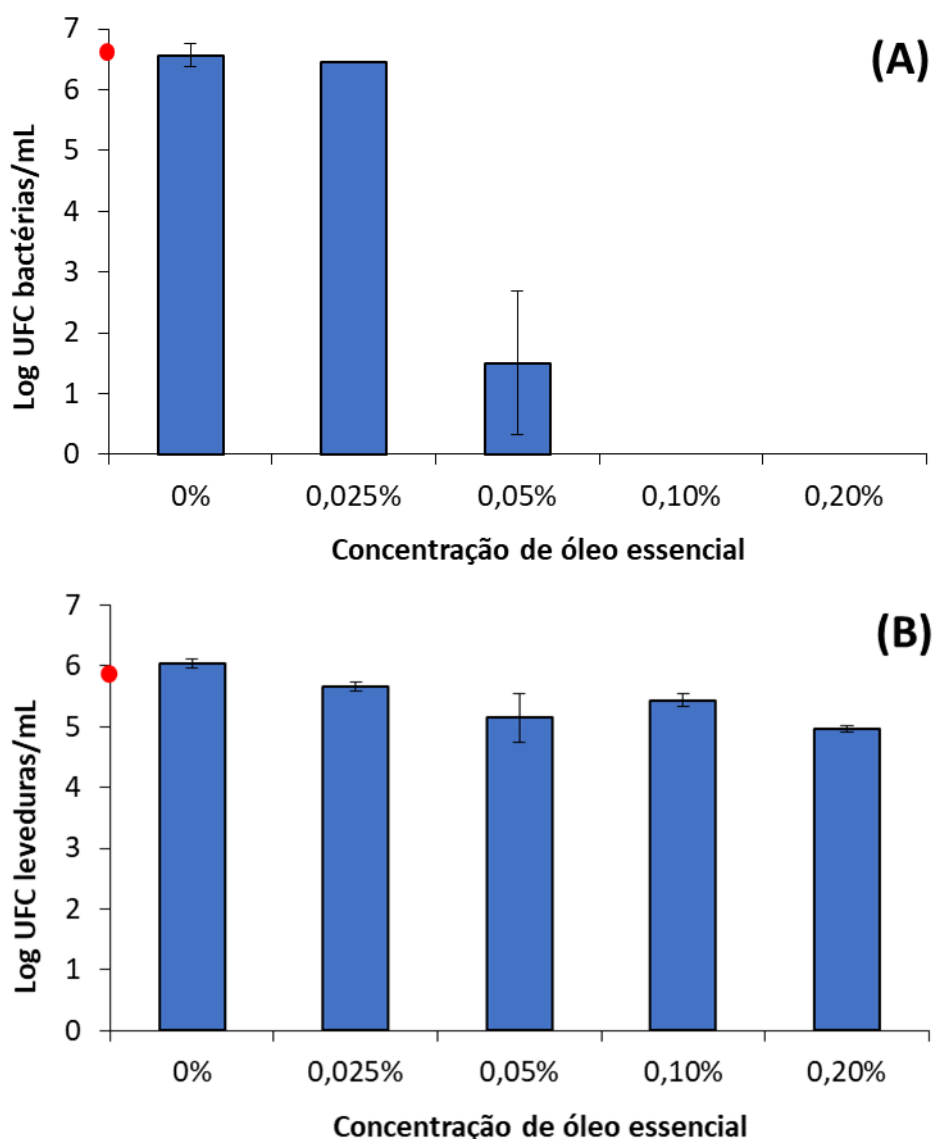
Mitropoulou *et al.* (2017) investigaram a atividade antimicrobiana do OE de cidra em *S. cerevisiae*. As zonas de inibição do crescimento formadas correspondiam a áreas entre 25 e 33 mm com o OE, e entre 16 e 20 mm de diâmetro com o limoneno, principal constituinte do OE em questão. Como o OE exibiu maior atividade antimicrobiana quando comparado com o limoneno puro, sugere-se que a ação antimicrobiana esteja relacionada com o efeito sinérgico desse principal componente com as substâncias presentes em menores quantidades.

A redução de 1 ciclo log para a levedura com a aplicação de 0,2% v/v de OE não é interessante no contexto da fermentação etanólica, e uma vez que essa concentração causou perda total de viabilidade da bactéria, seria interessante avaliar se uma concentração menor que 0,2% v/v poderia afetar menos a levedura e ainda assim causar efeito sobre a bactéria.

5.8 Efeito da concentração de OE sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em condições não-proliferativas

Nessa etapa, foram testadas concentrações menores que 0,2% v/v de OE em ensaios de 2 horas de cultivo, simulando novamente o tratamento celular (condição não-proliferativa). O objetivo foi encontrar uma concentração que fosse capaz de reduzir a concentração de células bacterianas a um nível aceitável para o processo fermentativo, afetando minimamente a levedura. Os resultados estão expressos na Figura 11.

Figura 11. Efeito da concentração do OE de tangerina sobre *L. fermentum* (A) e *S. cerevisiae* (B), em condição não-proliferativa, por 2 horas, a 35 °C e 30 °C, respectivamente, em comparação com o tratamento sem óleo (0%). O ponto vermelho sobre o eixo Y se refere a concentração celular inicial.



Para *L. fermentum*, houve redução de cerca de 0,4 ciclo log na menor concentração testada (0,025% v/v), 5 ciclos log com 0,05% v/v, e perda total de viabilidade nas concentrações de 0,1% e 0,2% v/v (Figura 11A). Isso reforça a maior ação antimicrobiana do OE em água, mesmo em concentrações menores. Para *S. cerevisiae*, as concentrações de 0,025%, 0,05% e 0,1% v/v causaram redução de menos de 1 ciclo log (Figura 11B). Esses dados reforçam o fato de que a levedura tem maior resistência ao OE comparada com a bactéria.

Com a menor concentração de OE testada (0,025% v/v), não houve uma redução significativa da bactéria contaminante para o processo fermentativo, além de que, nessa concentração, os dois micro-organismos foram quase que igualmente afetados (redução de 0,445 ciclo log para a bactéria e 0,385 ciclo log para a levedura). As maiores concentrações de OE testadas (0,1 e 0,2% v/v) causaram perda total da viabilidade da bactéria, e redução de menos de 1 ciclo log no número de células de levedura, porém, como não é necessária a eliminação total do contaminante presente no processo, não se justifica o uso de maiores volumes de OE. Portanto, a concentração de 0,05% v/v foi escolhida para ser aplicada nos experimentos posteriores, simulando o processo fermentativo industrial.

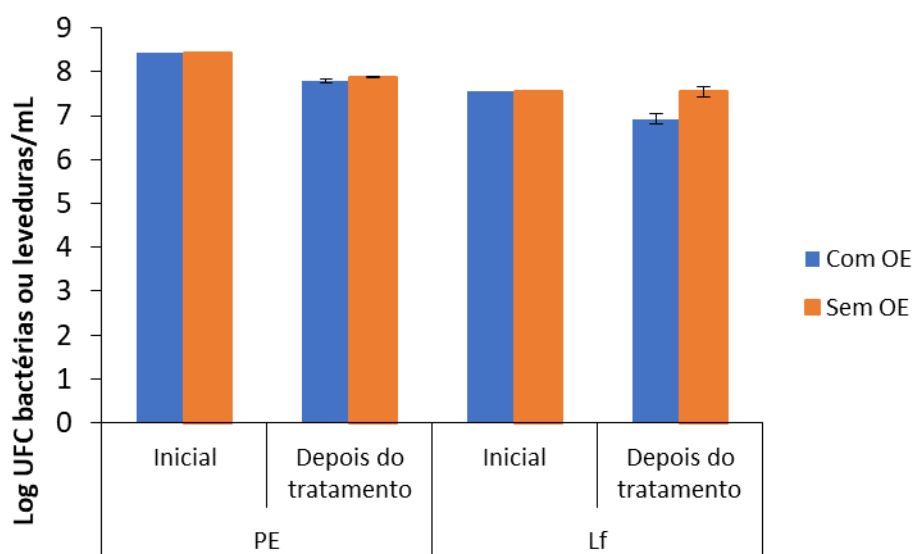
5.9 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em co-cultura em condições não-proliferativas

Como no processo fermentativo para produção de etanol a bactéria contaminante e a levedura do processo compartilham simultaneamente o meio de fermentação, foi avaliada a ação do OE na concentração de 0,05% v/v sobre cada micro-organismo em co-cultura em condição não-proliferativa, como testado anteriormente.

Em cultura pura, o OE havia ocasionado redução de 4,4 ciclos log no número de bactéria e 0,64 ciclo log na levedura. Já com os dois micro-organismos em co-cultura, essa redução foi de apenas 0,62 ciclo log no número de bactéria e 0,08 para a levedura. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 12.

Como em co-cultura, que simula o ambiente fermentativo contaminado, a redução do número de bactéria foi bem menor quando comparada aos experimentos em cultura pura, não seria viável a aplicação do OE de tangerina Fremont nessa concentração para o controle de *L. fermentum* na produção de etanol. Apesar desses resultados, foram realizados experimentos simulando o processo fermentativo com caldo de cana, aplicando o OE nos tratamentos celulares realizados entre os ciclos fermentativos, para verificar se ocorreria esse mesmo efeito de diminuição da ação antibacteriana do OE quando em co-cultura com a levedura.

Figura 12. Efeito do OE de tangerina na concentração de 0,05% v/v sobre *L. fermentum* e *S. cerevisiae* em co-cultura, em condição não-proliferativa, por 2 horas, a 30 °C, em comparação com o tratamento sem óleo (0%).



5.10 Efeito do OE na concentração de 0,05% v/v sobre o processo fermentativo conduzido por *S. cerevisiae* e contaminado com *L. fermentum*, com adição no tratamento celular realizado entre os ciclos fermentativos

Para simular o processo fermentativo para produção de etanol, foi realizada fermentação com caldo de cana estéril aplicando o OE na concentração de 0,05% v/v no tratamento celular com co-cultura de *L. fermentum* e *S. cerevisiae*, realizado entre os ciclos fermentativos (Figuras 13 e 14). Nessas condições, o número de *L. fermentum* diminuiu aproximadamente 1,5 ciclo log, comparando o número de bactérias inoculadas no início do primeiro ciclo de fermentação com o número de bactérias ao final do tratamento no terceiro ciclo de fermentação (Figura 13). Apesar dessa redução ser muito inferior a observada com a bactéria em cultura pura, em que a redução foi de cerca de 4 ciclos log, esse resultado ainda seria interessante dependendo do número de bactérias no processo. Porém, com a levedura *S. cerevisiae*, ocorreu essa mesma redução ao final do terceiro ciclo de fermentação. Esse efeito do OE sobre a viabilidade da levedura influenciou os parâmetros fermentativos, comprometendo a produção de etanol.

Foi observada diminuição na produção de etanol ao longo dos ciclos, sendo 2,72, 0,90 e 0,28 g/100 mL nos 1º, 2º e 3º ciclos, respectivamente. O teor de açúcar residual (ART) que, no início era 13,69 g/100 mL, caiu para 9,65 g/100 mL no 1º ciclo, e aumentou para 12,15 e 12,25 g/100 mL nos 2º e 3º ciclos, respectivamente. O pH do meio de fermentação, que se iniciou em 5,5, caiu para 4,68 no 1º ciclo, posteriormente aumentando

para 5,09 e 5,25 no 2º e 3º ciclo, respectivamente. Os resultados de diminuição na produção de etanol, aumento de ART e do pH do meio indicam inibição da fermentação (Figura 14).

Diante do observado, poderia ser estudada a aplicação do OE na concentração de 0,1% v/v, visto que nessa concentração ocorreu perda total da viabilidade da bactéria e redução de menos de 1 ciclo log no número de células da levedura. Dessa forma, seria avaliada se, com a eliminação completa da bactéria contaminante, a produção de etanol seria mantida em uma faixa satisfatória. Porém, em condições experimentais similares com a cepa PE-2, Costa *et al.* (2018) obtiveram produção de 4 g/100 mL de etanol ao final de 3 ciclos fermentativos sem contaminação por *L. fermentum*, caindo para 3 g/100 mL com a adição dessa bactéria no processo. Isso mostra que a diminuição no rendimento fermentativo foi ocasionada, principalmente, pelo OE. Portanto, não seria interessante a adição de concentrações mais elevadas para obter eliminação completa da bactéria contaminante.

A diminuição no número de *S. cerevisiae* e o efeito negativo sobre a produção de etanol, observados nesses experimentos, contradizem as observações feitas por Wilkins *et al.* (2007). Nesse trabalho, foi estudado o efeito de óleo de laranja em *S. cerevisiae* e, foi observado que, apesar de ter sua viabilidade afetada, a levedura foi capaz de se adaptar ao óleo presente no meio e retomar o crescimento e produção de etanol.

As fermentações ocorrem na faixa de pH entre 4 e 5. Ao longo do processo, é comum a diminuição gradual desse parâmetro, devido principalmente à excreção de ácidos orgânicos, absorção de aminoácidos básicos, excreção de dióxido de carbono e absorção de fosfato (COOTE; KIRSOP, 1976; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Porém, nas condições desse experimento realizado, foi observado aumento do pH após a realização do 1º tratamento celular.

Figura 13. Número de *L. fermentum* e *S. cerevisiae* durante fermentação de caldo de cana com reciclo celular, em co-cultura, a 30 °C, com adição de 0,05% v/v de OE de tangerina no tratamento celular entre os ciclos fermentativos. 'Final da fermentação' se refere à concentração de células ao final do ciclo de fermentação de 9 h; 'Após tratamento' se refere à concentração de células ao final do tratamento das células em água com OE, a 30 °C, por 2 h. Os pontos azul e laranja sobre o eixo Y se referem ao número de células de bactéria e levedura, respectivamente, inoculadas no início do Ciclo 1 de fermentação.

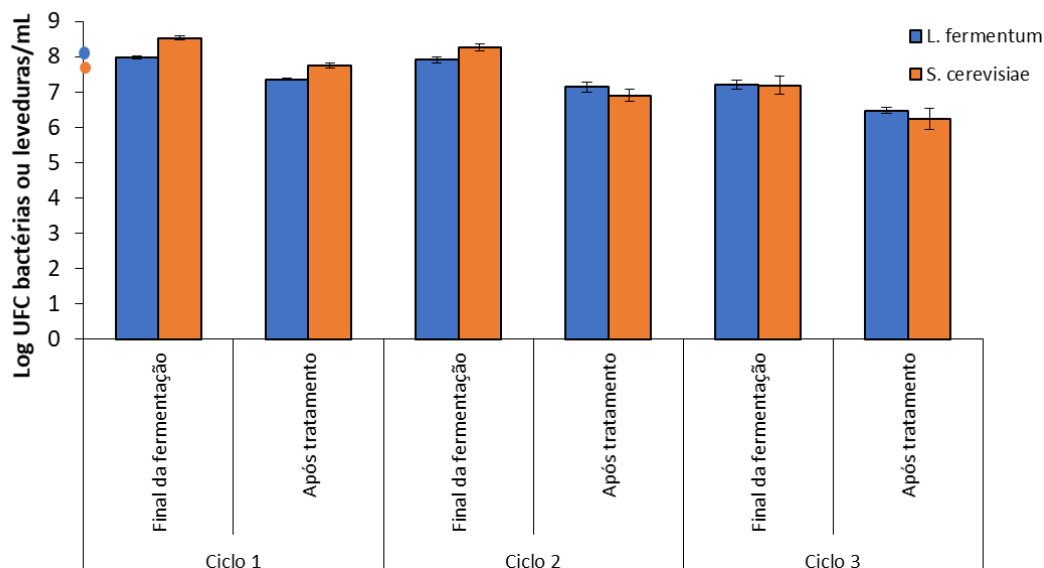
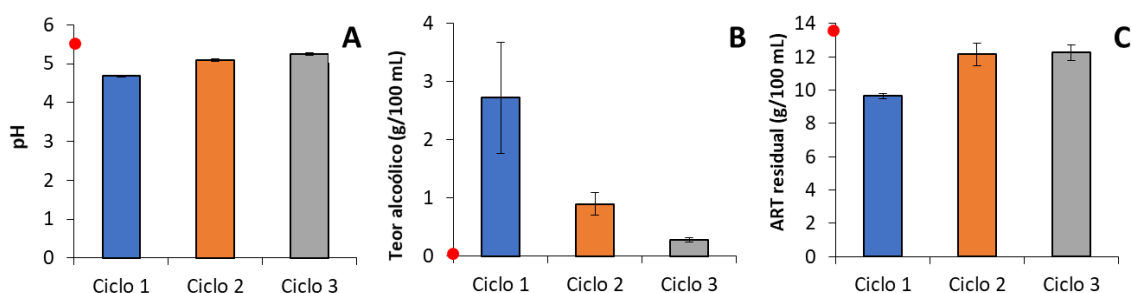


Figura 14. pH final (A), teor alcoólico (B) e ART (C) após fermentação de caldo de cana com reciclo celular, em co-cultura de *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, a 30 °C, com adição de 0,05% v/v de OE de tangerina no tratamento celular entre os ciclos fermentativos. O ponto em vermelho sobre o eixo Y se refere ao valor do parâmetro no início de cada ciclo de fermentação.



Costa, Cerri, Ceccato-Antonini (2017) realizaram o processo fermentativo com caldo de cana estéril no sistema de batelada alimentada com a cultura pura de *S. cerevisiae*, mostrando produção de etanol de 4 g/100 mL ao fim do 3º ciclo fermentativo. Quando em co-cultura com *L. fermentum*, a produção caiu para 3 g/100 mL. O teor de ART residual foi

de 6 g/100 mL e 7 g/100 mL com cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura com *L. fermentum*, respectivamente. O pH ficou próximo de 4 nos dois tratamentos abordados.

Silva-Neto *et al.* (2020) realizaram o processo fermentativo com caldo de cana não estéril, simulando a contaminação com adição de *L. fermentum*. Com o tratamento em pH 2 com ácido sulfúrico, como realizado nas destilarias, não houve efeito sobre a levedura, enquanto na bactéria houve redução de cerca de 5 ciclos logarítmicos ao fim do 1º e 2º ciclos. Em relação ao etanol, nesse mesmo tratamento (pH 2 com ácido sulfúrico), a produção chegou a 5,42 g/100 mL no final do 3º ciclo fermentativo, com 1,02 g/100 mL de ART residual.

Observando esses resultados obtidos com as co-culturas de bactéria e levedura, nota-se que não seria viável a aplicação do OE de tangerina como antimicrobiano na fermentação para produção de etanol, cuja adição no tratamento celular resultou em prejuízo ao processo fermentativo. Portanto, é preciso estudar os mecanismos de ação do OE sobre *S. cerevisiae* para compreender como ocorre essa diminuição da ação antibacteriana sobre *L. fermentum* quando em co-cultura com a levedura e, assim, repensar sobre o emprego do OE de tangerina no processo, buscando alternativas para a aplicação desse composto.

Bassi *et al.* (2014) observaram efeito semelhante ao obtido nesse trabalho com OE de tangerina, ao estudar a ação do metabissulfito de potássio (MBP) para controlar a levedura *Dekkera bruxellensis* na fermentação etanólica. Em culturas puras de ambas as leveduras (*D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*), a adição de MBP em condições não-proliferativas (pH 2,0) e proliferativas (meio YPD, caldo de cana e melaço) afetou muito mais a levedura contaminante que a levedura do processo. No entanto, em co-cultura, *D. bruxellensis* foi pouco afetada pelo MBP, sendo a *S. cerevisiae* mais afetada em comparação com a cultura pura, em condições não-proliferativas. Um dos mecanismos de defesa apresentado por *S. cerevisiae* para tolerar o SO₂ (produto da dissociação do MBP em pH 2) é a ligação dessa molécula ao acetaldeído, inativando o SO₂. Como *D. bruxellensis* não apresenta esse mecanismo de tolerância, em cultura pura essa levedura é afetada, mas em co-cultura é beneficiada por causa da presença de *S. cerevisiae*. Assim, o efeito acaba sendo maior para a levedura do processo do que para a contaminante quando em co-cultura.

Essa alteração observada na ação antimicrobiana do OE quando em co-cultura pode estar relacionada com diversos fatores, como composição do OE e da membrana celular dos micro-organismos, e alteração na produção dos metabólitos de ambos os micro-organismos. Essas alterações no metabolismo ocorrem devido às inúmeras interações entre a levedura e os outros micro-organismos que podem estar presentes no meio durante o processo fermentativo, pois a presença de um outro micro-organismo na cultura apresenta

uma fonte de estresse adicional, além do antimicrobiano presente. Nessa configuração, os dois micro-organismos precisam alterar seu metabolismo para se defender dos metabólitos indesejáveis produzidos pelo outro.

A redução da viabilidade da levedura está relacionada com a competição por diversos nutrientes como tiamina, vitaminas e aminoácidos e, também com a ação de compostos originados do metabolismo das LABs como ácidos láctico, butírico e acético, ácidos graxos hidroxilados, diacetil e reuterina. Diacetil, reuterina e ácidos graxos hidroxilados são relacionados com a inibição da produção de etanol. O diacetil é produzido por diversas LABs, e leveduras são sensíveis a esse metabólito. Reuterina é um antibiótico de amplo espectro que exerce efeito significativo em leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*. Apesar da competição que ocorre na co-cultura, acredita-se também que as LABs são dependentes de nutrientes derivados do metabolismo da levedura, como aminoácidos, pequenos peptídeos, vitaminas e açúcares. A contaminação desencadeia um processo de estresse na levedura e isso favorece a produção de metabólitos secundários, sendo o glicerol e o ácido succínico os compostos produzidos em maiores quantidades. O glicerol está relacionado com o redox e equilíbrio osmótico dentro da célula, e o ácido succínico atua na supressão do crescimento das LABs (BREXÓ; SANT'ANA, 2017).

Diante disso, sugere-se que, em co-cultura, ocorra a produção de algum metabólito pela bactéria ou pela levedura que não ocorre em cultura pura, e esse metabólito se liga com algum composto presente no OE, afetando sua ação antimicrobiana.

Para melhor compreensão da ação do OE sobre os micro-organismos, sugere-se investigação a partir da metabolômica, para avaliar o que é excretado pelos micro-organismos quando estão em cultura pura e co-cultura, e microscopia eletrônica para observar se os danos celulares realmente ocorrem na membrana e parede celular, como apontado por diversos trabalhos encontrados na literatura.

Contudo, o fato de o OE de tangerina ter apresentado uma boa ação antibacteriana sobre *L. fermentum* (redução de cerca de 4 ciclos log) em água, estimula a continuação de trabalhos de pesquisa visando a substituição do tratamento em pH 2,0 com ácido sulfúrico. Há necessidade de avaliar outras estratégias que possam empregar o OE de tangerina sem comprometer a levedura do processo e os parâmetros fermentativos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para a bactéria *L. fermentum* em cultura pura mostram que o OE de tangerina 'Fremont' cultivada em porta-enxerto *P. trifoliata* na concentração de 0,05% v/v tem ação sobre esse contaminante da fermentação etanólica, causando maior redução no número de células do que o tratamento ácido convencional (pH 2,0) utilizado nas destilarias, sem necessidade de acidificar a solução do tratamento celular. Mostram ainda que o efeito sobre a levedura do processo, *S. cerevisiae*, é bem menor que o efeito sobre *L. fermentum*, o que tornaria viável a aplicação desse OE no tratamento celular, substituindo o ácido sulfúrico. Os resultados também mostram que o teste padrão para avaliar atividade antimicrobiana, o ensaio de microdiluição, o qual é realizado com meio de cultura (condição proliferativa), mascara o efeito do óleo essencial, provavelmente devido ao fato de o limoneno ter efeito estimulante de crescimento sobre a bactéria, sendo necessárias concentrações maiores do que as testadas para inibir o crescimento quando esta é inoculada em meio de cultura.

Porém, quando o OE foi aplicado no tratamento celular (na concentração de 0,05% v/v) em processo de fermentação em co-cultura (*S. cerevisiae* + *L. fermentum*), houve redução significativa da sua ação sobre *L. fermentum*, mas o efeito sobre a levedura foi mantido. Esse efeito sobre *S. cerevisiae* comprometeu os parâmetros fermentativos, ocasionando diminuição na produção de etanol, aumento de ART e do pH do meio de fermentação. Com isso, conclui-se que a substituição do ácido sulfúrico no tratamento celular pelo OE de tangerina não é viável, pois prejudicou o processo fermentativo para

produção de etanol. Apesar disso, a satisfatória ação antibacteriana sobre *L. fermentum* apresentada pelo OE em questão, sem necessidade de uso de ácido, estimula a continuação de pesquisas para substituição do ácido sulfúrico na etapa do tratamento celular.

7 LITERATURA CITADA

AJAYI-MOSES, O. B.; OGIDI, C. O.; AKINYELE, B. J. Bioactivity of *Citrus* essential oils (CEOs) against microorganisms associated with spoilage of some fruits. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 22, n. 6, p. 1-15, 2019.

AL-SHUNEIGAT, J. M.; SARAYREH, S. A. Al-; AL-QUDAH, M. A.; AL-SARAIH, Y. M. Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil of *Achillea biebersteinii* and its mode of action. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 8, p. 155-166, 2020.

AMBROSIO, C. M. S.; IKEDA, N. Y.; MIANO, A. C.; SALDAÑA, E.; MORENO, A. M.; STASHENKO, E.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; GLORIA, E. M. Unraveling the selective antibacterial activity and chemical composition of *Citrus* essential oils. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/Coordenadoria Regional Sul, 1997.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. *In*: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, A. G. D.; KLUHSPIES, C. (ed.) **The alcohol textbook**. Nottingham: University Press, 2009. p.39-46

ARAÚJO, J. S. F. de; SOUZA, E. L. de; OLIVEIRA, J. R.; GOMES, A. C. A.; KOTZEBUE, L. R. V.; AGOSTINI, D. L. da S.; OLIVEIRA, D. L. V. de; MAZZETTO, S. E.; SILVA, A. L. da; CAVALCANTI, M. T. Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities: preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 991-999, 2020.

AYODELE, B. V.; ALSAFFAR, M. A.; MUSTAPA, S. I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, p. 2-17, 2020.

BACCARIN, J. G.; OLIVEIRA, J. A. de; MARDEGAN, G. E. The environmental, social and economic effects of recent technological changes in Sugarcane Production in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Agrarian Change**, v. 20, n. 47, p. 598-617, 2020.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *In*: BERNARDES, M. A. S. (ed.) **Biofuel production - recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011. p. 85-100.

BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; AMORIM, H. V. de; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 169-177, 2014.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONATELLI, M. L.; QUERCINE, M. C.; SILVA, M. S.; LABATE, C. A. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **Fems Microbiology Letters**, v. 364, n. 17, p. 1-8, 2017.

BORA, H.; KAMLE, M.; MAHATO, D. K.; TIWARI, P.; KUMAR, P. *Citrus* essential oils (CEOs) and their applications in food: an overview. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 357-382, 2020.

BORZANI, W; SCHMIDELL, W; LIMA, A. U; AQUARONE, E. **Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. 616 p.

BRADDOCK, R. J. **Handbook of Citrus by-products and processing technology**. New York: Wiley, 1999. 246 p.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.

CAMPEDELLI, I.; MATHUR, H.; SALVETTI, E.; CLARKE, S.; REA, M. C.; TORRIANI, S.; ROSS, R. P.; HILL, C.; O'TOOLE, P. W. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 10-31, 2018.

CAMPOLO, O.; GIUNTI, G.; LAIGLE, M.; MICHEL, T.; PALMERI, V. Essential oil-based nano-emulsions: effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 157, p. 112-120, 2020.

CARVALHO-NETTO, O. V; CARAZZOLLE, M. F; MOFATTO, L. S; TEIXEIRA, P. J. P. L.; NORONHA, M. F; CALDERÓN, L. A. L.; MIECZKOWSKI, P. A.; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 14, p. 1-13, 2015.

CASERTA, R.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; GRANATO, L. M.; DORTA, S.O.; RODRIGUES, C. M.; MITRE, L. K.; YOCHIKAWA, J. T. H.; FISCHER, E. R.; NASCIMENTO, C. A.; SOUZA-NETTO, R. R. Citrus biotechnology: what has been done to improve disease resistance in such an important crop?. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 10, n. 5, p. 114-122, 2020.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 1-11, 2018.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; COVRE, E. A. From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 8, foaa065, 2020.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COLOMBI, B. L.; ZANONI, P. R. S.; TAVARES, L. B. B. Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 7, p. 1444-1450, 2018.

COOTE, N.; KIRSOP, B. H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 3, p. 149-153, 1976.

COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2017.

COSTA, O. Y. A.; SOUTO, B. M.; TUPINAMBÁ, D. D.; BERGMANN, J. Carvalho; 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. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 42, p. 73-84, 2015.

COUTOUNÉ, N.; MULATO, A. T. N.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; OLIVEIRA, J. V. C. Draft genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Barra Grande (BG-1), a Brazilian industrial bioethanol-producing strain. **Genome Announcements**, v. 5, n. 13, p. 1-2, 2017.

CRAY, J. A.; BELL, A. N. W.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A. Y.; TIMSON, D. J.; HALLSWORTH, J. E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 453-492, 2013.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

DEĞIRMENCI, H.; ERKURT, H. Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 1, p. 58-67, 2020.

DENG, W.; LIU, K.; CAO, S.; SUN, J.; ZHONG, B.; CHUN, J. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation. **Molecules**, v. 25, n. 1, 217, 2020.

DONG, S. J.; LIN, X. H.; LI, H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 68, p. 33-41, 2015.

FANCELLO, F.; PETRETTO, G. L.; MARCEDDU, S.; VENDITTI, T.; PINTORE, G.; ZARA, G.; MANNAZZU, I.; BUDRONI, M.; ZARA, S. Antimicrobial activity of gaseous *Citrus limon* var *pompia* leaf essential oil against *Listeria monocytogenes* on ricotta salata cheese. **Food Microbiology**, v. 87, p. 1-10, 2020.

FANCELLO, F.; PETRETTO, G. L.; ZARA, S.; SANNA, M. L.; ADDIS, R.; MALDINI, M.; FODDAI, M.; ROURKE, J. P.; CHESSA, M.; PINTORE, G. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of *Citrus limon* var. *pompia* leaf essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 579-585, 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization. Faostat: Statistical database. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 20 set. 2020.

FAOstat (2018) Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 22 nov. 2020.

FARAHMANDFAR, R.; TIRGARIAN, B.; DEHGHAN, B.; NEMATI, A. Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from Thomson navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 124-138, 2020.

GAO, Z.; ZHONG, W.; CHEN, K.; TANG, P.; GUO, J. Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle against *Listeria monocytogenes*. **Industrial Crops and Products**, v. 144, p. 112-136, 2020.

GUCWA, K.; MILEWSKI, S.; DYMERSKI, T.; SZWEDA, P. Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*,

Cinnamomum cassia, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* essential oils. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1116-1134, 2018.

HASHEMINYA, S. M.; DEGHANNYA, J. Composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* hulls' essential oil. **Food Bioscience**, v. 34, p. 100-107, 2020.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936-948, 2012.

LATORRE, I. de; MARTIN-DOMINGUEZ, V.; ACEDOS, M. G.; ESTEBAN, J.; SANTOS, V. E.; LADERO, M. Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 15, p. 5975-5991, 2019.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LEMES, R. S.; ALVES, C. C. F.; ESTEVAM, E. B. B.; SANTIAGO, M. B.; MARTINS, C. H. G.; SANTOS, T. C. L. dos; CROTTI, A. E. M.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1285-1292, 2018.

LEMO, D. A.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Improvement of ethanol production by extractive fed-batch fermentation in a drop column bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 12, p. 2295-2303, 2020.

LIANG, Z.; ZHANG, P.; FANG, Z. Modern technologies for extraction of aroma compounds from fruit peels: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2020.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de etanol. *In*: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial. processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, v. 3, 2001.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

MARQUES, S. **Influência de diferentes porta-enxertos na composição química dos óleos essenciais e do suco de tangerina Fremont IAC 543**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

MARQUEZIN, C. A.; OLIVEIRA, C. M. A. de; VANDRESEN, F.; DUARTE, E. L.; LAMY, M. T.; VEQUI - SUPLICY, C. C. The interaction of a thiosemicarbazone derived from R - (+) - limonene with lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 234, p. 105-115, 2021.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MITROPOULOU, G.; FITSIOU, E.; SPYRIDOPOULOU, K.; TIPTIRI-KOURPETI, A.; BARDOUKI, H.; VAMVAKIAS, M.; PANAS, P.; CHLICHLIA, K.; PAPPA, A.; KOURKOUTAS, Y. *Citrus medica* essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 84, p. 344-352, 2017.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIELSEN, C. K.; KJEMS, J.; MYGIND, T.; SNABE, T.; MEYER, R. L. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1878, 2016.

OKUNOWO, W. O.; OYEDEJI, O.; AFOLABI, L. O.; MATANMI, E. Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 04, n. 7, p. 1-9, 2013.

OLIVA-NETO, P. de; DORTA, C.; CARVALHO, A. F. A.; MARTA, V.; LIMA, G. de; SILVA, D. F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation - yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. **Materials and Processes for Energy**, v. 1, n. 56, p. 371-379, 2013.

OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; KETTUNEN, H.; PEURANEN, S.; SCHULZE, H.; RAUTONEN, N. In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, v. 2, n. 55, p. 71-78, 2010.

PEDROSA, G. T. de S.; SOUZA, E. L. de; MELO, A. N. F. de; ALMEIDA, E. T. da C.; GUEDES, J. P. de S.; CARVALHO, R. J. de; PAGÁN, R.; MAGNANI, M. Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, p. 108-116, 2020.

PEDROSA, G. T. S.; CARVALHO, R. J.; BERDEJO, D.; SOUZA, E. L.; PAGÁN, R.; MAGNANI, M. Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus spp.* essential oils combined with mild heat treatments. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 4, p. 848-858, 2019.

REIS, V. R.; ANTONANGELO, A. T. B. F.; BASSI, A. P. G.; COLOMBI, D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; CERRI, B. C.; ALMEIDA, A. R.; CARVALHO, I. G. B.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, A. M.; NUNNALLY, M. S. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 347-354, 2015.

SHARMIN, F.; WAKELIN, S.; HUYGENS, F.; HARGREAVES, M. *Firmicutes* dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

SILVA, L. N.; SANTOS, S. B. F.; PAIXÃO, I. C. S.; VILELA, R. C. C.; PEREIRA, T. **S. Industria de óleos essenciais no brasil: uma perspectiva a partir do programa de modernização das estatísticas econômicas**. Anais IV CONAPESC. Campina Grande: Realize Editora, 2019.

SILVA-NETO, J. M. da; COVRE, E. A.; ROSA, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 60, n. 37, p. 323-332, 2020.

SURESH, A.; VELUSAMY, S.; AYYASAMY, S.; RATHINASAMY, M. Techniques for essential oil extraction from kaffir lime and its application in health care products — A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 36, p. 5-21, 2020.

UDOP – União Nacional da Bioenergia. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2021/06/10/producao-de-etanol-nos-eua-tem-maxima-de-15-meses-e-gera-otimismo-para-o-milho.html>. Acesso em 11 jul 2021.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (Brasil). Unica. Safra 20/21 termina com crescimento na moagem de cana. 2021. Disponível em: <https://unica.com.br/noticias/safra-20-21-termina-com-crescimento-na-moagem-de-cana/>. Acesso em: 13 mai. 2021.

VASIREDDY, L.; BINGLE, L. E. H.; DAVIES, M. S. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. **Plos One**, v. 8, n. 13, p. 1-26, 2018.

VIEIRA, A. J.; BESERRA, F. P.; SOUZA, M. C.; TOTTI, B. M.; ROZZA, A. L. Limonene: aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**. v. 28, p. 97 – 106, 2018.

VITO, M. di; BELLARDI, M. G.; SANGUINETTI, M.; MONDELLO, F.; GIROLAMO, A.; BARBANTI, L.; GARZOLI, S.; SABATINO, M.; RAGNO, R.; VITALI, A. Potent in vitro activity of *Citrus aurantium* essential oil and *Vitis vinifera* hydrolate against gut yeast isolates from

irritable bowel syndrome patients — The right mix for potential therapeutic use. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1329, 2020.

WILKINS, M. R., SURYAWATI, L.; MANESS, N. O.; CHRZ, D. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 57, p.1161-1168, 2007.