

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MINAS GERAIS
UNIDADE FRUTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA DE
Azadirachta indica A. Juss NA INIBIÇÃO DE
CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**Laiane Pereira Rocha
Tecnóloga em Alimentos**

FRUTAL-MG

2025

Laiane Pereira Rocha

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA
DE *Azadirachta indica A. Juss* NA INIBIÇÃO DE
CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Frutal, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dra. Taís Arthur Corrêa

Co-orientador
Dr. Gustavo Henrique Gravatim Costa

**FRUTAL-MG
2025**

Rocha, Laiane Pereira
L672c Composição Química e Ação Antimicrobiana de Azadirachta Indica A.
Juss na Inibição de Contaminantes na Fermentação Alcoólica / Laiane Pereira
Rocha. - Frutal, 2025.
123 f. : il. color.; fig., tab.

Orientador: Dra. Taís Arthur Corrêa. Co-Orientador: Dr. Gustavo Henrique
Gravatim Costa

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG.
Unidade Frutal, 2025.

1. Bactéria. 2. Levedura. 3. Metabólitos secundários. 4. Neem. 5. Fermentação
alcoólica. I. Corrêa, Taís Arthur. II. Costa, Gustavo Henrique Gravatim. III.
Universidade do Estado de Minas Gerais - Unidade Frutal. IV. Título.

CDD: 660.2842

Catalogação na fonte

Bibliotecária. Nereida Nanci Pimenta dos Santos – CRB-6/4379/O



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

Ata

LAIANE PEREIRA ROCHA

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÃO ANTIMICROBIANA DA AZADIRACHTA INDICA A. JUSS NA INIBIÇÃO DE CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA"

Dissertação apresentada a Universidade do Estado de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, na área de concentração Ciências Ambientais, Linha de Pesquisa Tecnologia, Ambiente e Sociedade, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 28 de março 2025

Profª. Dr.ª Maria Benincasa Vidotti- UNESP - Jaboticabal -SP

Profª. Dr.ª Viviane Modesto Arruda -UEMG -Ubá-MG

PROFª DRª TAÍS ARTHUR CORRÊA

UEMG FRUTAL/ORIENTADORA



Documento assinado eletronicamente por **Viviane Modesto Arruda, Professora de Educação Superior**, em 31/03/2025, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Taís Arthur Correa, Professora de Educação Superior**, em 31/03/2025, às 13:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARIA BENINCASA VIDOTTI, Usuário Externo**, em 15/04/2025, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **110418830** e o código CRC **F7ACD76D**.

Referência: Processo nº 2350.01.0007712/2024-40

SEI nº 110418830

Dedico este trabalho à minha
avó Eva Antônia, minha
inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que esteve comigo em cada etapa dessa jornada, me dando força, coragem e serenidade para seguir em frente, especialmente nos momentos mais desafiadores. Sem Ele, essa conquista não seria possível.

Aos meus pais Valdinei e Maria Do Carmo, que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar e crescer. Vocês são minha base, minha inspiração e meu maior apoio. Aos meus irmãos, Weliton, Cristiane e Dayane, pelo carinho incondicional, pelas palavras de incentivo e por sempre estarem ao meu lado. Ter vocês comigo fez toda a diferença.

À Taís Arthur, minha orientadora, meu mais sincero agradecimento. Desde a iniciação científica, você esteve presente, me ensinando, guiando e despertando ainda mais minha paixão pela ciência. Sua paciência, dedicação e apoio inabaláveis foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Obrigado por acreditar em mim e por me ajudar a enxergar meu potencial.

Ao Gustavo Gravatim, meu coorientador, sou muito grata por todo o suporte e incentivo ao longo do mestrado. Seu olhar crítico, suas sugestões e, acima de tudo, sua disponibilidade para ajudar sempre que precisei, foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Mais do que um coorientador, você foi um grande parceiro nessa caminhada, e sua confiança no meu trabalho fez toda a diferença.

Ao meu amigo Vinícius Ferraz, Doutorando em Entomologia, minha imensa gratidão. Obrigada por todo carinho, por sempre estar disposto a ajudar e por ser um grande amigo ao longo dessa trajetória. Seu apoio, conselhos e disposição para compartilhar conhecimento fizeram toda a diferença nos momentos de desafio.

Aos meus amigos do grupo Nesucro Chelcia, Giovanni, Edilaine, Fernanda Beatris, Mariana, Luis, Marcos, Daniela e Nadia, obrigada por cada conversa, por cada ajuda no laboratório e por cada momento compartilhado. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Aos profissionais Fernanda, Arthur e Adriana, vocês não foram apenas técnicos de laboratório, foram verdadeiros amigos ao longo dessa trajetória. Obrigada pelo suporte, pelas risadas e pela paciência. Aos servidores e à equipe da secretaria, minha gratidão por sempre estarem dispostos a ajudar e facilitar meu caminho dentro da universidade.

À Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) por toda a estrutura e recursos disponibilizados para que essa pesquisa pudesse ser realizada. Sem esse suporte, muitos dos desafios teriam sido ainda maiores.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo financiamento que permitiu minha dedicação integral à pesquisa.

“E tudo o que pedirem em oração, se crerem, vocês receberão”

Mateus 21:22

RESUMO

A fermentação etanólica é um dos principais processos industriais no Brasil, amplamente utilizado na produção de biocombustíveis e bebidas fermentadas. Contudo, bactérias como *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* comprometem a eficiência do processo e danificam a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Embora antimicrobianos sintéticos sejam empregados para conter essas contaminações, seu uso favorece a resistência microbiana, evidenciando a necessidade de alternativas naturais. A *Azadirachta indica*, com suas propriedades medicinais, surge como uma solução promissora devido aos compostos químicos com atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos. Este estudo teve como objetivo preparar e avaliar a composição química dos extratos de folhas, cascas e sementes de *A. indica*, a atividade antimicrobiana contra as principais bactérias contaminantes na fermentação etanólica e a aplicação dos extratos no processo fermentativo. Para tanto, folhas, cascas e sementes foram coletadas, higienizadas, secas e moídas. Em seguida, essas foram submetidas ao preparo dos extratos utilizando maceração e fracionamento líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades. A caracterização fitoquímica foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Também quantificaram-se os teores de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e atividade antioxidante. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio de testes de difusão em disco, seguido de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição, utilizando *L. fermentum* e *L. mesenteroides* como modelos bacterianos. Na sequência, os extratos foram aplicados em processo fermentativo em batelada com reciclo de células, por nove ciclos consecutivos. Para esse teste, utilizou-se a levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1, avaliando-se o controle de contaminantes ao longo dos ciclos, bem como a fisiologia da levedura em fermentação. Os resultados mostraram que os extratos das cascas e folhas de *A. indica* apresentaram eficácia antimicrobiana contra *L. fermentum* e *L. mesenteroides* sem causar danos a *S. cerevisiae*. O extrato da casca foi o mais eficiente, com inibição bacteriana observada a partir de concentrações de 0,5 mg/mL, enquanto as sementes não apresentaram ação contra as bactérias. A análise fitoquímica identificou altos níveis de taninos, flavonoides e compostos fenólicos, sendo os taninos nas cascas e os flavonoides nas folhas, responsáveis pela atividade antimicrobiana. Nos experimentos de fermentação, os extratos da casca favoreceram o crescimento de leveduras, controlaram contaminantes ao longo dos ciclos e resultaram em maior teor alcoólico no vinho. Assim, os extratos das cascas de *A. indica*, podem substituir antimicrobianos sintéticos, reduzir a dependência de produtos químicos e promover práticas sustentáveis, alinhadas à preservação ambiental e à sustentabilidade industrial.

Palavras-chave: Bactéria. Levedura. Metabólitos secundários. Neem.

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTION OF *Azadirachta indica* A. Juss IN THE INHIBITION OF CONTAMINANTS IN ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT

Ethanol fermentation is one of the main industrial processes in Brazil, widely used in the production of biofuels and fermented beverages. However, bacteria such as *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc mesenteroides* compromise the efficiency of the process and damage the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Although synthetic antimicrobials are employed to control these contaminations, their use promotes microbial resistance, highlighting the need for natural alternatives. *Azadirachta indica*, with its medicinal properties, emerges as a promising solution due to its chemical compounds with antimicrobial activity against various microorganisms. This study aimed to prepare and evaluate the chemical composition of extracts from leaves, barks, and seeds of *A. indica*, the antimicrobial activity against the main contaminating bacteria in ethanol fermentation, and the application of the extracts in the fermentation process. To this end, leaves, barks, and seeds were collected, cleaned, dried, and ground. Subsequently, they were subjected to extract preparation using maceration and liquid-liquid fractionation with solvents of different polarities. Phytochemical characterization was performed using Thin Layer Chromatography (TLC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The levels of phenolic compounds, flavonoids, tannins, and antioxidant activity were also quantified. Antimicrobial activity was evaluated through disk diffusion tests, followed by determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using the microdilution method, with *L. fermentum* and *L. mesenteroides* as bacterial models. Subsequently, the extracts were applied in batch fermentation processes with cell recycling over nine consecutive cycles. For this test, the industrial yeast *S. cerevisiae* CAT-1 was used, evaluating the control of contaminants throughout the cycles, as well as the physiology of the yeast during fermentation. The results showed that the bark and leaf extracts of *A. indica* were effective against *L. fermentum* and *L. mesenteroides* without causing damage to *S. cerevisiae*. The bark extract was the most efficient, with bacterial inhibition observed at concentrations starting from 0.5 mg/mL, while the seeds showed no action against the bacteria. Phytochemical analysis identified high levels of tannins, flavonoids, and phenolic compounds, with tannins in the bark and flavonoids in the leaves being responsible for the antimicrobial activity. In fermentation experiments, the bark extracts favored yeast growth, controlled contaminants over the cycles, and resulted in higher alcohol content in the wine. Thus, *A. indica* bark extracts can replace synthetic antimicrobials, reduce dependency on chemical products, and promote sustainable practices aligned with environmental preservation and industrial sustainability.

Keywords: Bacteria. Yeast. Secondary metabolites. Neem.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 – Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 2 – Bactéria <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20
Figura 3 – Bactéria <i>Lactobacillus fermentum</i>	20
Figura 4 – Estrutura química da ampicilina	22
Figura 5 – Própolis produzido por abelhas.....	23
Figura 6 – Jambolão (<i>Syzygium cumini</i> L.).....	24
Figura 7 – Flor lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L.).	25
Figura 8 – <i>Azadirachta Indica</i> (folhas, cascas, flores e frutos).	27
Figura 9 – Estruturas químicas dos principais compostos isoprenoides presentes no Neem. .	29
Figura 11 – A - Estrutura da proantocianidinas. B - Estrutura de taninos hidrolisáveis.....	31

Capítulo 3

Figura 1 – Perfil cromatográfico dos extratos FEt, CEt e SEt. Fase móvel: Hexano/Acetato de etila (80:20). Reveladores: (A) Anisaldeído sulfúrico e aquecimento, (B) Liebermann-Burchard, (C) Liebermann-Burchard – sob luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2024).	66
Figura 2 – Perfil cromatográfico dos extratos FEt, CEt e SEt Fase móvel para A e B: Butanol/Água/ Ácido acético (99: 1:0,5, v/v). Reveladores: A. NP+PEG com aquecimento – visível; B. NP+PEG – UV 365 nm; Fase móvel para (C e D: Acetato de etila/Metanol (97:3). Reveladores: C. Soluções de Cloreto férreo 1% (m/v) e Ferrocianeto de potássio 1% (m/v), D. Solução Cloreto Férrico a 1% (m/v). Fonte: os autores (2024).....	67
Figura 3 – Espectro ATR-FTIR de FEt, CEt e SEt. Fonte: os autores (2024).	68
Figura 4 – Teste de antibiograma realizado com o ampicilina, Própolis e FEt e CEt. Letras nas colunas diferem de acordo com o teste de Tukey (5%). Fonte: os autores (2024).....	71
Figura 5 – Interação entre doses e tempos para o controle mínimo inibitório utilizando FEt e os microrganismos <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>L. fermentum</i> (B). Letras maiúsculas comparam doses. Letras minúsculas comparam tempos. Fonte: os autores (2024).....	71
Figura 6 – Interação entre doses e tempos para o controle mínimo inibitório utilizando CEt os microrganismos <i>L. mesenteroides</i> (A) e <i>L. fermentum</i> (B). Letras maiúsculas comparam doses. Letras minúsculas comparam tempo. Fonte: os autores (2024).	72

Capítulo 4

Figura 1 – Identificação de terpenos por CCD: A) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); B) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: Hexano/acetato de etila (8:2); Reveladores: Anisaldeído sulfúrico e aquecimento. Fonte: os autores (2025).....	88
Figura 2 – Identificação de esteroides por CCD: A) e B) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); C e D) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: hexano/acetato de etila (8:2). Reveladores: A) e C) Libermann-Burchard – luz Visível; (B e D) Libermann-Burchard – luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2025).....	88
Figura 3 – Identificação de Taninos por CCD: A) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); B) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: Hexano/acetato de etila (8:2); Fase móvel: Acetato de etila/metanol (9,7:0,3). Revelador: Cloreto férrico 1%. Fonte: os autores (2025).....	89
Figura 4 – Identificação de Flavonoides e fenólicos por CCD: A) e B) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq). C) e D) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: clorofórmio/metanol (9:1), Reveladores: a) e c) : NP+Peg – luz visível; b) e d): NP+Peg – luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2025).....	90
Figura 5 – Inibição do crescimento de <i>L. Fermentum</i> (A) e <i>L. Mesenteroides</i> (B) diferentes concentrações de FEt, FFH, FFD, FFA e FFAq. Fonte: os autores (2025).....	91
Figura 6 – Inibição do crescimento de <i>L. Fermentum</i> (A) e <i>L. Mesenteroides</i> (B) com diferentes concentrações de CEt, CFA e CFAq. Fonte: os autores (2025).....	92

Capítulo 5

Figura 1 - Representação esquemática da análise da viabilidade celular das células da levedura.	111
Figura 2 - Processo de pesagem da levedura após a centrifugação.....	112
Figura 3 - Interação entre antimicrobianos e ciclos para índice de brotamentos (A) e viabilidade de brotos (B) de leveduras no inóculo. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento.	111
Figura 4 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para viabilidade celular (A) índice de	

brotamentos (B) de leveduras no início. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento.	112
Figura 5 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para crescimento de levedura (A) contaminação do inóculo por bactérias láticas (B). Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento.	113
Figura 6 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para os seguintes parâmetros do vinho: Glicose (A), Frutose (B), Glicerol (C) e Etanol (D). Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento.	114
Figura 7 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para a eficiência fermentativa. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento.	114

LISTA DE TABELA

Capítulo 2

Tabela 1 – Ordem crescente da polaridade dos solventes utilizados para extrair metabólitos secundários.	32
---	----

Capítulo 3

Tabela 1 – Quantitativos de extrato e reagentes para determinação de taninos totais.....	63
Tabela 2 – Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de Neem por CCD em sílica gel.	68
Tabela 3 – Estatísticas descritivas da concentração dos compostos fenólicos totais, taninos totais, flavonoides e atividade antioxidante de FEt, CEt e SEt do Neem.	69

Capítulo 4

Tabela 1 – Sistemas de Eluentes e Agentes Reveladores para Identificação de Metabólitos Secundários na Cromatografia em Camada Delgada dos Extratos Brutos e Fracionados de Neem.....	85
Tabela 2 – Massa e Rendimentos dos Extratos Brutos e das Frações Obtidas das Folhas e Cascas de Neem.....	87
Tabela 3 – Perfil Fitoquímico e Eficácia Antimicrobiana dos Extratos brutos e Fracionados de folhas e cascas de <i>A.indica</i> frente a <i>L. fermentum</i> e <i>L. mesenteroides</i>	93

Capítulo 5

Tabela 1 – Valores obtidos para Glicose, Frutose, Sacarose e Brix do Caldo e do Mosto utilizados no ensaio.	109
Tabela 2 – Valores médios obtidos para viabilidade celular (VC), índice de brotamentos (BR) e viabilidade de brotos (VB) da levedura no inóculo, início e final do processo fermentativo de 9 ciclos consecutivos, contendo tratamentos com antimicrobiano.....	110

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1. Fermentação Alcoólica.....	18
2.2. Antimicrobianos Sintéticos e Naturais.....	21
2.2.1. Própolis	22
2.2.2. Jambolão	23
2.2.3. Lúpulo.....	25
2.3. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Neem).....	26
2.4. Composição Química do Neem.....	28
2.5. Metabólitos Secundários: Mecanismos e Potencial Antimicrobiano	33
2.6. Atividade antimicrobiana de <i>Azadirachta indica</i>	34
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 3 – EXTRATOS DE <i>Azadirachta indica</i> CONTROLAM BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS	57
3.1. Introdução.....	59
3.2. Material e Métodos.....	60
3.2.1. Coleta do material vegetal e identificação botânica	60
3.2.2. Obtenção dos extratos vegetais.....	60
3.2.3. Caracterização por Cromatografia em Camada delgada	61
3.2.4. Caracterização por Espectroscopia ATR-FTIR	62
3.2.5. Quantificação de metabólitos secundários	62
3.2.5.1. Teor de compostos fenólicos totais	62
3.2.5.2. Teor de Flavonoides totais.....	63
3.2.5.3. Teor de Taninos totais	63
3.2.5.3. Avaliação antioxidant	64
3.2.6. Atividade antimicrobiana pelo teste antibiograma	64
3.2.7. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	65
3.2.8. Análise estatística	65
3.3. Resultados e Discussão	65
3.3.1. Caracterização fitoquímica	65
3.3.2. Avaliação antimicrobiana	70
3.4. Conclusão	73
REFERÊNCIAS	75
CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DO FRACIONAMENTO NA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>Azadirachta indica</i> CONTRA BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA	80
4.1. Introdução.....	82
4.2. Material e Métodos.....	83
4.2.1. Coleta e preparação de material vegetal	83
4.2.2. Obtenção dos extratos brutos e fracionados	83
4.2.3. Caracterização por Cromatografia em Camada delgada	84
4.2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	85
4.2.5. Análise estatística	86
4.3. Resultados	86
4.3.1. Rendimento dos extratos	86

4.3.2. Avaliação fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	87
4.3.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	90
4.4. Discussão.....	92
4.5 Conclusão	96
REFERÊNCIAS	98
CAPITULO 5 – EXTRATOS DE <i>Azadirachta indica</i> COMO AGENTE ANTIMICROBIANO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL.....	102
5.1. Introdução.....	104
5.2. Material e métodos	105
5.2.1. Preparo dos extratos de Neem (antimicrobianos).....	105
5.2.2. Preparo e caracterização do substrato para fermentação	105
5.2.3. Fermentação.....	106
5.2.3.1. Ativação da Levedura	106
5.2.3.2. Fermentação.....	106
5.2.4. Avaliações do processo fermentativo	107
5.2.4.1. Leveduras durante a fermentação	107
5.2.4.2. Metabólitos da levedura presentes no vinho.....	108
5.2.4.3. Rendimentos de processo	108
5.2.4.4. Bactérias contaminantes	108
5.2.5. Análise dos dados	109
5.3. Resultados	109
5.3.1. Caracterização do Substrato	109
5.3.2. Levedura na fermentação.....	109
5.3.3. Análise do vinho	113
5.4. Discussão.....	115
5.5. Conclusão	117
REFERÊNCIAS	118
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	123

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

O uso de produtos naturais no controle de microrganismos que infectam o processo de fermentação alcoólica é um campo de pesquisa em desenvolvimento. Embora o processo seja dominado pelas leveduras, a contaminação bacteriana indesejada pode ocorrer e afetar a qualidade do produto final. Neste contexto, deve-se destacar ainda, a resistência adquirida por bactérias aos antimicrobianos convencionais sintéticos (ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, penicilina, virginiamicina e monensina sódica), o que pode levar a seleção de microrganismos cada vez mais prejudiciais ao processo industrial, bem como a saúde humana (Silva *et al.*, 2021).

Deve-se considerar ainda, que as bactérias que contaminam o processo fermentativo, chegam as dornas de fermentação juntamente com a matéria-prima, consumindo o açúcar do mosto, e produzindo ácidos orgânicos, gomas e outros metabólitos; o que podem levar a morte celular das leveduras, formação de espuma no reator, bem como floculação do fermento. As principais bactérias contaminantes são do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, que trazem perdas significativas no rendimento fermentativo (Torres-Guardado *et al.*, 2022).

Considerando as problemáticas do uso prolongado dos antibióticos sintéticos, como o desenvolvimento de resistência bacteriana, os custos elevados associados ao tratamento, e resíduos nos destilados e leveduras (Kronka, 2021); os compostos bioativos naturais, com ação bactericida, são alternativas viáveis e baratas, com resultados comprovados. Entre esses, destacam-se: o lúpulo, o jambolão e a própolis (Przybyłek; Karpiński, 2019).

As atividades biológicas presentes nesses compostos estão associadas à presença de diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, terpenoides, taninos entre outros. Esses, demonstram atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias. Eles podem exercer efeitos bacteriostáticos ou bactericidas, auxiliando no combate, controle do crescimento e proliferação desses microrganismos (Prasad *et al.*, 2023).

Neste contexto, a busca por plantas que apresentam esses metabólitos tem crescido significativamente nos últimos anos. Entre essas, pode-se destacar o Neem (*Azadirachta indica*), que é nativa da Índia e de outras regiões da Ásia, que vêm sendo utilizada em diversos segmentos de mercado (Abebe, 2021). Seus compostos químicos, presentes em diversas partes da planta (folhas, cascas e sementes), apresentam eficácia contra diversas doenças, por possuírem propriedades antioxidantes, antimutagênicas, anti- inflamatórias e antimicrobianas

(Sidat *et al.*, 2023). Tais propriedades possibilitam o desenvolvimento de novos fitoterápicos, permitindo o tratamento de malária, câncer, diabetes e diversas doenças inflamatórias (Pingali *et al.*, 2020; Joseph *et al.*, 2021; Ammara *et al.*, 2023). Além do uso medicinal, estudos indicam que o Neem demonstra grande versatilidade na agricultura, atuando como controlador natural de pragas e doença, reduzindo a necessidade de pesticidas químicos e promovendo uma agricultura mais sustentável (Rana *et al.*, 2023).

A ação antimicrobiana do Neem, tem despertado interesse na comunidade científica, devido sua capacidade de combater bactérias gram-negativas e gram-positivas (Singaravelu *et al.*, 2019), o que pode possibilitar seu uso em outras áreas de aplicação, como a agroindústria (Islas *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi a prospecção de antimicrobianos naturais à base de Neem para aplicação no processo de fermentação etanólica. Foram obtidos extratos alcoólicos brutos das folhas, cascas do tronco e sementes de *A. indica*, além de extratos fracionados dessas mesmas partes da planta.

O estudo avaliou a presença de taninos, flavonoides, terpenos e alcaloides, presentes em cada extrato, a partir de análises qualitativas e quantitativas. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana contra as cepas de *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, e *Saccharomyces cerevisiae* dos extratos (bruto e fracionados), comparando sua eficácia com a ampicilina (antibiótico antibacteriano) e actidiona (antifúngico).

Com base nos objetivos delineados para a pesquisa, elaboraram-se as seguintes hipóteses: i) Os extratos brutos e fracionados de Neem apresentarão atividade antimicrobiana significativa contra *L. fermentum* e *L. mesenteroides* presentes no processo de fermentação etanólica; ii) Os extratos alcoólicos do Neem não apresentarão ação antimicrobiana ante *S. cerevisiae*; iii) Os extratos alcoólicos do Neem apresentarão diferentes perfis de compostos bioativos e, consequentemente, distintos níveis de atividade antimicrobiana; iv) As frações dos extratos apresentarão maior atividade antimicrobiana em comparação com os extratos brutos.

O estudo é estruturado em 6 capítulos, sendo o primeiro destinado para introdução geral da dissertação. O segundo capítulo correspondente ao referencial teórico, aborda o processo fermentativo, incluindo a influência da levedura e outros microrganismos no desenvolvimento e na qualidade do produto final. São discutidos os principais contaminantes microbiológicos que podem afetar a fermentação alcoólica, bem como as estratégias de controle para garantir a eficiência e a segurança do processo. Adicionalmente, são analisados os antimicrobianos de

origem sintética e natural comumente empregados no setor sucroenergético. Com informações relevantes da planta *Azadirachta indica*, onde são examinadas sua origem, composição química e suas propriedades antimicrobianas. São revisadas evidências científicas que corroboram a eficácia do Neem no controle de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias e fungos. Tais informações são cruciais para fundamentar a discussão e análise dos resultados apresentados aos próximos capítulos.

No capítulo 3, propôs-se a investigar a avaliação da composição química e antimicrobiana dos extratos brutos das folhas, cascas e sementes contra *L. mesenteroides*, *L. fermentum* e *S. cerevisiae*. No quarto capítulo, a avaliação da composição química e da atividade antimicrobiana foi realizada com os extratos fracionados das folhas e cascas que apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos de interesse. No capítulo 5, os extratos brutos das folhas e cascas foram aplicados ao processo de fermentação alcoólica. A dissertação contou ainda com o capítulo 6, que apresentou as considerações finais.

CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. – Fermentação Alcoólica

O Brasil é líder mundial na produção de açúcar e o segundo maior produtor de etanol. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, em 2023, o país exportou 1,4 bilhão de litros de etanol, enquanto importou 30,4 milhões, gerando um superávit de US\$ 890 milhões. Esses números destacam o crescimento do setor sucroalcoleiro, impulsionando significativamente a economia nacional, gerando empregos diretos e indiretos, aumentando as exportações, contribuições para o PIB e no uso de energias renováveis proveniente da matéria-prima (Conab, 2023).

A produção de etanol envolve várias etapas até alcançar o produto final. Inicialmente, a cana-de-açúcar é submetida ao processo de extração do caldo, o qual apresenta em sua constituição, compostos solúveis e insolúveis. Dentre os compostos insolúveis, deve-se destacar a presença de terra, bagacilho, pedras, metais, entre outros. Os compostos solúveis compreendem os açúcares (sacarose, glicose e frutose) e os não-açúcares (proteínas, aminoácidos, lipídeos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos, amido, além de compostos inorgânicos – nitrogênio, potássio, fósforo, ferro, zinco, manganês, entre outros) (Brasil, 2021).

Objetivando a remoção de compostos insolúveis, bem como alguns compostos solúveis presentes no caldo de cana, que podem vir a ser interferentes da fermentação etanólica, o caldo extraído é submetido a um processo de clarificação físico-química (Macri, 2014).

O processo de clarificação antecede o preparo do mosto, eliminando impurezas presentes no caldo de cana-de-áçucar capazes de afetar as leveduras e o processo fermentativo. Esse processo envolve tratamentos físicos, como a peneiração alteração de temperatura; e químicos como a adição de leite de cal, enxofre e polímero. Primeiramente, o caldo é peneirado e submetido a ajuste de *pH* para 6,0 a 6,5 utilizando leite de cal (hidróxido de cálcio). Na sequência, o caldo é aquecido a 105 °C e disposto em decantador, no qual é adicionado polieletrolito sintético aniónico para sedimentação de impurezas que afetam o processo fermentativo (Araújo, 2007; Santos *et al.*, 2013).

Após 1 hora em decantação, o caldo clarificado (sobrenadante) é recuperado e submetido a ajuste de °Brix, *pH*, Temperatura e Nutrientes originando o substrato de fermentação denominado mosto o qual apresenta condições ideais para a levedura

desenvolver o processo fermentativo (Brasil, 2021).

Na sequência, o mosto é misturado ao fermento, o qual é constituído majoritariamente por cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1), que consomem os açúcares para a manutenção celular, bem como os utilizam para a produção de novas células. Neste processo, há liberação, para o meio, de etanol, CO₂ e outras moléculas inerentes ao metabolismo desse microrganismo (Cruz, 2019).

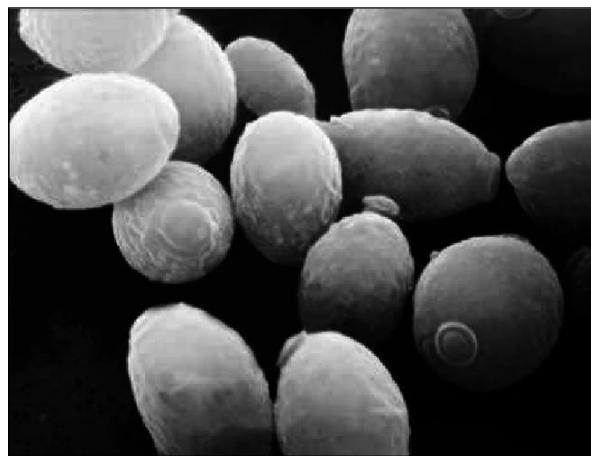


Figura 1 – Levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: Gaensly (2010).

No entanto, vários fatores podem atrapalhar o processo de fermentação, diminuindo a conversão de glicose em etanol, sendo a mesma direcionada a outras vias metabólicas desse microrganismo, resultando em baixos rendimentos industriais (De la rosa *et al.*, 2017; Campanhol *et al.*, 2019). Dentre estes, pode-se destacar os (fenólicos, ácidos orgânicos) e inorgânicos (alta concentração de alumínio, cálcio e potássio), bem como a presença de bactérias que contaminam o processo (Souza Rodrigues *et al.*, 2020; Parapouli *et al.*, 2020).

As bactérias gram-positivas são as que mais induzem problemas no processo fermentativo, uma vez que as bactérias gram-negativas podem ser influenciadas negativamente pelo etanol presente nas dornas de fermentação, o qual pode agir sobre os lipídeos da parede celular, ocorrendo a solubilização dos mesmos, resultando na morte celular desses microrganismos (Messetti *et al.*, 2020).

Dentre as bactérias gram-positivas, as do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc* são as que apresentam maior presença nos processos industriais (Naves *et al.*, 2010). A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 2) é anaeróbia facultativa e possuem capacidade de

produzir componentes como goma, a partir da conversão de sacarose em polímeros de dextrana. Esse processo pode levar ao entupimento de filtros, tubulações, bem como à adesão às células de levedura, o que pode causar floculação e, consequentemente, reduzir a taxa de conversão de açúcares em etanol (Gonçalves *et al.*, 2021; Messetti *et al.*, 2020).

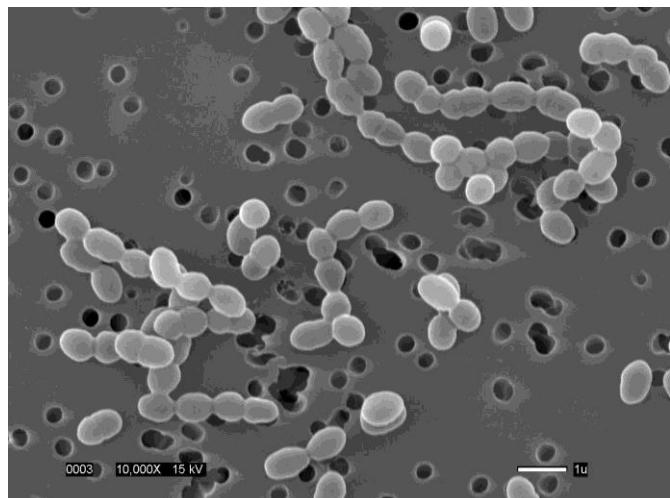


Figura 2 – Bactéria *Leuconostoc mesenteroides*

Fonte: JGI (2024)

Lactobacillus fermentum (Figura 3) é uma bactéria capaz de produzir manitol, ácido lático e ácido acético, a partir da metabolização de carboidratos, como glicose, frutose e sacarose. Comum em ambientes fermentativos, pode causar a diminuição no rendimento de etanol, uma vez que consome açúcares que seriam utilizados pela levedura para produção de etanol (Costa *et al.*, 2018).

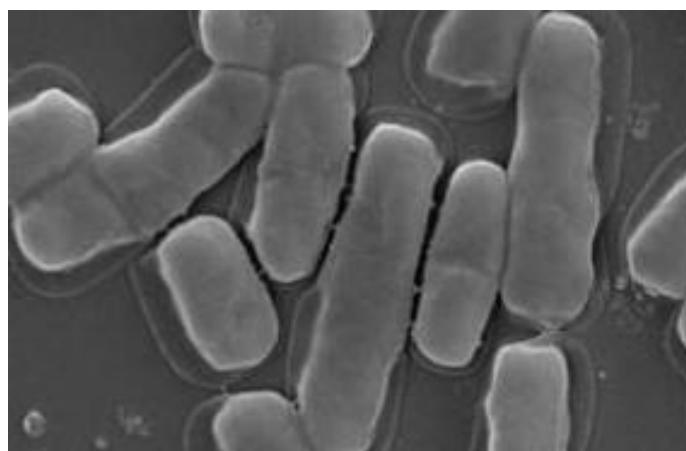


Figura 3 – Bactéria *Lactobacillus fermentum*

Fonte: Kang *et al.* (2019)

Os antibióticos, especialmente a penicilina, virginiamicina e monensina sódica, são tradicionalmente usados como agentes antimicrobianos (Ceccato-Antonini, 2018). Entretanto, compostos naturais, derivados de plantas, microrganismos e outros recursos, têm ganhado cada vez mais mercado em decorrência do potencial de controle de bactérias gram- positivas (Stefanello *et al.*, 2018).

2.2. Antimicrobianos Sintéticos e Naturais

O controle antimicrobiano no processo fermentativo pode ser realizado com o uso de agentes químicos, dentre eles os antibióticos. Os antibióticos são produzidos por meio de inóculos da cultura de fungos ou bactérias, a partir das reações químicas provenientes de suas vias metabólicas ou através de processos de síntese química (Pereira; Oliveira, 2016; Lima; Trevisan, 2021).

As propriedades antimicrobianas dos antibióticos podem ser de origem sintética, semi-sintética ou natural, que demonstram eficácia em diferentes concentrações. Essas substâncias agem ao atingir seu alvo específico, eliminando o microrganismo (microbiocida), impedindo seu crescimento (microbiostático) e também sua reprodução (Jesus Pereira; De Andrade; De Abreu, 2021).

No que se refere ao processo fermentativo, os antibióticos sintéticos agem na inibição da parede celular, ribossomos, replicação do DNA, síntese de RNA e enzimas específicas (Murphree *et al.*, 2014). Contudo, os diferentes antibióticos podem apresentar mecanismos distintos de atuação.

No antibiótico penicilina e seus derivados, como a ampicilina (Figura 4), o anel beta-lactâmico é responsável pela inibição da parede celular bacteriana, sendo o principal responsável pelo mecanismo (Mora-Ochomogo *et al.*, 2021).

O anel beta-lactâmico possui três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio e tem efeitos antimicrobianos. Para que exiba atividade antibacteriana, o anel deve estar conjugado a um grupo específico (geralmente outro anel) presente na estrutura química do composto. Todos os antibióticos beta-lactâmicos possuem ação bactericida, sua ação se baseia na inibição síntese da parede celular bacteriana, uma estrutura rígida que confere forma e rigidez a célula bacteriana, protegendo contra a pressão osmótica interna e a entrada de substâncias nocivas do meio ambiente (Arruda *et al.*, 2019; Santana, 2017).

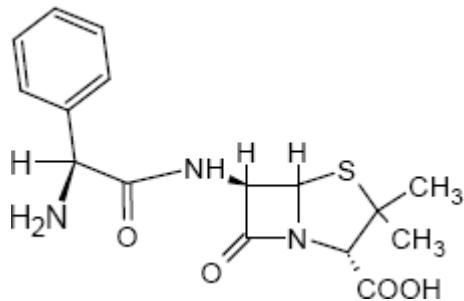


Figura 4 – Estrutura química da ampicilina

Fonte: Putarov e Galende (2011).

Assim como os outros antibióticos, a ampicilina pode desenvolver resistência de diferentes formas. As bactérias podem alterar a permeabilidade da membrana celular limitando a entrada do antibiótico no seu local alvo. A resistência pode surgir através das alterações do sítio de ação que envolvem modificações estruturais em proteínas envolvidas no transporte do antibiótico, bem como em proteínas que atuam na ativação e inativação do fármaco. Outro mecanismo de resistência relevante é a bomba de efluxo, que atua removendo o antimicrobiano do meio intracelular, evitando assim sua ação no local de ação específica do medicamento (Rodrigues *et al.*, 2024; Arruda *et al.*, 2019; Douafer *et al.*, 2019).

Outros fatores, como o uso excessivo, inadequado e a falta de monitoramento, também estão relacionados com à resistência das bactérias. Diante deste cenário, torna-se necessário a investigação e desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas. Neste contexto, substâncias de origem natural têm despertado interesse devido suas propriedades farmacológicas (Viegas; Bolzani; Barreiro, 2006).

Extratos de fontes naturais, em comparação com as substâncias sintéticas, possuem grande diversidade estrutural, e seus compostos podem interagir de forma sinérgica, ou seja, quando combinados, seus efeitos antimicrobianos são amplificados, resultando em uma atividade mais potente do que aqueles compostos isolados. Dentre os antimicrobianos naturais utilizados na fermentação alcoólica, destacam-se a própolis, jambolão e lúpulo, que apresentam efeitos bactericidas ante *Lactobacillus fermentum* e a *Leuconostoc mesenteroides* (Viégas *et al.*, 2011; Oliveira Filho, 2010; Caetano; Madaleno, 2011).

2.2.1. Própolis

A própolis (Figura 5) é um produto natural produzido por abelhas (Sousa *et al.*, 2019), cuja composição química pode variar de acordo com as espécies desses insetos, condições

ambientais, características climáticas, condições fitogeográficas, e época de coleta; as quais também, influenciam sobre as propriedades sensoriais (cheiro aromático, cor, aspectos físicos) (Eghbal *et al.*, 2022).



Figura 5 – Própolis produzido por abelhas

Fonte: Duqueyrox (2015).

Os principais compostos químicos encontrados na própolis incluem agliconas, flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas, quinonas, cumarinas, esteróides aminoácidos e compostos inorgânicos (Pobiega *et al.*, 2019). Esses diferentes conjuntos de metabólitos se correlacionam com sua atividade antibacteriana e antifúngicas, agindo na membrana ou na parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (Lustosa *et al.*, 2008).

O potencial antibacteriano da própolis pode variar entre as cepas, dependendo da amostra de própolis utilizada (Almuhayawi, 2020), podendo combater uma variedade de tipos microrganismos incluindo fungos, vírus, bactérias e até parasitas (Salatino, 2022). Em estudos científicos, a própolis e seus derivados demonstraram atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Roh *et al.*, 2018; Arslan *et al.*, 2011; Bansal *et al.*, 2020; Sa-eed *et al.*, 2023) e antifúngica, contra *Candida albicans*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium spp* e, *Trichophyton sp*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium sp.*, *Botryosphaeria sp.*, e *Botrytis sp* (Corrêa *et al.*, 2020; Barros *et al.*, 2022; Costantinet *et al.*, 2022).

2.2.2. Jambolão

O *Syzygium cumini*, pertencente à família *Mirtaceae* (Figura 6) é conhecido por diversos

nomes como jambolão, jamelão, cereja, jalão, kambol, jambú, ameixa roxa, murta, baga de freira, guapê, jambuí, entre outros. Originário da Índia, está presente em diversas regiões do Brasil, utilizado para sombreamento devido à sua copa densa e ao porte alto, alcançando até 10 metros de altura. Possui propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênica sendo empregada nas indústrias alimentícias, farmacêutica e cosmética (Tatum *et al.*, 2018; Brito *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2016; Vizzotto, 2009).



Figura 6 – Jambolão (*Syzygium cumini* L.).

Fonte: Santos (2017).

O jambolão possui diferentes tipos de compostos químicos que variam de acordo com a parte da planta em que são encontrados. Nas sementes estão presentes os taninos hidrolisáveis, óleos essenciais, antimelina, quercetina, nas cascas triterpenóides, ácido acetil oleanólico, canferol; nas folhas ácido gálico, canceferol, ácido clorogênico; e nas flores ácido oleanólico (Corrêa *et al.*, 2018).

Os compostos inibem tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, demonstrando eficácia contra uma variedade de cepas, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* (Viera *et al.*, 2012; Migliato *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2018; Sharma, 2018; Oliveira *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2017; Cartaxo-Furtado *et al.*, 2015), e com atividade antifúngica contra *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida albicans* (Saha *et al.*, 2013; Kaneria; Chanda, 2011; Khan *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2009).

2.2.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma flor da família *Cannabaceae* (Figura 7), conhecida por ser essencial na produção dos diferentes tipos de cerveja, fornecendo-lhes seus diversos sabores e aromas. Nas indústrias cervejeiras, são utilizadas apenas flores não fertilizadas de plantas fêmeas, pois estas contêm substâncias como resinas, polifenóis e óleos essenciais, que conferem gosto amargo, propriedades antioxidantes e aroma específico à bebida (Durello *et al.*, 2019).

Na flor do lúpulo, são encontrados outros compostos químicos, como os terpenos, flavonoides, taninos e fitoestrógenos, que possuem propriedades farmacológicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Yan *et al.*, 2021).



Figura 7 – Flor lúpulo (*Humulus lupulus L.*).

Fonte: Bordon (2020).

O extrato de lúpulo possui atividade antibacteriana contra *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* e atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* e *Fusarium semitectum*, *Botrytis cinerea* (Bartmańska *et al.*, 2018; Wendakoon; Calderon; Gagnon, 2012; Weber *et al.*, 2019). Nos estudos de Nionelli *et al.* (2018), os extratos de lúpulo, combinados com a fermentação de bactérias lácticas, retardam efetivamente o crescimento de fungos, como o crescimento de hifas de *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium carneum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium chermesinum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti* no pão, melhorando perfil sensorial.

Devido às suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas, os compostos do lúpulo também

podem atuar por mecanismos induzidos por ionóforos de prótons nas bactérias. O excesso de prótons no citoplasma bacteriano leva à acidificação do meio interno, desestabilizando o pH e prejudicando o funcionamento de enzimas essenciais para a sobrevivência da bactéria. Essa disfunção enzimática pode ocasionar a interrupção de processos metabólicos vitais, como a respiração celular e a síntese de proteínas, levando à morte da bactéria (Behr; Vogel, 2009; Fahle *et al.*, 2022).

2.3. *Azadirachta indica* A. Juss (Neem)

A *Azadirachta indica* A. Juss, é conhecida popularmente como Nim indiano ou "Neem". Originária do sudeste da Ásia e do subcontinente indiano, é uma planta medicinal pertencente à família *Meliaceae*, reconhecida por suas diversas propriedades terapêuticas e aplicada em várias tradições medicinais ao redor do mundo. Foi introduzida oficialmente no Brasil por volta de 1984, e está presente em várias regiões do país (Guedes *et al.*, 2022).

A espécie apresenta ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais perenes, demonstrando a capacidade de adaptação a diversos fatores climáticos, topográficos e edáficos (Chandra; Thakur, 2021).

É uma árvore de porte variável, podendo alcançar alturas de 15 a 20 m de altura. Seu tronco é caracterizado por uma estrutura parcialmente reto, medindo de 30 a 80 centímetros de diâmetro. A copa pode apresentar entre 8 a 12 metros, podendo chegar a 15 metros em árvores isoladas, e expectativa de vida de 200 anos (Mossini; Kemmelmeier, 2005; Neves *et al.*, 2003).

Reconhecida por sua resistência a climas secos, o crescimento se mostra melhor em áreas com precipitação anual variando de 400 a 1200 mm. Embora possa crescer em áreas com precipitação anual inferior a 400 mm. Essa espécie é adaptável a diversos tipos de solo, mas apresenta melhor desenvolvimento em solos profundos e arenosos, com pH entre 6,2 e 7,5, com temperaturas médias anuais entre 21 e 32 °C, sendo capaz de tolerar calor intenso. No entanto, não suporta temperaturas abaixo de 4 °C, o que pode resultar em queda de folhas e até morte da planta (Martinez, 2011; Maithani *et al.*, 2011).

Além de sua capacidade de adaptação ambiental, o Neem (Figura 8) apresenta uma série de características distintivas que o torna facilmente reconhecível em seu habitat natural, suas folhas são alternadas e pinadas, a casca possui uma textura que pode ser fissurada ou texturizada, variando de tons de cinza esbranquiçado a marrom avermelhado (Mehta; Chandra; Thakur, 2021). As flores são brancas, pequenas, perfumadas, caídas e agrupadas axilarmente. O

fruto é pequeno, comestível e possui coloração amarelada quando maduro. Apresenta morfologia singular, assemelhando-se a uma drupa glabra de formato arredondado (Patel *et al.*, 2016).

A colheita dos frutos, de modo geral, ocorre de forma manual, uma vez ao ano, com produção estimada de 30 a 50 kg por planta (Araújo *et al.*, 2000; Neves., 2003).



Figura 8 – *Azadirachta indica* (folhas, cascas, flores e frutos).

Fonte: Autora (2025).

Várias partes da planta do Neem têm sido investigadas em estudos abrangentes, explorando suas possíveis aplicações em diversos campos científicos. Como parte de sua atividade farmacológica, apresenta propriedades antioxidantes, antimálaricas, antimutagênicas, anticancerígenas, anti-inflamatórias, anti-hiperglicêmicas e antidiabéticas (Raja RatnaReddy *et al.*, 2020; Baby *et al.*, 2022; Uzzaman *et al.*, 2019).

Estudos de Shah *et al.* (2020) demonstram o efeito do extrato das folhas do Neem contra infecções adquiridas em ambientes hospitalares, causadas por agentes patogênicos. Pesquisas

realizadas por Manca *et al.* (2021) apontaram que o óleo da semente de Neem auxilia no processo de cicatrização de feridas. Já Bandyopadhyay *et al.* (2002), observaram efeitos dos extratos das cascas no controle da hiperacidez gástrica e úlceras, atribuídos aos glicosídeos fenólicos e sua capacidade de prevenir danos oxidativos à mucosa gástrica.

No desenvolvimento de tratamentos imunológicos, em estudos *in vitro* de Shah *et al.* (2009) o extrato das flores estimulou respostas imunes específicas como aumento da produção de citocinas e ativação de linfócitos T e B, e inespecíficas na atividade citotóxica e fagocítica de macrófagos.

Além de seu uso abrangente na medicina, o Neem é reconhecido por sua eficácia no controle de pragas de plantas e mosquitos. Através de bioensaios, Almeida *et al.* (2021) demonstraram que o extrato etanólico da folha apresentou atividade larvicida, resultando em 100% de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Também foi identificada a eficácia larvicida do extrato de Neem contra a lagarta do algodão *Helicoverpa armigera*, através da redução na produção de proteínas que são essenciais para o seu crescimento e reprodução (Dawkar *et al.*, 2019).

As pesquisas de Ali *et al.* (2023) revelaram que os extratos aquosos das folhas de Neem, preparados a partir de infusão, apresentam potencial promissor como agentes biofungicidas contra fungos fitopatogênicos.

De forma geral, os efeitos benéficos da *A. indica* podem ser atribuídos a um ou mais compostos fitoquímicos, presentes em partes da planta (semente, folhas, casca e frutos), como: flavonoides, terpenoides, taninos, alcaloides, entre outras substâncias, que precisam ser constantemente investigados, afim de conhecer suas propriedades medicinais e/ou toxicológicas (Gupta; Tannaz, 2017; Ujah *et al.*, 2021).

Entretanto, ressalta-se que apesar dos compostos bioativos presentes no Neem serem encontrados em toda a planta, sua concentração e facilidade de extração pode variar de acordo com a parte da planta estudada e o método/solvente de extração empregados (Simões, 2016). Outro fator importante é a variação da composição química de seus metabólitos secundários devido aos fatores ambientais, tais como luz, temperatura, disponibilidade da água no solo, fertilidade e sazonalidade (Yang *et al.*, 2018).

2.4. Composição Química do Neem

A árvore de Neem, pertencente à família *Meliaceae*, apresenta uma rica diversidade de

metabólitos secundários, sendo identificados cerca de 406 moléculas distintas, extraídas de diferentes partes da planta (Kharwar *et al.*, 2020). Entre as classes de compostos encontra-se os terpenóides, os flavonoides, taninos, as lignanas, as proteínas, compostos fenólicos, entre outras (Mulyani; Sinaga; Supratman, 2023; Ninkuu *et al.*, 2021).

Entre os terpenoides não voláteis, destacam-se os limonoides: azadiractina, meliantriol, nimbina, salanina e nibidina (Figura 9), caracterizados pela presença de um núcleo central composto por quatro anéis cílicos, que formam um tetraciclo (Passos *et al.*, 2021).

Os terpenóides também estão entre os compostos bioativos mais relatados em relação aos insetos, interferindo no sistema hormonal, reprodutivo, comportamento alimentar, desenvolvimento e fisiologia, resultando em uma redução significativa das populações de pragas agrícolas (Muhammad; Kashere, 2020; Fernandes *et al.*, 2019; Naniwadekar ; Jadhav, 2012), o que os torna uma alternativa natural para o controle de pragas (Akihisa *et al.*, 2021).

A azadiractina foi identificada como o princípio ativo em maior concentração nas sementes maduras e folhas, responsável pela ação inseticida e biopesticida, sendo seguro para os humanos e para o meio ambiente (Muhammad; Kashere, 2020; Fernandes *et al.*, 2019).

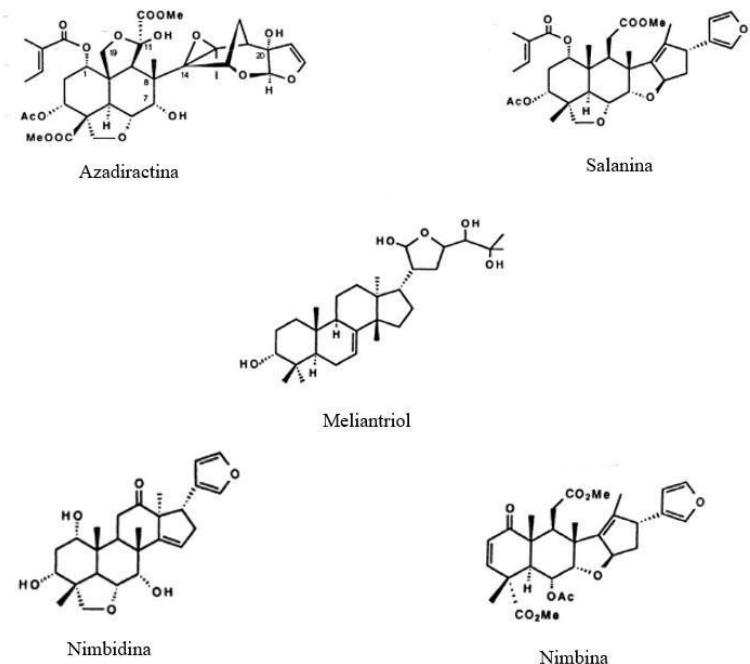


Figura 9 – Estruturas químicas dos principais compostos isoprenoides presentes no Neem. Fonte: National Research Council (2002).

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários que contêm um

grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila ligado a um anel aromático, compondo um grupo quimicamente heterogêneo com mais de 8.000 variações identificadas (Alara *et al.*, 2021). Estão presentes em diversas partes das plantas como nas folhas, cascas, sementes, frutos e flores. São fundamentais na adaptação da planta em condições de estresse, como ferimentos, infecções ou exposição à radiação UV (Albuquerque *et al.*, 2020).

A grande diversidade química dos compostos fenólicos permite que desempenhem várias funções nos vegetais. Taninos, flavonoides e alguns compostos fenólicos simples atuam como defesa contra herbívoros e patógenos, bem como atuar como atrativos importantes para polinizadores e dispersores de sementes (Ozeker, 1999).

A ação antioxidante dos compostos fenólicos é determinada por suas características estruturais, como o número e a posição dos grupos hidroxila, bem como pelas substituições nos anéis aromáticos. Esses compostos têm propriedades redox, permitindo que absorvam e neutralizem radicais livres, quelando oxigênio triplete e singuleto, além de quebrar peróxidos. Dessa forma, retardam ou prevenem a oxidação de lipídios e outras moléculas, impedindo o início ou a continuação de reações oxidativas em cadeia (Balasundram *et al.*, 2006; Degáspari; Nina, 2004).

Os flavonoides, que constituem mais da metade dos compostos fenólicos nas plantas, são uma classe diversificada de compostos fitoquímicos, notáveis por suas propriedades biológicas e benefícios à saúde humana. Além de participarem de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa da planta contra patógenos atuam em resposta ao estresse oxidativo, tanto abiótico quanto biótico, absorvendo radiação UV-B e UV-A, e inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio (Agati *et al.*, 2012; Trojak, Skowron, 2017).

Dentre as classes de flavonoides, as catequinas e epicatequinas são conhecidas por formar taninos condensados, que são importantes para a saúde do coração e prevenção de doenças (Cosme *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2017).

Taninos desempenham um papel fundamental na defesa contra predadores e em processos de crescimento. Essas substâncias são amplamente reconhecidas por suas propriedades adstringentes, responsáveis pelo sabor amargo e seco de muitos tipos de frutas e bebidas, como o vinho e o chá (Couto *et al.*, 2021; Silin *et al.*, 2017). Do ponto de vista da saúde humana, têm demonstrado atividades antioxidantes significativas, ajudando a neutralizar os radicais livres no corpo e reduzindo o risco de várias doenças crônicas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares, além de serem capazes de inibir o crescimento de alguns fungos,

bactérias e vírus (Borges Filho, Felfili, 2003; Monteiro *et al.*, 2005).

Estudos na literatura também apontaram que essa classe de compostos possui propriedades anti-inflamatórias, tornando-os úteis no tratamento de infecções e no auxílio à cicatrização de feridas, contribuindo para a saúde digestiva, na redução da inflamação intestinal e na proteção contra úlceras (Nascimento *et al.*, 2021).

Os taninos são divididos, de acordo com a estrutura química, em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. As proantocianidinas (Figura 11A) são semelhantes as antocianinas, por apresentarem pigmentos avermelhados. Elas exibem uma enorme diversidade estrutural, que resulta de diferentes padrões de substituição entre unidades flavânicas, posições de ligação e estereoquímica dos compostos (Milene Angelo; Jorge, 2007).

Os taninos hidrolisáveis (Figura 11B) são compostos com núcleo central de glicose ou poliol esterificado com ácido gálico (parte fenólica). Eles são conhecidos por dois compostos principais: galotaninos, que são rodeados por várias unidades galofila, nos quais o ácido gálico é esterificado com glicose ou polióis e os elagitaninos onde, o ácido elágico está esterificado com glicose ou polióis (He, 2022; Farha *et al.*, 2020)

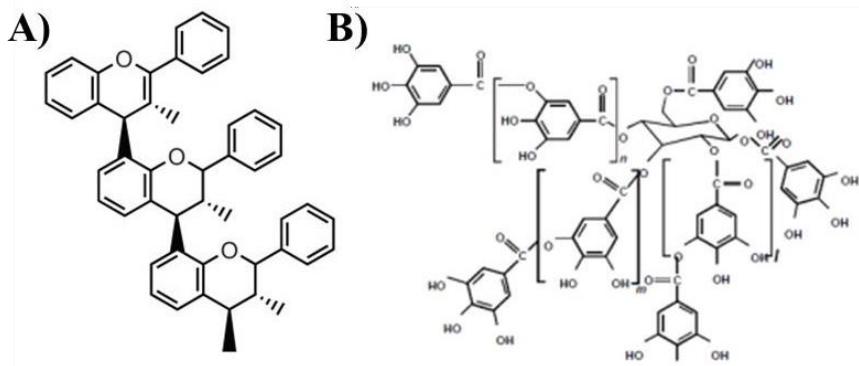


Figura 11 – A – Estrutura da proantocianidinas. B – Estrutura de taninos hidrolisáveis.

Fonte: Falcone Ferreyra *et al.* (2012); Nakamura *et al.* (2003).

Dentre os compostos fenólicos mencionados anteriormente, diversos estudos foram conduzidos com o Neem, resultando na identificação de alguns desses compostos. Nigussie *et al.* (2021) investigaram os principais metabólitos secundários presentes nos extratos metanólicos das folhas, revelando a presença de diversos compostos bioativos, incluindo alcaloides, terpenoides, saponinas, flavonoides, fenóis, taninos e esteroides. Entre esses fitoquímicos, os flavonoides e as saponinas se destacam como responsáveis pelos efeitos observados na planta, como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes.

Rao (2019) e colaboradores revelaram a presença de um flavonol em várias partes vegetativas, utilizando análise espectroscópica de LC-MS (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa). A presença de quercetina, rutina e ácido tântico nos extratos da mesma planta foram confirmados por Sharma *et al.* (2022). Resultados similares foram reportados por Júnior *et al.* (2018), que observaram uma concentração significativa de quercetina, um flavonoide, nas folhas de *Azadirachta indica*. Foram identificados por Nagano *et al.* (2021) compostos fenólicos, incluindo taninos, catequinas, flavonas, flavonoides e xantonas.

Para extração desses compostos fenólicos e outros metabólitos secundários de plantas medicinais e aromáticas, a maceração, digestão, infusão, decocção, extração soxhlet, percolação, extração alcoólica aquosa por fermentação, extração em contracorrente, extração por ultrassom, extração com fluido supercrítico e etapa fitônica são os mais utilizados (SUN *et al.*, 2023). O uso de solventes para a extração é também fundamental, pois diferentes substâncias são solúveis em solventes específicos. São utilizados diferentes solventes com diferentes polaridades para os processos de extração de diversas substâncias químicas encontradas nas plantas (Tabela 1).

Tabela 1 – Ordem crescente da polaridade dos solventes utilizados para extrair metabólitos secundários.

Solventes	Compostos preferencialmente extraídos
Pentano, hexano, éter de petróleo.	Furanocumarinas, hidrocarbonetos, lipídeos, óleos essenciais, pigmentos, ceras
Tolueno, diclorometano, clorofórmio.	Bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos, óleos fixos, ceras
Tolueno, diclorometano, clorofórmio.	Flavonoides, cumarinas simples, sapogeninas.
Etanol, metanol.	Heterosídeos em geral.
Soluções hidroalcoólicas, água.	Saponinas, taninos
Soluções aquosas acidificadas.	Alcaloides
Soluções aquosas alcalinizadas.	Saponinas

Fonte: Soares *et al.* (2016).

Para identificar esses compostos, podem ser utilizadas técnicas rápidas, simples e

baratas, como método colorimétrico com testes específicos, nos quais se observa o desenvolvimento de coloração, fluorescência e/ou a formação de precipitado Costa (2001), Simões (2016), Matos (2009).

A técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma análise qual-quantitativa que permite a separação e identificação de diversos compostos presentes na amostra, com base em suas afinidades de adsorção em uma fase estacionária. São empregados reveladores, como reagentes químicos e a luz UV (Ultravioleta) para identificar classes de específicas de compostos (Kalász *et al.*, 2020).

As análises colorimétricas também permitem a quantificação desses compostos através da Espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis), capaz de determinar a presença e/ou concentração de um analito de interesse. Para identificar e analisar os compostos orgânicos e inorgânicos com base em suas vibrações moleculares, emprega-se a técnica de espectroscopia da região infravermelho. Esta técnica permite a identificação de grupos funcionais específicos em uma molécula, com vibrações ocorrendo em comprimentos de onda característicos. Esta metodologia é citada por autores como Lopes e Fassio (2004).

2.5. Metabólitos Secundários: Mecanismos e Potencial Antimicrobiano

Os metabólitos secundários apresentam uma composição química diversificada, que influencia diretamente na sua atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos. Ação desses compostos podem ser bactericidas ou bacteriostáticos, dependendo do seu mecanismo de interação contra o microrganismo alvo (Prasad *et al.*, 2023). Esses compostos naturais possuem vantagens em relação aos antimicrobianos sintéticos, devido à sua menor toxicidade e menor impacto ambiental (Karnwal; Malik 2024). Além disso, enquanto o uso indiscriminado de antimicrobianos sintéticos tende a favorecer o surgimento de resistência bacteriana, os metabólitos secundários atuam por meio de diferentes mecanismos, o que reduz a pressão seletiva sobre bactérias e diminui a probabilidade de surgimento de cepas (Christaki.; Marcou; Tofarides, 2019).

Dentre os metabólitos secundários, os principais com atividade antimicrobiana são os fenólicos (taninos, flavonóides), terpenos, esteroides, onde seus mecanismos de ação variam de acordo com sua estrutura química (Franco; Vázquez, 2020).

A presença de grupos de hidroxilos nos compostos fenólicos é essencial para sua atividade antimicrobiana. A ação dos mesmos podem ocorrer através da penetração na

membrana celular bem como na inibição de enzimas, que afetam os processos vitais impedindo as bactérias de proliferarem. (Kauffmann; Castro, 2023). Os taninos alteram as propriedades físico-químicas, como a fluicidades e a permeabilidade, além de aderir as proteínas da membrana bacteriana causando sua inibição (Czarkas *et al.*, 2024; Farha *et al.*, 2020).

Em estudos de Zhang *et al.* (2023), os flavonoides atuam principalmente na membrana celular das bactérias gram-positivas, danificando as bicamadas fosfolipídicas e inibindo a cadeia respiratória. A quercetina, age principalmente na síntese de ácidos nucleicos e protéinas bacterianas, causam disfunção mitocondrial, além da prevenir a formação de biofilmes (Nguyen; Bhattacharya, 2022).

Os terpenos causam estresse oxidativo, que resulta no aumento da peroxidação lipídica que impacta na matriz polimérica extracelular e na formação de biofilme (Kumari *et al.*, 2019). Os esteroides são uma classes de compostos com capacidades de atuar principalmente contra microrganismos patogênicos, através da interação com receptores específicos permitindo que haja inibição do crescimento de bactérias e fungos (Merlani *et al.*, 2023).

A eficácia dos metabólitos secundários como agentes microbianos pode variar de acordo com a espécie bacteriana, da concentração do composto presente no extrato e da presença de mecanismo de resistência no microrganismo. Vale ressaltar que ação sinérgica dessas classes de compostos amplia a eficácia antimicrobiana e reduz a resistência microbiana.

2.6. Atividade antimicrobiana de *Azadirachta indica*

Devido à crescente resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado e aos desafios associados à produção de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica, aos altos custos de pesquisa envolvidos, vários estudos têm se dedicado à investigação de plantas medicinais com potencial atividade antimicrobiana. Essas pesquisas visam encontrar novas alternativas terapêuticas (Durand *et al.*, 2018; Souza Menezes *et al.*, 2021; Singaravelu *et al.*, 2019).

As plantas medicinais, como possuem mais de um produto químico como princípio ativo, têm diversas funções, incluindo a proteção contra imunes por fungos, bactérias e vírus, bem como a resistência por insetos e outros animais (Khanal *et al.*, 2021).

Diversos estudos têm relatado as propriedades antimicrobianas das diferentes partes do Neem, incluindo folhas, casca e sementes (Bassey *et al.*, 2016; Subhani *et al.*, 2019; Handago

et al., 2019). Estes relatos destacam a eficácia do Neem contra uma variedade de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Nos estudos de Jeba Malar *et al.*, (2019), os extratos metanólicos e aquosos do Neem, demonstraram alta atividade antimicrobiana contra a superbactéria *Klebsiella pneumoniae*. Em estudos de Cristo *et al.* (2016), os extratos demonstraram efeito sinérgico significativo em combinação com a amicacina, e foram contra cepas multidrogaresistentes (MDR) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos resultados obtidos por Oyelese *et al.* (2020) os óleos essenciais das sementes maduras e verdes apresentaram alta inibição contra *Staphylococcus aureus* em comparação com o antibiótico sintético nitrofuraton. No entanto, enquanto os óleos essenciais das sementes verdes demonstraram uma atividade antimicrobiana moderada a alta contra *Pseudomonas aeruginosa*, os óleos essenciais das sementes maduras não apresentaram a mesma eficácia.

As avaliações antimicrobianas de Galeane *et al.* (2017), os extratos das folhas obtidos com acetato de etila e butanol foram eficazes contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*. Já contra *Enterococcus faecalis*, o extrato hidroetanolico e a fração aquosa apresentaram maior atividade de inibição. Em estudos em testes *in vitro* dos extratos do Neem comparando com a eficácia com hipoclorito de sódio ou clorexidina, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos contra a *Enterococcus faecalis* (Sinha *et al.*, 2017).

Avaliações de Hikaambo *et al.* (2022), utilizando diferentes concentrações dos extratos de folhas de Neem, observaram que a concentração inibitória mínima (CIM) variou conforme o tipo de solvente utilizado para a extração. O extrato aquoso mostrou ser o mais eficaz contra *Escherichia coli*, com uma CIM de 10 mg/mL. Por outro lado, o extrato etanolico apresentou uma CIM de 20 mg/mL para a mesma bactéria.

Em outros estudos, os extratos frescos, aquosos e etanolicos das folhas e cascas apresentaram eficácia apenas contra *Staphylococcus aureus*, já para a bactéria *Escherichia coli*, não apresentaram efeito inibitório (Francine *et al.*, 2015). Em contrapartida, extratos das folhas apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* (Khan; Yaqoob; Ahmad, 2021). Nas cepas da *Salmonella enterica* *sorovar Typhi*, bactérias resistentes a antibióticos, os extratos das cascas também demonstraram atividades inibitórias, podendo ser desenvolvidas posteriormente para aplicação quimioterápica (Mathew *et al.*, 2017). Os extratos acetônicos, metanolicos e etanolico de folhas e cascas possuem atividade significativa tanto antibacteriana quanto antifúngica contra as cepas

patogênicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* (Bassey *et al.*, 2016).

Destacando o potencial antifúngico dos extratos do Neem, pesquisas realizadas por Keta *et al.* (2019) indicam que os extratos etanólicos são mais eficazes que os extrato aquosos no controle de crescimento de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus fumigatus*.

Compostos isolados das partes da planta, como o glicolípedo isolado das folhas, possuem atividade antibacteriana contra *Salmonella typhi*, isolados de *Shigella dysenteriae*, *Scherichia coli* e *Vibrio cholerae*, além de exibir atividade anti-herpética contra o vírus herpes simplex (HSV) (Haritkar *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários do Neem podem apresentar uma atividade antibacteriana mais eficaz contra bactérias gram-positivas em comparação com as gram-negativas. Essa diferença está relacionada com a estrutura da membrana externa das bactérias gram-negativas, que possuem uma complexa rede de repulsão. Essa membrana é rica em lipopolissacarídeos hidrofílicos, conferindo uma maior resistência a compostos hidrofóbicos, como os terpenos hidrofóbicos e terpenos oxigenados presentes nos metabólitos do Neem (Maia, 2021; Okoh, 2019).

Ainda não há estudos sobre a ação antimicrobiana do Neem contra cepas de bactérias contaminantes na fermentação etanólica. Durante esse processo, as indústrias enfrentam desafios devido a contaminação bacteriana, incluindo as cepas *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesensteroides*, que pode comprometer a qualidade do produto final. Portanto, o Neem pode oferecer a perspectiva de reduzir ou eliminar esses contaminantes, melhorando a eficiência e a qualidade do processo de fermentação etanólica.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, H. Effects of pot size and planting media on the early seedling growth performance of *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 4, p. 208-213, 2021. Disponível em: <https://www.sciencepublishinggroup.com/article/10.11648/j.jps.20210904.21>. Acesso 20 mar. 2024.
- AGATI, G.; AZZARELLO, S.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as Antioxidants in plants: Location and Functional Significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945212001586>. Acesso em: 5 mai. 2024.
- AKIHISA, T.; ZHANG, J.; MANOSROI, A.; KIKUCHI, T.; MANOSROI, J.; ABE, M. Limonoids and other secondary metabolites of *Azadirachta indica* (neem) and *Azadirachta indica* var. *siamensis* (Siamese neem), and their bioactivities. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 68, p. 29-65, 2021., v. 68, p. 29-65, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Raimundo-Braz-Filho/publication/349034026_Biological_activity_and_13C_NMR_spectral_data_of_skeleton_type_C20_quassinoids_1985-2019/links/60d29219299bf19b8d9d965a/Biological-activity-and-13C-NMR-spectral-data-of-skeleton-type-C20-quassinoids-1985-2019.pdf#page=48. Acesso 12 abr. 2024.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU. Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927121000241?via%3Dihub>. Acesso em: 20 mar. 2024.
- ALBUQUERQUE, B. R.; HELENO, S. A.; OLIVEIRA, M. B. P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Phenolic-compounds%3A-current-industrial-limitations-Albuquerque-Heleno/9dd27493179a90e244609f17c9cf8a630b25f7d>. Acesso em: 29 de mar. 2024.
- ALI, J.; BANGASH, J. A.; SIDDIQUE, M. Comparative bioactive compounds and fourier transform infrared spectroscopic evaluation of *Azadirachta indica* extracts and its potential as bio-fungicides against plant pathogenic fungi. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2023. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ijest/article/view/244918>. Acesso em: 21 abr. 2023.
- ALMEIDA, R.; ARAÚJO, A.; FREITAS, P.; FERREIRA, V.; LEITE, P.; TINTINO, S.; OLIVEIRA-TINTINO, C.; COUTINHO, H.; FILHO, J.; COSTA, R. Antibacterial and larvicidal activity of the extract of *Azadirachta indica*. Juss (Meliaceae). **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**. v. 1, p. 823-832, 2021. Disponível em: <https://interfaces.unileao.edu.br/index.php/revista-interfaces/article/view/780>. Acesso em: 10 mai. 2023.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; ENCINAR, J. A.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. C.; MICOL, V. Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 15, p. 2576-2606, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328157733_Antimicrobial_Capacity_of_Plant_Polyphenols_against_Gram-positive_Bacteria_A_Comprehensive_Review. Acesso em: 3 abr. 2023.

ALMUHAYAWI, M. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. 27, p. 3079-3086, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20304228>. Acesso em: 25 mai. 2023.

AMMARA, A.; SOBIA, A.; NUREEN, Z.; SOHAIL, A.; ABID, S.; AZIZ, T.; NAHAA, M.; REWAA, S., AHLLAH, M.; NOUF, S.; NEHAD, A.; MANAL, Y.; AMNAH, A.; MAJID, A.; ABDULHAKEM, S.; ANAS, S.; SAA, A. Revolutionizing the effect of *Azadirachta indica* extracts on edema induced changes in C-reactive protein and interleukin-6 in albino rats: in silico and in vivo approach. **European Review for medical & Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 13, p. 5951-5963, 2023. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/32947>. Acesso 20 mar. 2024.

ARSLAN, S.; OZBILGE, H.; KAYA, E.; E. R, O. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Saudi Medical Journal**, v. 32, n. 5, p. 479-483, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51111618_In_vitro_antimicrobial_activity_of_propolis_BioPure_MTAD_sodium_hypochlorite_and_chlorhexidine_on_Enterococcus_faecalis_and_Candida_albicans. Acesso 23 ago. 2023.

ARAÚJO, F. A. D. Processo de clarificação do caldo de cana pelo método dabicarbonatação. **Revista Ciências e Tecnologia**. Ano, v. 1, p. 1-5, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237595417_Processo_de_clarificacao_do_caldo_de_cana_pelo_metodo_da_bicarbonatacao. Acesso 28 mai. 2023. Acesso 23 ago. 2023

ARAÚJO, L. V. C.; RODRIGUEZ, Luiz C. E.; PAES, J. B. Características físico-químicas e energéticas da madeira de Nim indiano. **Physical, chemical and energetic characteristics of the neem wood**. n. 57, p. 153-159, jun. 2000. chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr57/cap11.pdf. Acesso 20 fev. 2024.

ARRUDA, C. J. M.; de ALMEIDA SIQUEIRA, V. F.; de SOUZA, F. J. M.; das NEVES SILVA, J. L.; FERREIRA, K.; FARO¹, A. Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. **Rev. Saúde em Foco**, p. 982-995, 2019. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/10/085_Revis%C3%A3o-bibliogr%C3%A1fica-de-antibi%C3%83ticos-beta-lact%C3%A1icos-982-a-995.pdf. Acesso em: 20 mar. 24.

BABY, A.; FREIRE, T.; MARQUES, G.; RIJO, P.; LIMA, F.; CARVALHO, J.; ROJAS, J.;

MAGALHÃES, W.; VELASCO, M.; MOROCHO-JÁCOME, A. *Azadirachta indica* (Neem) as a Potential Natural Active for Dermocosmetic and Topical Products: A Narrative Review. **Cosmetics**, v. 9, n. 3, pág. 58, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9284/9/3/58>. Acesso em: 22 mai. 2023.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/9173/3/0010W.pdf. Acesso em: 20 mai. 2023

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; CHATTERJEE, R.; BANDYOPADHYAY, D.; CHATTOPADHYAY, I.; GANGULY, C.; CHAKRABORTY, T.; BHATTACHARYA, K.; BANERJEE, R. Gastroprotective effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract: possible involvement of H(+)-K(+) -ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. **Life sciences**, v. 71, n. 24, pág. 2845-2865, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320502021434>. Acesso em: 25 mai. 2023.

BANSAL, R.; BANSAL, M.; WAZIR, N.; MATTÀ, M.; JAIN, S.; KAUR, J. Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes produtos fitoterápicos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* usando teste de difusão em ágar: um estudo in vitro. **Dental Journal of Advance Studies**, v. 8, p. 109-114, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/GbwnjhkpXQRMgLSCWFDdt6D/?lang=en>. Acesso em: 15 jun. 2023.

BARROS, I.; VEIGA, F.; JARROS, I.; CORRÊA, J.; SANTOS, R.; BRUSCHI, M.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. Promising effect of propolis and a by-product on planktonic cells and biofilm formation by the main agents of human fungal infections. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, n. 2, p. e20210189, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/GbwnjhkpXQRMgLSCWFDdt6D/?lang=en>. Acesso em: 28 mai. 2023

BARTMAŃSKA, A.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E.; TRONINA, T.; POPŁOŃSKI, J.; SORDON, S.; BRZEZOWSKA, E.; BANIA, J.; HUSZCZA, E. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. **Molecules a Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 2059, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/8/2059>. Acesso em: 25 abr. 2023.

BASSEY, E. E.; MOHAMMED, G. A.; BALA, H. M.; OGONNA, U. S.; YAWURI, B. B.; Maduchi, O. C. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of methanolic, ethanolic and acetonic extracts of stem bark and leaf of neem plant (*Azadirachta indica*). **Journal of Diseases and Medicinal Plants**, v. 2, p. 14-23. 2016. Disponível em: <https://www.sciencepublishinggroup.com/article/10.11648/j.jdmp.20160203.11>. Acesso 25 abr. 2023.

BRASIL, M. A. S. **Incrustações em evaporadores de usinas de açúcar: prognóstico de formação e prevenção**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Centro de

Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-24052022-120153/pt-br.php>. Acesso em: 25 abr. 2023.

BEHR, J.; VOGEL, R. Mechanisms of Hop Inhibition Include the Transmembrane Redox Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 142-149, 2009. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01693-09>. Acesso 20 abr. 2023.

BORDON, Alejo. Mapa e IICA desenvolvem projeto para fomentar cultivo de lúpulo no Brasil. Disponível em: <https://radiosul.net/wp/2020/mapa-e-iica-desenvolvem-projeto-para-fomentar-cultivo-de-lupulo-no-brasil/>. Acesso em: 05 de abril de 2023.

BRITO, B.; PENA, R.; LOPES, A.; CHISTÉ, R. Anthocyanins of Jambolão (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-Dependent Color Changes. **Journal of Food Science**, v. 82, n.10, p. 2286-2290, 2017. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.13847>. Acesso em: 28 mai. 2023.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, 2011. Disponível em:

[file:///D:/USUARIO/Downloads/admin,+3.+CAETANO,+A.C.G.%3B+MADALENO,+L.L.+Controle+de+contaminantes+bacterianos+na+fermenta%C3%A7%C3%A3o+alco%C3%B3li+ca+com+a+aplica%C3%A7%C3%A3o+de+biocid%20\(2\).pdf](file:///D:/USUARIO/Downloads/admin,+3.+CAETANO,+A.C.G.%3B+MADALENO,+L.L.+Controle+de+contaminantes+bacterianos+na+fermenta%C3%A7%C3%A3o+alco%C3%B3li+ca+com+a+aplica%C3%A7%C3%A3o+de+biocid%20(2).pdf) Acesso: 15 jun. 2023.

CAMPANHOL, B. S.; SILVEIRA, G. C.; CASTRO, M. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; BASTOS, R. G. Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric acid fromsugarcane bagasse and vinasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p.101147, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818118306698?via%3Dihub>. Acesso em: 25 mai. 2023

CARTAXO-FURTADO, N. A. D. E. O.; SAMPAIO, T. O.; XAVIER, M. A.; MEDEIROS, A. D. D. E.; PEREIRA, J. V. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (*Myrtaceae*) frente a microrganismos bucais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 1091-1096, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/bmRbjryLRj3zvQCb7dXRMmf/?lang=pt>. Acesso em: 20 jun. 2023.

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. 80, 2018. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003014415>. Acesso 20 jun. 2023.

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Acompanhamento da Safra Brasileira: 3º Levantamento da Safra 2023/24 Cana-de-Açúcar. Brasília, DF, 29 de novembro de 2023.

CORRÊA, A. A. D. A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, W. C.; PEREIRA, H. V.; DOS REIS, J. D.; SÁBER, M. L. Potencial antimicrobiano de metabólitos de *Syzygium cumini*

(jamelão). **Revista Eletrônica Acervo Saúde/Electronic Journal Collection Health ISSN**, v. 17, p. 2091-2098, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119349682?via%3Dihub>. Acesso 20 jun. 2023.

CORRÊA, J.; VEIGA, F.; JARROS, I.; COSTA, M.; CASTILHO, P.; OLIVEIRA, K.; ROSSETTO, H.; BRUSCHI, M.; SVIDZINSKI, T.; NEGRI, M. Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 256, p. 112791, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874119349682?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jun. 2023

COSME P.; RODRÍGUEZ A.B.; ESPINO J.; GARRIDO M. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Its Potential Health Promotion Applications. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1263, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/12/1263>. Acesso em: 15 nov. 2023.

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revodontol UNESP**, v. 38, n. 2, p. 111-116, 2009. Disponível em: <https://revodontolunesp.com.br/article/5880188a7f8c9d0a098b4cc1>. Acesso 20 agos. 2023.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**: Farmacognosia Experimental. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

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, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/320905080_Ethanol_addition_enhances_acid_treatment_to_eliminate_Lactobacillus_fermentum_from_the_fermentation_process_for_fuel_etherol_production. Acesso em: 8 ago. 2023.

COSTANTIN, C.; OLIVEIRA, H.; ROESE, L.; PANCERA, M.; SILVESTRE, W.; SIQUEIRA, G.; FERREIRA, N.; SARTORI, V. Evaluation of the antifungal activity of propolis extracts from stingless bees on phytopathogenic fungi. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, p. e445111638445-e445111638445, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/38445>. Acesso em: 10 fev. 2024.

COUTO, L. C.; SCÁRDUA, F. P.; CORDEIRO, S. A.; RODRIGUES, C. C. **Taninos vegetais ou polifenóis**. 1. ed. Diamantina: UFVJM, 2021. 73 p.

CRISTO, J.; MATIAS, E.; FIGUEREDO, F.; SANTOS, J.; PEREIRA, N.; JÚNIOR, J.; AQUINO, P.; NOGUEIRA, M.; RIBEIRO-FILHO, J.; CUNHA, F.; COSTA, M.; CAMPINA, F.; TINTINO, S.; SALGUEIRO, C.; COUTINHO, H. HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 903-908. 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016306690?via%3Dihub>. Acesso em: 20 fev. 2024.

CRUZ, Mariana Lopes. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. . Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24567>. Acesso em: 5 fev. 2024.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, jan. 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00239-019-09914-3>. Acesso em: 10 mar. 2024.

CZERKAS, K.; OLCHOWIK-GRABAREK, E.; ŁOMANOWSKA, M.; ABDULLADJANOVA, N.; SĘKOWSKI, S. Antibacterial Activity of Plant Polyphenols Belonging to the Tannins against *Streptococcus mutans*—Potential against Dental Caries. **Molecules**, v. 29, n.4, p. 879, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/4/879>. Acesso em: 3 nov. 2024.

DAWKAR, V.; BARAGE, S.; BARBOLE, R.; FATANGARE, A.; GRIMALT, S.; HALDAR, S.; HECKEL, D.; GUPTA, V.; THULASIRAM, H.; SVATOŠ, A.; GIRI, A. *Azadirachtin-A* from *Azadirachta indica* Impacts Multiple Biological Targets in Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*. **ACS Omega**. v. 5, pág. 9531-9541, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.8b03479>. Acesso 20 mar. 2024.

DE LA ROSA, E. O. LÓPEZ-ÁVILA, L. G.; LUNA-SOLANO, G.; CANTÚ-LOZANO, D. Bioethanol production process rheology. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 59-64, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016308147?via%3Dihub>. Acesso em: 15 fev. 2024.

DEGÁSPARI, C; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/540>. Acesso em: 4 fev. 2024.

DOUAFER, H.; ANDRIEU, V.; PHANSTIEL IV, O.; BRUNEL, J. M. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 8665-8681, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.8b01781>. Acesso em: 3 fev. 2024.

DUQUEYROIX, S. La propolis, l’antibiotique de la ruche. Disponível em: <https://magazine.laruchequiditou.fr/la-propolis-antibiotique-meconnu/> Acesso em: 05 de abril de 2024.

DURAND, G. A., RAOULT, D., DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.53, n.4, p. 371-382, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857918303352?via%3Dihub>.

Acesso em: 10 fev. 2024.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019. Disponível em: <https://quimicanova.sq.org.br/pdf/RV20190148.pdf>. 15 fev. 2024.

EGHBAL, N.; LIAO, W.; DUMAS, E.; AZABOU, S.; DANTIGNY, P.; GHARSALLAOUI, E. N.; LIAO, W.; DUMAS, E.; AZABOU, S.; DANTIGNY, P. Microencapsulation of natural food antimicrobials: Methods and applications. **Applied Sciences**, v. 12, n. 8, p. 3837, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/8/3837>. Acesso em: 5 marc. 2024.

FAHLE, A.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Antibacterial effects of biologically active ingredients in hop provide promising options to fight infections by pathogens including multi-drug resistant bacteria. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v. 12, n. 1, p. 22-30, 2022. Disponível em: <https://akjournals.com/view/journals/1886/12/1/article-p22.xml>. Acesso em: 24 fev. 2024.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 34352, 2012. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00222/abstract>. Acesso em: 20 fev. 2024.

FARHA, A. K.; YANG, Q.-Q.; KIM, G.; LI, H. B.; ZHU, F.; LIU, H. Y.; GAN, R. Y.; CORKE, H. Tannins as an alternative to antibiotics. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100751, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429220310890>. Acesso em: 3 nov. 2024.

FARHAT, N.; HUSSAIN, S.; SYED, S. K.; AMJAD, M.; JAVED, M.; IQBAL, M.; RIAZ, S. Dietary phenolic compounds in plants: Their antioxidant and pharmacological potential. **Postepy Biologii Komorki**, v. 47, n. 3, p. 307-320, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/355903365_DIETARY_PHENOLIC_COMPOUND_S_IN_PLANTS THEIR_ANTIOXIDANT_AND_PHARMACOLOGICAL_POTENTIAL. Acesso em: 10 mar. 2024.

FERNANDES, S.; BARREIROS, L.; OLIVEIRA, R.; CRUZ, A.; PRUDÊNCIO, C.; OLIVEIRA, A.; PINHO, C.; SANTOS, N.; MORGADO, J. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. **Fitoterapia**, v. 134, p. 141-150, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X18316721>. Acesso em: 11 fev. 2024.

FRANCINE, U.; JEANNETTE, U.; PIERRE, R. Assessment of antibacterial activity of Neem plant (*Azadirachta indica*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 3, n. 2, p. 85-91. 2015. Disponível em: https://www.plantsjournal.com/vol3Issue4/Issue_july_2015/html/1-5-17.1.html. Acesso em: 9 mar. 2024.

FRANCO, C. M.; VÁZQUEZ, B. I. Natural Compounds as Antimicrobial Agents.

Antibiotics, v. 9, n. 5, p. 217, 29 abr. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/217>. Acedido em: 10 mar. 2025.

GALEANE, M.; MARTINS, C.; MASSUCO, J.; BAUAB, T.; SACRAMENTO, L. Phytochemical screening of *Azadirachta indica* A. Juss for antimicrobial activity. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, p. 117-122. 2017. Disponível em: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/36B474862486>. Acesso em: 24 fev. 2024.

GAENSLY, F. **Incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces Cerevisiae* e sua influência na formação de biomassa e na capacidade fermentativa.** (2010). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 2010. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/24139>. Acesso em: 10 fev. 2024.

GONÇALVES, L. Introdução à tecnologia sucroalcooleira. **Book Publisher**, ISBN: 978-65-5942-076-6, 2021.

GUEDES, E. M.; DE MENDONÇA, C. M. S.; NUNES, L. E.; DE ARAÚJO, Í. D. R. Atividade antimicrobiana da planta *Azadirachta indica* (Nim indiano) – uma revisão integrativa. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 4, 2022. Disponível em: https://www.diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/2350. Acesso em: 28 jan. 2024.

GUPTA, P. D.; TANNAZ, J. B. Development of Botanicals to Combat Antibiotic Resistance. **Revista de Ayurveda e Medicina Integrativa**, v. 8, n. 4, p. 266-275, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S097594761630448X>. Acesso em: 29 jan. 2024.

HANDAGO, D. T.; ZEREFFA, E. A.; GONFA, B. A. Effects of *Azadirachta indica* leaf extract, capping agents, on the synthesis of pure and Cu doped ZnO-nanoparticles: a green approach and microbial activity. **Open Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 246-253, 2019. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/chem-2019-0018/html>. Acesso em: 20 fev. 2024.

HE, H. Recognition of Gallotannins and the Physiological Activities: From Chemical View. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 888892, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.888892/full>. Acesso em: 20 jan. 2024.

HIKAAMBO, C. N. A.; KAACHA, L.; MUDENDA, S.; NYAMBE, M. N.; CHABALENGE, B.; PHIRI, M.; KAMPAMBA, M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Azadirachta indica* leaf extracts against *Escherichia coli*. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 13, n. 1, p. 1-10. 2022. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/doi.aspx?doi=10.4236/pp.2022.131001>. Acesso em: 30 Jan. 2024.

HARITKAR, Y.; BATHINI, S.; OJHA, D.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, H.; KUOTSU, K.; CHATTOPADHYAY, D.; MONDAL, N. Antibacterial and antiviral evaluation of

sulfonoquinovosyldiacylglyceride: a glycolipid isolated from *Azadirachta indica* leaves. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 184-189, 2014. Disponível em: <https://colab.ws/articles/10.1111%2Fflam.12174>. Acesso em: 20 abri. 2023

ISLAS, J.; ACOSTA, E.; G-BUENTELLO, Z.; DELGADO-GALLEGOS, J.; MORENO-TREVIÑO, M.; ESCALANTE, B.; MORENO-CUEVAS, J. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. **Journal of Functional Foods**, v. 74, p. 104171, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464620303959?via%3Dihub>. Acesso em: 3 mar. 2024.

JGI – Genome Portal. ***Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293**. Disponível em: <https://genome.jgi.doe.gov/portal/leume/leume.home.html>. Acesso em: 26 de junho de 2024.

JEBA MALAR, T.; ANTONYSWAMY, J.; VIJAYARAGHAVAN, P.; OCK KIM, Y.; AL-GHAMDI, A. A.; ELSIKH, M. S.; HATAMLEH, A. A.; AL-DOSARY, M. A.; NA, S. W.; KIM, H. In-vitro phytochemical and pharmacological bio-efficacy studies on *Azadirachta indica* A. Juss and *Melia azedarach* Linn for anticancer activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 682-688. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X1930258X>. Acesso em: 24 fev. 2024.

JESUS PEREIRA, T.; DE ANDRADE, L. G.; DE ABREU, T. P. O farmacêutico frente ao risco do uso irracional de antibióticos. **Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação**, v. 7, n. 9, p. 483-501, 2021. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/2231>. Acesso em: 20 jan. 2024.

JÚNIOR, D.; CORDEIRO, P.; SILVEIRA, Z.; MACÊDO, N.; BOLIGON, A.; SANTOS, J.; COSTA, J.; CUNHA, F. Phytochemical profile of leaves extract of *Azadirachta indica* A. Juss and toxicity against *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of MOL2NET 2018, International Conference on Multidisciplinary Sciences, 4th edition**. v. 2, n. 14, p. 1-6, 2018. Disponível em: <http://sciforum.net/conference/mol2net-04/paper/5557>. Acesso em: 29 jan. 2024.

KALÁSZ, H.; BATHORI, M.; VALKÓ, K. L. Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. In: **Manual de Separações Analíticas**. Elsevier Science BV, p. 523-585, 2020. Disponível em: <https://scispace.com/papers/basis-and-pharmaceutical-applications-of-thin-layer-28pzapzxah>. Acesso em: 29 jan. 2024.

KANERIA, M.; CHANDA, S. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *Syzygium cumini* L. leaves extracted sequentially in different solvents. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 168-176, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4514.2011.00614.x>. Acesso em: 30 mar. 2024.

KANG, C. H.; HAN, S. H.; KIM, J. S.; KIM, Y.; JEONG, Y.; PARK, H. M.; PAEK, N. S. Inhibition of nitric oxide production, oxidative stress prevention, and probiotic activity of lactic acid bacteria isolated from the human vagina and fermented food. **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 109, 2019. Disponível em:

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20193508035>. Acesso em: 25 jan. 2024.

KARNWAL, A.; MALIK, T. Exploring the untapped potential of naturally occurring antimicrobial compounds: novel advancements in food preservation for enhanced safety and sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 8, p. 1307210, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2024.1307210/full>. Acesso em: 10 mar. 2024.

KAUFFMANN, A. C.; CASTRO, V. S. Phenolic Compounds in Bacterial Inactivation: A Perspective from Brazil. **Antibiotics**, v. 12, n.4, p. 645, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/4/645>. Acesso em: 3 nov. 2024.

KETA, J. N.; SHEHU, K.; YAHAYYA, U.; GUDUG., B. Effect of neem (*Azadirachta indica* a. Juss) leaf extract on the growth of Aspergillus species isolated from foliar diseases of rice(*Oryzea sativa*). **Science World Journal**, v. 14, n. 1, p. 98-102, 2019. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/swj/article/view/208446>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KHAN, M.; YAQOOB, S.; AHMAD, S. Antimicrobial Activity of *Azadirachta indica*, against Target Pathogens and Its Utility as a Disinfectant and Floor Cleaner. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**. v. 10, n. 25, p. 1899-1903, 2021. Disponível em: https://www.jemds.com/data_pdf/Shadma%20Yaqoob---jemds----issue%2025--june%2021%20-.pdf. Acesso em: 20 jan. 2024.

KHAN, S.; IMRAN, M.; IMRAN, M.; PINDARI, N. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multidrug resistant *Candida* spp. **Bioinformation**, v. 13, n. 3, p. 67-72, 2017. Disponível em: <http://www.bioinformation.net/013/97320630013067.htm>. Acesso em: 30 mar. 2024.

KHANAL, S. Qualitative and quantitative phytochemical screening of *Azadirachta indica* Juss. Plant Parts. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v.9, n.2, 122-127, 2021. Disponível em: <https://www.nepjol.info/index.php/IJASBT/article/view/38050>. Acesso em: 10 jan. 2024.

KHARWAR, R.; SHARMA, V.; MISHRA, A.; KUMAR, J.; SINGH, D.; VERMA, S.; GOND, S.; KUMAR, A.; KAUSHIK, N.; REVURU, B.; KUSARI, S. Harnessing the Phytotherapeutic Treasure Troves of the Ancient Medicinal Plant *Azadirachta indica* (Neem) and Associated Endophytic Microorganisms. **Planta Medica**, v. 86, n.013/14, p. 906-940, 2020. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1107-9370>. Acesso em: 4 fev. 2024.

KIM, J.; MAHONEY, N.; CHAN, K.; MOLYNEUX, R.; CAMPBELL, B. Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 735-739, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0123-6>. Acesso em: 22 fev. 2024.

KRONKA, A. M. **Estudo de antimicrobianos naturais sobre bactérias Gram-positivas**

(*Lactobacillus*) usados para controle e descontaminação da fermentação alcoólica. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara -SP, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/204348> Acesso em 20 fev. 2024.

KUMARI, P.; ARORA, N.; CHATTRATH, A.; GANGWAR, R.; PRUTHI, V.; POLURI, K. M.; PRASAD, R. Delineating the Biofilm Inhibition Mechanisms of Phenolic and Aldehydic Terpenes against *Cryptococcus neoformans*. **ACS Omega**, v. 4, n. 18, p. 17634–17648, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.9b01482>. Acesso em: 3 nov. 2024.

LIMA, T. M. L.; TREVISAN, M. Processos fermentativos direcionados à produção de antibióticos: uma alternativa à resistência de bactérias. **Publicações em Saúde**, v. 6, p. 159, 2021. Disponível em: <https://pubsaude.com.br/revista/processos-fermentativos-direcionados-a-producao-de-antibioticos-uma-alternativa-a-resistencia-de-bacterias/>. Acesso em: 20 fev. 2020.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, p. 670-673, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400025&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt. Acesso em: 15 fev.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 447-454, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/x4sTg6wQWMW6zNLKfdp5hDb/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MACHADO, N. F. L.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R. Abordando Fatos e Lacunas na Química Fenólica de Subprodutos Vinícolas. **Moléculas**, v. 22, n. 2, p. 286, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/286>. Acesso em: 10 fev. 2024.

MACRI, R. C. V. **Extratos de moringa no tratamento do caldo de cana e reflexos sobre a fermentação alcoólica.** 2014. Dissertação (mestrado Agronomia (Produção Vegetal))- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jabotical, São Paulo, 2014.

MAIA, D. R. **Extrato a base de taninos da casca da *Azadirachta indica* A. Juss. e seu potencialantioxidante e antibacteriano.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Curso de graduação em Engenharia Florestal. 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/38286>. Acesso em: 01 jun. 2023.

MAITHANI, A.; PARCHA, V.; PANT, G.; DHULIA, I.; KUMAR, D. *Azadirachta indica* (neem) leaf: A review. **J Pharm Res**, v. 4, n. 6, p. 1824-1827, 2011. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcgclefindmkaj/https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=ep1&type=pdf&doi=1b6a265f18b280d84da301ac531d83af5771e178>. Acesso em: 15 fev. 2024.

MANCA, M. L.; MANCONI, M.; MELONI, M.; MARONGIU, F.; ALLAW, M.; USACH, I.; PERIS, J.; ESCRIBANO-FERRER, E.; TUBEROZO, C. I. G.; GUTIÉRREZ, G.; MATOS, M.; GHAVAM, M. Nanotechnology for Natural Medicine: Formulation of Neem Oil Loaded Phospholipid Vesicles Modified with Argan Oil as a Strategy to Protect the Skin from Oxidative Stress and Promote Wound Healing. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 670, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/670>. Acesso em: 15 mar. 2023.

MARTINEZ, S. S. **O NIM: *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção.** produção. 2. ed. Londrina, PR: Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, p. 205, 2011. SBN 85-88184-05-2.

MATHEW, B.; AMOS, Y.; ABIMBOLA, O. A.; ANEKOSON, J. I.; ALVAN, A. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Stem Bark Extract of *Azadirachta indica* A. (Juss) Against Antibiotic Resistant *Salmonella enterica* Serovar *Typhi*. **American Journal of Laboratory Medicine**, v. 2, n. 6, p. 163-171, 2017. Disponível em: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=235&doi=10.11648/j.ajlm.20170206.18>. Acesso em: 18 fev. 2024.

MATOS, J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 3.ed. Fortaleza: Edições UFC, cap. 4, 2009.

MEHTA, N.; CHANDRA, A.; THAKUR, A. Neem and its derivatives-a tropical trove. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 10, n. 02, p. 3228-3235, 2021. Disponível em: <https://www.ijcmas.com/abstractview.php?ID=21629&vol=10-2-2021&SNo=354>. Acesso em: 24 fev. 2024.

MESSETTI, M. A.; DOS SANTOS, A. M.; DE ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Study of a *Ricinus communis* L. (castor oil) derivative as a biocidal agent and viscosity reducer on *Leuconostoc mesenteroides* in the sugar and alcohol industries. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 301-308, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/LLFJkyYxJ5PdLwPK4VcP8zc/> Acesso: 3 mar. 2024.

MERLANI, M.; NADARAIA, N.; AMIRANASHVILI, L.; PETROU, A.; GERONIKAKI, A.; CIRIC, A.; GLAMOCLIIJA, J.; CARÉVIC, T.; SOKOVIC, M. Antimicrobial Activity of Some Steroidal Hydrazones. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1167, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1167>. Acesso em: 20 nov. 2024.

MIGLIATO, K.F.; BEBÊ, A.R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M.V.R.; CORREA, M.A.; SACRAMENTO, L.V.S.; SALGADO, H.R.N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/68832>. Acesso em: 27 jan. 2024.

MILENE ANGELO, P.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods: A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073280304>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MORA-OCHOMOGO, M.; LOHANS, C. T. β -Lactam antibiotic targets and resistance mechanisms: from covalent inhibitors to substrates. **RSC Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10,

p. 1623-1639, 2021. Disponível em: <https://xlink.rsc.org/?DOI=D1MD00200G>. Acesso em: 20 fev. 2024.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm.** Bonaerense, v. 24, n.1, p.139-148, 2005. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6725>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MUHAMMAD, A.; KASHERE, M. A. Neem, *Azadirachta indica* L. (A. Juss): an eco-friendly botanical insecticide for managing farmers' insect's pest problems- a review. **FUDMA Journal of Sciences.** v. 4, n. 4, p. 484-491, 2020. Disponível em: <https://fjs.fudutsinma.edu.ng/index.php/fjs/article/view/506>. Acesso em: 15 mar. 2024.

MULYANI, Y.; SINAGA, S.; SUPRATMAN, U. Phytochemistry and biological activities of endophytic fungi from the meliaceae family. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 778, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/778>. Acesso em: 15 de mai. 2024.

MURPHREE, C. A.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. **Current Microbiology**, v. 69, p. 277-285, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0583-y>. Acesso em: 24 jan. 2025.

NAGANO, M.; BATALINI, C. Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 50, n. 1, p. 29-47, 2021. Disponível em: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/95447>. Acesso em: 22 mar. 2024.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 331-339, 2003. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf020847> Acesso em: 7 fev. 2024.

NANIWADEKAR, M.; JADHAV, A. Process development of pesticide production from *Azadirachta indica* A. Juss. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 1, p. 65-70, 2012. Disponível em: <https://ijair.org/index.php/issues?view=publication&task=show&id=16>. Acesso em: 23 jan. 2024.

NASCIMENTO, I. J. R. do.; JESUS, H. S. de.; ALVIM, H. G. de O. Uso dos taninos provenientes do barbatimão para cicatrização de ferimentos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, Brasil, São Paulo, v. 4, n. 8, p. 201–212, 2021. Disponível em: <https://revistajrg.com/index.php/jrg/article/view/228>. Acesso em: 30 maio. 2024.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Neem**: a tree for solving global problems. Washington, DC: The National Academies Press, 1992. Disponível em: <https://nap.nationalacademies.org/catalog/1924/neem-a-tree-for-solving-global-problems>. Acesso em: 27 jan. 2024.

NAVES, R.; FERNANDES, F.; PINTO, O.; NAVES, P. Contaminação microbiana nas etapas

de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2010. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.conhecer.org.br/enciclop/2010c/contaminacao%20microbiana.pdf. Acesso em: 20 mai. 2024

NEVES, B. P.; DE OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. Cultivo e utilização do Nim indiano. **Embrapa Arroz e Feijão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Goiânia (GO), p. 12, 2003. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/212487>. Acesso: 5 fev. 2024.

NIGUSSIE, D.; DAVEY, G.; LEGESSE, B. A.; FEKADU, A.; MAKONNEN, E. Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-020-03183-0>. Acesso em: 13 ja. 2024.

NINKUU, V.; ZHANG, L.; YAN, J.; FU, Z.; YANG, T.; ZENG, H. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5710, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5710>. Acesso em: 15 mai. 202

NIONELLI, L.; PONTONIO, E.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 173-182, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816051730524X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jan. 2024.

NGUYEN, T. L. A.; BHATTACHARYA, D. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2494, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/8/2494>. Acesso em: 3 nov. 2024.

OKOH, S. O.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Inhibitory effects of *Azadirachta indica* secondary metabolites formulated cosmetics on some infectious pathogens and oxidative stress radicals. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-13. 2019. Disponível em: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-019-2538-0>. Acesso em: 20 mar. 2024.

OLIVEIRA FILHO, J. H. **Atividade antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada à produção de cachaça**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia - Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Jaboticabal, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94923> Acesso: 20 out. 2023.

OLIVEIRA, G.; ARAÇARI, N.; CARDOSO, J.; SILVA, A.; HENRIQUE, C.; MARTINS, G.; BASTOS, J.; CUNHA, W.; ANDRADE, M. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 381-384, 2007.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000200035&lng=en&nrm=iso&tlang=en. Acesso em: 20 fev. 2025.

OYELESE, O.; OLAWORE, N.; OLOLADE, Z. Comparative Study of the Phytochemical and Bio-activities of the Essential Oils from Ripe and Unripe Seeds of *Azadirachta indica*. **The Journal of Medical Research**, v. 6, p. 219-224. 2020. Disponível em: http://www.medicinearticle.com/JMR_20205_10.pdf. Acesso em: 25 fev. 2024.

OZEKER, E. Phenolic compounds and their importance. **Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute**, v. 9, p. 114-124, 1999. Disponível em: <https://dergipark.org.tr/en/pub/anadolu/issue/1783/21944>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A. S.; HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p.1, 2020. Disponível em: <https://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2020001>. Acesso em: 20 fev. 2024.

PASSOS, M.; NOGUEIRA, T.; AZEVEDO, O.; VIEIRA, M.; TERRA, W.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. Limonoids from the genus Trichilia and biological activities: review. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, p. 1055 - 1086, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11101-020-09737-x>. Acesso em: 22 jan. 2024.

PATEL, S.; VENKATA, K.; BHATTACHARYYA, P.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. **Seminars in cancer biology**, v. 40-41, p. 100-115, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X16300062>. Acesso em: 17 fev. 2024.

PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A. F. A. A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbios. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1058-1078, 2016. Disponível em: <http://www.periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/3157>. Acesso em: 25 mar. 2025.

PINGALI, U.; ALI, M. A.; GUNDAGANI, S.; NUTALAPATI, C. Evaluation of the effect of an aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves and twigs on glycemic control, endothelial dysfunction and systemic inflammation in subjects with type 2 diabetes mellitus—a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 13, p. 4401-4412, 2020. Disponível em: <https://www.dovepress.com/evaluation-of-the-effect-of-an-aqueous-extract-of-azadirachta-indica-n-peer-reviewed-fulltext-article-DMSO>. Acesso em: 5 mar. 2024.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. **Trends in food science and technology**, v. 83, p. 53-62, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418303807>. Acesso em: 20 mar. 2024.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial properties of propolis. **Molecules**, v. 24,

n. 11, p. 2047, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/11/2047>. Acesso em: 21 jan. 2024.

PRASAD, K.; SASI, S.; LEVCHENKO, I.; BAZAKA, K. Atividade antimicrobiana aprimorada por meio de efeitos sinérgicos de plasma atmosférico frio e metabólitos secundários de plantas: oportunidades e desafios. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7481., 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/22/7481>. Acesso em: 10 mar. 2024.

PUTAROV, N. B.; GALENDE, S. B. Estudo da relação estrutura química e atividade farmacológica dos antibióticos. **Revista Uningá**, v. 30, n. 1, 2011. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uninga/article/view/988>. Acesso em: 20 abr. 2024.

RANA, A.; KUMARI, A.; CHAUDHARY, A. K.; SRIVASTAVA, R.; KAMIL, D.; VASHISHTHA, P.; SHARMA, S. N. An Investigation of Antimicrobial Activity for Plant Pathogens by Green-Synthesized Silver Nanoparticles Using *Azadirachta indica* and *Mangifera indica*. **Physchem**, v. 3, n. 1, p. 125-146, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-7167/3/1/10>. Acesso em: 5 mar. 2024.

RAJA RATNA REDDY, Y.; KRISHNA KUMARI, C.; LOKANATHA, O.; MAMATHA, S.; DAMODAR REDDY, C. Antimicrobial activity of *Azadirachta Indica* (Neem) leaf, bark and seed extracts, **International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/278667499_Antimicrobial_activity_of_Azadirachta_Indica_neem_leaf_bark_and_seed_extracts. Acesso em: 20 mai. 2023.

RAO, P.; SUBRAMANAYAM, G.; SRIDHAR, P. Quercetin 3-galactoside from *Azadirachta indica*. **Journal of Advances in Molecular Biology**. v. 3, n. 1, p. 1-8, 2019. Disponível em: <https://colab.ws/articles/10.22606%2Fjamb.2019.31001>. Acesso em: 15 de abr. 2024

RODRIGUES, P.; DE OLIVEIRA, R. R.; SOARES, Á. D. C. R.; AGUIAR, M. I. B. Mecanismos de ação dos antibióticos. **Revista Multidisciplinar do NordesteMineiro**, v. 3, n. 3, 2024. Disponível em: <https://revista.unipacto.com.br/index.php/multidisciplinar/article/view/2186>. Acesso em: 27 abr. 2024.

ROH, J.; KIM, K. Antimicrobial Activity of Korean Propolis Extracts on Oral Pathogenic Microorganisms. **Journal of dental hygiene science**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2018. Disponível em: <https://www.jkdhs.org/journal/view.html?doi=10.17135/jdhs.2018.18.1.18>. 28 fev. 2023.

SA-EED, A.; DONKOR, E.; ARHIN, R.; TETTEH-QUARCOO, P.; ATTAH, S.; SAHA, R. K.; ZAMAN, N. M.; ROY, P. Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seeds, fruit pulps and fresh juice of *Syzygium cumini* in vitro. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 1, n. 4, p. 300-308, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/259774985_Comparative_evaluation_of_the_medicinal_activities_of_methanolic_extract_of_seeds_fruit_pulps_and_fresh_juice_of_Syzygium_cumini_in_vitro. Acesso em 20 fev. 2024.

SANTANA, R. C. **Antibióticos beta-lactâmicos.** Curso Básico de Antimicrobianos Divisão de MI–CM–FMRP–USP, 2017.

SANTOS, M. L. **Jamelão: Exótico e com poderosos nutrientes**, 2017 Disponível em: <https://dietaenutricao.com.br/jamelao-exotico-e-com-poderosos-nutrientes/>. Acesso em: 01 de abril de 2024.

SANTOS, E. J.; ANTÔNIO, F. J. C. G.; RAMOS, V. H. S. Otimização da produção caldo clarificado em uma usina de produção de etanol. **Scientia Plena**, v. 9, n. 3, 2013. Disponível em: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/1124>. Acesso 29 nov. 2024.

SHAH, A.; GUNJAL, M.; JUVEKAR, A. Immunomostimulatory activity of aqueous extract of *Azadirachta indica* flowers on specific and non specific immune response. **Journal of Natural Remedies**, v. 9, n. 1, p. 35-42, 2009. Disponível em: <https://www.informaticsjournals.co.in/index.php/jnr/article/view/218>. Acesso em: 25 nov. 2023.

SHAH, M.; EREDDIA, D.; SHAH, J.; REESE, N. The Effect of Neem on Common Nosocomial Infection-Causing Organisms. **Journal of Emerging Investigators**, v. 3, p. 1-6, 2020. Disponível em: <https://emerginginvestigators.org/articles/18-004>. Acesso 25 nov. 2024.

SHARMA, Y. A study of antibacterial, antioxidant and neuroprotective effect of stem of *Syzygium cumini*. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 11, 2018. Disponível em: <https://www.greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/view/1289>. Acesso em: 22 abr. 2024.

SHARMA, Y.; KAUR, A.; MISHRA, R.; KULKARNI, S.; BHARADWAJ, M.; BALA, K. Antiproliferative efficacy of the antioxidant bioactive compounds of defatted seeds of *Azadirachta indica* and *Momordica charantia* against the regulatory function of tumor suppressor gene inducing oral carcinoma. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, p. 5246 - 5260, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.2022.2083015>. Acesso 22 abr. 2024.

SIDAT, P.; MODH, S.; CHAVDA, N.; CHAUHAN, V.; KANKURA, G.; DINDOLIWALA, A Panacea of all Diseases. **Journal of Pharmaceutical Research** v. 22, n. 1, pág. 1-7, 2023. Disponível em: <https://jopcr.com/articles/neem-azadirachta-indica-a-panacea-of-all-diseases>. Acesso 5 mar. 2024.

SILIN, A. V.; SATYGO, E. A.; REUTSKAYA, K. V. Effectiveness of Paradontax toothpaste in patients undergoing orthodontic treatment. **Stomatologija**, v. 96, n. 4, p. 20-22, 2017. Disponível em: <https://www.mediasphera.ru/issues/stomatologiya/2017/4/downloads/ru/1003917352017041020>. Acesso em: 8 de fev. 2024.

SILVA, A. I.; SÁ-FILHO, G.; OLIVEIRA, L.; GUZEN, F.; CAVALCANTI, J.; CAVALCANTE, J. Perfil Fitoquímico de Extratos Etanólicos e Metanólicos do *Croton blanchetianus*. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n. 1, p. 134-142, 2021. Disponível em: <https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/1057>. Acesso em: 5 mar.

2024.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.; SINGARAVELU, S.; SANKARAPILLAI, J.; CHANDRAKUMARI, A. S.; SINHA, P. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016.

SINGARAVELU, S.; SANKARAPILLAI, J.; CHANDRAKUMARI, A. S.; SINHA, P. Efeito das concentrações de extratos brutos da casca de *Azadirachta indica* contra patógenos bacterianos gram-positivos e gram-negativos. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 11, n. 1, pág. 33, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6394162/>. Acesso em: 3 de fev. 2024.

SINHA, D. J.; NANDHA, K. D.; JAISWAL, N.; VASUDEVA, A.; TYAGI, S. P.; SINGH, U. P. Antibacterial effect of *Azadirachta indica* (Neem) or *Curcuma longa* (Turmeric) against *Enterococcus faecalis* compared with that of 5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine in vitro. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 58, n. 2, p. 103-109, 2017. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/tdcpublication/58/2/58_2015-0029/_article. Acesso em: 9 fev. 2024.

SOARES, N.; SANTOS, P.; VIEIRA, V.; PIMENTA, V.; ARAÚJO, E. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 24, 2016. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.conhecer.org.br/enciclop/2016b/agrarias/Tecnica%20de%20prospeccao.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2023.

SOUSA, J. P. L. M.; PIRES, L. D. O.; PRUDÊNCIO, E. R.; SANTOS, R. F.; SANT'ANA, L. D.; FERREIRA, D. A. S.; CASTRO, R. N. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019. Disponível em: <https://rvq-sub.sbz.org.br/index.php/rvq/article/view/3493>. Acesso em: 3 fev. 2024.

SOUZA MENEZES, R. M.; LIMA, J. R.; SANTOS, D. D.; SANTOS. Extração, caracterização, prospecção por CG-EM efeito bactericida do óleo essencial de NIM (*Azadirachta indica*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e5071, 2021. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/356791812_Extração_caracterização_prospecção_por\(CG-EM\)_e_efecto_bactericida_do óleo_essencial_de_NIM_Azadiracht_indica](https://www.researchgate.net/publication/356791812_Extração_caracterização_prospecção_por(CG-EM)_e_efecto_bactericida_do óleo_essencial_de_NIM_Azadiracht_indica)

STEFANELLO, R. F.; FRIES, L. L. M.; COPETTI, M. V. Natural conservation attached to the use of microorganisms. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 39, n. 1, p. 42-48, 2018. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/32397>. Acesso em: 3 de fev. 2024.

SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M. H. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. **Molecules**, v. 28, p. 1845, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/4/1845>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SUBHANI, M. A.; WAHAB, N.; IBRAHIM, M.; UR, H.; REHMAN, M. A.; ULLAH, W;

NAWAZ, M. Synthesis of silver nanoparticles from plant extracts and their antimicrobial application. **International Journal of Biosciences**, v. 14, n. 3, p. 243-257, 2019. Disponível em: file:///D:/USUARIO/Downloads/Synthesis_of_Silver_nanoparticles_from_p.pdf. Acesso em: 20 fav. 2024.

TATUM, C. T. S.; GALHARDO, C. X.; TATUM, L. M. M.; BORGES, M. C. R. Z.; RUSSO, S. L. Potentials and applications of Jamelão, *Syzygium cumini*, **International Symposium on Technological Innovation** Vol. 9, n.1, p.671-678, 2018. Disponível em: <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/13764>. Acesso 5 mar. 2024.

TAVARES, I.; LAGO-VANZELA, E.; REBELLO, L.; RAMOS, A.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; DA-SILVA, R.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, v. 82, p. 1-13, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996916300187?via%3Dihub>. Acesso em: 10 fev. 2024.

TORRES-GUARDADO, R.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; REGUANT, C.; BORDONS, A. Microbial interactions in alcoholic beverages. **International Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 1-15, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10123-021-00200-1>. Acesso em: 6 mar. 2024.

TROJAK, M.; SKOWRON, E. Role of anthocyanins in high-light stress response. **World Scientific News**, v. 81, n. 2, p. 150-168, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318723437_Role_of_anthocyanins_in_high-light_stress_response. Acesso em: 12 fev. 2024.

UJAH, I.; NSUDE, C.; ANI, O.; ALOZIEUWA, U.; OKPAKO, I.; OKWOR, A. Phytochemicals of neem plant (*Azadirachta indica*) explains its use in traditional medicine and pest control. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**. v. 14, n. 2, p. 165-171, 2021. Disponível em: <https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/content/phytochemicals-neem-plant-azadirachta-indica-explains-its-use-traditional-medicine-and-pest>. Acesso 15 fev. 2024.

UZZAMAN, S. Pharmacological Activities of Neem (*Azadirachta indica*): A Review. **International Journal of Pharmacognosy and Life Science**, v. 1, p. 38-41, 2020. Disponível em: <https://www.pharmacognosyjournal.com/archives/2020.v1.i1.A.8> Acesso: 20 mai. 2025.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2011. Disponivel em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-02082011-093349/> Acesso: 20 Ago. 2023

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gQqYVTzykDtcSVtKvYDxWTP/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2024.

VIERA, T. I.; GONDIM, B. L. C.; SANTIAGO, B. M.; VALENÇA, A. M. G. In vitro antibacterial and non-stick activity of extracts from leaves of *Psidium guineense* Sw. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels on oral microorganisms. **Rev Gaúcha Odontol**, v. 60, n. 3, p. 359-365, 2012. Disponível em: http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-86372012000300012. Acesso em: 20 fev. 2024.

VIZZOTO, M.; FETTER, M. R. Jambolão: o poderoso antioxidante. **EMBRAPA ClimaTemperado. Pelotas**: 2009. Artigo de divulgação na mídia. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/747032/1/jambolaoMarcia.pdf>. Acesso em: 8 de março de 2024.

WEBER, N.; BIEHLER, K.; SCHWABE, K.; HAARHAUS, B.; QUIRIN, K.; FRANK, U.; SCHEMPP, C.; WÖLFLE, U. Hop Extract Acts as an Antioxidant with Antimicrobial Effects against *Propionibacterium Acnes* and *Staphylococcus Aureus*. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 223, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/2/223>. Acesso em: 22 fev. 2024.

WENDAKOON, C.; CALDERON, P.; GAGNON, D. Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 1, n. 2, p. 60-68, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/268406752_Evaluation_of_Selected_Medicinal_Plants_Extracted_in_Different_Ethanol_Concentrations_for_Antibacterial_Activity_against_Human_Pathogens. Acesso em: 20 fev. 2024.

YADAV, A.; SARASWAT, S.; SIROHI, P.; RANI, M.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M.; SINGH, N. Antimicrobial action of methanolic seed extracts of *Syzygium cumini* linn. on *Bacillus subtilis*. **AMB Express**, v. 7, 2017. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0500-4>. Acesso em: 22 fev. 2024.

YAN, Y. F.; WU, T. L.; DU, S. S.; WU, Z. R.; HU, Y. M.; ZHANG, Z. J.; ZHAO, W. B.; YANG, C. J.; LIU, Y. Q. O mecanismo antifúngico do isoxantohumol de *Humulus lupulus Linn*. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 22, n. 19, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10853>. Acesso em: 2 fev. 2024

YANG, L.; WEN, K.; RUAN, X.; ZHAO, Y.; WEI, F.; WANG, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/4/762>. Acesso em: 20 mar. 2024.

ZHANG, L.; YAN, Y.; ZHU, J.; XIA, X.; YUAN, G.; LI, S.; DENG, B.; LUO, X. Quinone Pool, a Key Target of Plant Flavonoids Inhibiting Gram-Positive Bacteria. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 4972, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/13/4972>. Acesso em: 3 mar. 2024.

CAPÍTULO 3 – EXTRATOS DE *Azadirachta indica* CONTROLAM BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Resumo

Considerando que o processo de fermentação alcoólica para produção de etanol pode ser comprometido por bactérias contaminantes gram-positivas; bem como as indústrias utilizam antibióticos sintéticos para controle desses microrganismos, buscam-se biocidas naturais para serem utilizados nesse processo. Neste sentido, o Neem (*Azadirachta indica*), conhecido por suas propriedades biológicas, surge como solução para controle dessas contaminações. Este estudo visou avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de folhas, cascas e sementes de Neem, correlacionando-a à presença de metabólitos secundários, determinando, assim, o potencial biocida. Os extratos foram analisados fitoquimicamente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR), além da quantificação de fenólicos totais, flavonoides totais e taninos totais. Paralelamente, determinou-se a atividade antioxidante. A atividade antimicrobiana foi avaliada por testes de difusão em disco e determinação da Concentração Inibitória Mínima, utilizando *L. fermentum* e *L. mesenteroides* como modelos bacterianos. Os testes mostraram que extratos de folhas e cascas de Neem inibiram o crescimento das bactérias sem afetar a levedura *S. cerevisiae*, com eficácia a 50 mg/mL e 30 mg/mL, respectivamente. A análise fitoquímica revelou predominância de flavonoides nas folhas e maior concentração de taninos nas cascas, ambos reconhecidos por propriedades antimicrobianas. Os extratos também apresentaram altos teores de compostos fenólicos, reforçando sua eficácia bacteriana, enquanto a atividade antioxidante das cascas sugere um papel complementar na proteção do extrato. O extrato de sementes não demonstrou atividade antimicrobiana. Conclui-se que os extratos de folhas e cascas de Neem possuem potencial biocida para serem utilizados na fermentação alcoólica.

Palavras chaves: Contaminantes; Fermentação alcoólica; Metabólitos secundários; Neem.

Extracts of *Azadirachta indica* control Contaminant Bacteria in Fermentation Processes

Abstract

Considering that the alcoholic fermentation process for ethanol production can be compromised by gram-positive contaminant bacteria, and industries often use synthetic antibiotics to control these microorganisms, there is a search for natural biocides to be utilized in this process. In this context, Neem (*Azadirachta indica*), known for its biological properties, emerges as a solution for controlling these contaminations. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of extracts from Neem leaves, bark, and seeds, correlating this activity with the presence of secondary metabolites, thus determining the biocidal potential. The extracts were phytochemically analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) and Infrared Spectroscopy (FTIR), in addition to quantifying total phenolics, total flavonoids, and total tannins. Concurrently, antioxidant activity was determined. Antimicrobial activity was evaluated using disk diffusion tests and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), utilizing *L. fermentum* and *L. mesenteroides* as bacterial models. The tests showed that Neem leaf and bark extracts inhibited bacterial growth without affecting the yeast *S. cerevisiae*, with efficacy at 50 mg/mL and 30 mg/mL, respectively. Phytochemical analysis revealed a predominance of flavonoids in the leaves and higher tannin concentrations in the bark, both recognized for their antimicrobial properties. The extracts also showed high levels of phenolic compounds, reinforcing their bacterial efficacy, while the antioxidant activity of the bark suggests a complementary role in the protection of the extract. The seed extract did not demonstrate antimicrobial activity. It is concluded that Neem leaf and bark extracts have biocidal potential for use in alcoholic fermentation.

Key-words: Contaminants; Alcoholic fermentation; Secondary metabolites; Neem.

3.1. Introdução

A fermentação etanólica é um processo biotecnológico amplamente utilizado em muitos países para a produção de bioproductos de elevado valor agregado, como etanol combustível e bebidas alcoólicas fermentadas e/ou destiladas. Este processo, que se baseia na conversão de açúcares presentes na matéria-prima em etanol pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é considerado essencial para indústrias que buscam sustentabilidade energética e diversificação de produtos biotecnológicos (Oliveira, 2020).

Entre as matérias-primas mais empregadas na fermentação etanólica, destaca-se o caldo de cana-de-açúcar, amplamente utilizado por indústrias biotecnológicas em países da América Latina, África, Ásia e Oceania. No entanto, as indústrias que utilizam essa matéria-prima, geralmente, realizam processos fermentativos em batelada alimentada com reciclo de células de levedura, o que resulta em altos índices de contaminações por bactérias gram-positivas, como a *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Essas chegam ao processo junto com a cana, competem com a levedura por açúcares, e resultam na produção de ácido lático e gomas, que comprometem a viabilidade da levedura, resultando em floculação do fermento e queda na velocidade da fermentação (Brexó; Sant'Ana, 2017).

Neste contexto, se faz necessário o uso de antimicrobianos para redução da população dessas bactérias nos reatores de fermentação. Entretanto, grande parte das indústrias optam pelo uso de antibióticos sintéticos, os quais apresentam grande eficácia de controle, tais como a monensina sódica, penicilina, clorafenicol, tetraciclina, entre outros (Prado; Venturini-Filho, 2014). Deve-se destacar que esses produtos além de apresentarem custos elevados, podem resultar em impactos ambientais significativos, como o agravamento da resistência de bactérias a essas moléculas. O uso indiscriminado dessas substâncias também pode causar efeitos colaterais, como a inibição parcial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira, 2020).

A busca por alternativas naturais que ofereçam controle eficaz das contaminações bacterianas, com menor impacto ambiental, tornou-se um foco de interesse crescente para a pesquisa científica e o setor industrial. Diversos estudos têm investigado o potencial de plantas medicinais e seus extratos como soluções viáveis para o controle microbiológico. Entre os exemplos mais promissores estão o uso de própolis, jambolão e lúpulo, cujas propriedades antimicrobianas já foram documentadas na literatura (Caetano; Madaleno, 2011).

Deve-se destacar ainda o Neem (*Azadirachta indica*), que é uma alternativa promissora, devido à sua rica composição de compostos bioativos, como azadiractina, nimbina, salanina e

flavonoides, que conferem propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (Nagano; Batalini, 2021). Além de sua utilização tradicional como pesticida natural no manejo de pragas agrícolas, com baixa toxicidade para organismos não-alvo (Ammara *et al.*, 2023), diferentes partes da planta têm demonstrado eficácia no controle de microrganismos em diferentes contextos industriais, incluindo bactérias resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* (Bassey *et al.*, 2016) e *Salmonella enterica* (Mathew *et al.*, 2017). No campo industrial, seu uso em alimentos e cosméticos já demonstrou resultados promissores na inibição de patógenos, reforçando sua viabilidade como alternativa sustentável (Bassey *et al.*, 2016; Dawkar *et al.*, 2019).

Apesar dessas aplicações diversificadas, o uso do Neem no contexto da fermentação etanólica permanece inexplorado, representando uma oportunidade significativa para inovações no controle de contaminações bacterianas. Suas propriedades antimicrobianas podem ser eficazes contra os contaminantes, ou mesmo estabilizar o meio fermentativo, reduzindo subprodutos indesejados e otimizando o rendimento industrial. Assim, o Neem apresenta potencial para integrar soluções sustentáveis no setor biotecnológico, alinhado às tendências de bioeconomia e eficiência ambiental.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi preparar e caracterizar fitoquimicamente extratos de casca, folhas e sementes de Neem, avaliando o potencial antimicrobiano e a concentração mínima inibitória ante as bactérias *L. fermentum* e *L. mesenteroides*. Além disso, também avaliou-se a atividade antimicrobiana ante a levedura *S. cerevisiae*. Desta maneira, determinou-se o potencial biocida deste produto.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleta do material vegetal e identificação botânica

As folhas, cascas do tronco e frutos foram coletadas da árvore Neem localizada em área urbana no município de Frutal, Minas Gerais, Brasil, no ano de 2021. O material vegetal foi identificado como *Azadirachta indica* A. Juss, por comparação com material tombado no Herbário/BHCB no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2.2. Obtenção dos extratos vegetais

As amostras de folhas, cascas do tronco e frutos foram higienizados com água destilada

e solução de hipoclorito a 5%. Os frutos foram despolpados, retirando-se as sementes. A seguir, os materiais vegetais foram secos em estufa com ventilação forçada, mantida a temperatura de 45 °C, por um período entre 48 h (para folhas e cascas) e 72 h (para sementes). Posteriormente, as amostras secas de folhas e cascas foram trituradas em moinho de facas (Willey SL-31), e as sementes em mixer de alimentos, até que todos os materiais atingissem granulometria de pó. Para as avaliações fitoquímicas, porções trituradas de 30 g (folhas e cascas) e 20 g (sementes) foram submetidas ao processo de extração por maceração com 300 mL e 200 mL de etanol P.A respectivamente, por 48 horas. Os extratos etanólicos das folhas, cascas e sementes foram denominados como FEt, CEt e SEt, respectivamente.

Para as análises antimicrobianas e a caracterização química por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR), foram utilizadas porções trituradas de 50 g de cada material vegetal. Essas porções foram submetidas à extração por maceração com 500 mL de etanol P.A. Após o processo de maceração, os extratos alcoólicos foram filtrados e concentrados em um evaporador rotativo até a completa eliminação do solvente. Em seguida, os extratos foram congelados em ultrafreezer, liofilizados e armazenados em frascos protegidos da luz, sob temperatura controlada de 5 °C.

3.2.3. Caracterização por Cromatografia em Camada delgada

A prospecção fitoquímica foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme metodologia descrita por Wagner e Bladt (1996). Foram utilizadas cromatoplacas pré-fabricadas de sílica gel F254 sobre suporte de alumínio (Merck) e uma cuba de saturação com migração ascendente. As amostras dos extratos de folhas (FEt), cascas (CEt) e sementes (SEt), solubilizadas em etanol, foram aplicadas nas placas de dimensões 3,5 x 6 cm com o auxílio de capilares de vidro. A revelação das placas foi realizada em uma câmara equipada com lâmpada de emissão de radiação UV-A (365 nm) e UV-C (254 nm) (ALLCUV-001).

Para identificação de flavonoides, utilizou-se como eluente uma mistura de Butanol, Água destilada e Ácido acético na proporção de 99:1:0,5 (v/v), com revelação por NP (Aminoetil difenilborinato) e PEG (Polietilenoglicol 4000), seguida de aquecimento. A observação de bandas de coloração amarela indicou a presença de heterosídeos flavônicos (Lucas Filho, 2009), enquanto a exposição à luz UV a 365 nm revelou fluorescência laranja e amarelo esverdeado para flavonoides e fluorescência azulada para compostos fenólicos (Von Zuben; De Souza, 2022).

Para taninos e polifenóis, empregou-se como eluente uma mistura de Acetato de Etila e Metanol na proporção de 97:3 (v/v). A revelação foi realizada com uma mistura das soluções etanólicas de Cloreto Férrico 1% (m/v) e Ferrocianeto de Potássio 1% (m/v), na proporção de 1:1 (v/v). O surgimento de colorações variando de castanho-avermelhado a azul indicou a presença dessa classe de compostos (Lucas Filho, 2009). Taninos hidrolisáveis e taninos condensados foram analisados utilizando o mesmo eluente, com Cloreto Férrico 1% como revelador, resultando em coloração negro-azulada e verde, respectivamente (Silva *et al.*, 2004).

Para a análise de terpenos, utilizou-se como eluente uma mistura de Hexano e Acetato de etila na proporção de 80:20 (v/v). A revelação foi realizada com Anisaldeído sulfúrico, indicando a presença de terpenos pela coloração roxa (Alexandre; Rocha, 2017), e com o reagente de Liebermann-Burchard, resultando em colorações azul-esverdeadas e fluorescências do alaranjado ao vermelho sob luz UV a 365 nm e 254 nm, indicando a presença de esteroides (Sousa, 2020).

3.2.4. Caracterização por Espectroscopia ATR-FTIR

A análise dos extratos foi realizada usando equipamento Espectômetro Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) da marca Agilent, modelo CARY 630, pelo método de reflectância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de transmissão, na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 40 varreduras.

3.2.5. Quantificação de metabólitos secundários

3.2.5.1. Teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método Folin Ciocalteau, descrito por Reis *et al.* (2019). Em tubos de ensaio, foram adicionados alíquota de 0,1mL dos extratos, 7,9 mL de água destilada e 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu, agitando-se a mistura. Transcorrido 5 minutos, adicionou-se 1,5mL de solução de Carbonato de Sódio a 20% (m/v), agitando-as por 15 s. As soluções foram mantidas em repouso, a temperatura ambiente por 40 minutos, na ausência de luz. Logo em seguida, foi realizada a leitura das soluções em Espectrômetro UV/VIS (Thermo Scientific Genesys 180) em comprimento de onda de 765 nm. O teor de fenólicos totais foi calculado e expresso em mg/g de equivalente de Ácido gálico, por meio de curva padrão $y = 0,0009x - 0,0735$; $R^2 = 0,9922$, preparada em concentrações entre 50 a 1000 mg.

3.2.5.2. Teor de Flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais, adotou-se a metodologia descrita por Faria (2021) com adaptações de volumes de amostra e soluções. Alíquota de 1,0 mL do extrato bruto foi transferido para um bêquer de 25 mL, ao qual foram acrescidos de 0,6 mL de ácido acético glacial, 10,0 mL da solução metanólica de piridina 20% e 2,5 mL do reagente Cloreto de Alumínio (50,0 g/L), completando-se o volume com 10,9 mL de água destilada. Após 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as leituras foram realizadas em Espectrômetro UV/VIS (Thermo Scientific Genesys 180) em 420 nm. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg/g de equivalente de rutina, por meio de curva padrão $y = 0,0274x - 0,0355$; $R^2 = 0,9983$, preparada em concentrações que variaram entre 5 a 30 μ .

3.2.5.3. Teor de Taninos totais

O teor de taninos totais seguiu a metodologia de Mota (2023). O método determina a realização de dois procedimentos conjuntos para quantificação de taninos totais, sendo o resultado obtido por diferença entre a absorbância do branco e da amostra tratada. Ambos processos foram preparados em tubos falcon de 15 mL, no qual seguiram os quantitativos estabelecidos na Tabela 1, para cada extrato.

Tabela 1 – Quantitativos de extrato e reagentes para determinação de taninos totais.

Reagentes	Amostra (μ L)	Branco (μ L)
Extrato	150	150
Água destilada	800	1050
Solução de metil-celulose 0,04%	250	0
Solução de Sulfato de amônio saturada	750	750

Após adicionado a mistura reacional, o tubo foi agitado e mantido em repouso por 20 minutos. Em seguida, foi centrifugado por 15 minutos à 17.000 rpm. A absorbância foi medida em Espectrômetro UV/VIS (Thermo scientific genesys 180) em 280 nm, frente a uma cubeta com água destilada. Para construção da curva foi empregada (-)-epicatequina P.A, nas concentrações entre 10 e 100 mg/L. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 280

nm, frente a uma cubeta com água destilada. O teor de taninos totais foi expresso em mg/g equivalente de epicatequina.

3.2.5.3. Avaliação antioxidante

A atividade antioxidante de radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) foi determinada segundo a metodologia de Silva *et al.* (2019). A cada tubo foi adicionado: 0,1 mL de extrato e 2,9 mL da solução de DPPH, agitando-se por 10 s. As soluções foram mantidas em repouso por 25 min, na ausência de luz. Em seguida, foi realizada a leitura em Espectrômetro UV/VIS (Thermo scientific genesys 180) comprimento de onda de 515 nm. Soluções metanólicas de Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico) em concentrações de 0,1 a 1 m/M foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração padrão ($y = -0,4987x + 0,5991$; $R^2 = 0,9886$), sendo a concentração de antioxidantes expressa em equivalente de Trolox (μ mol/L).

3.2.6. Atividade antimicrobiana pelo teste antibiograma

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando o teste de difusão em disco, conforme Santos *et al.* (2022), com culturas puras de bactérias gram-positivas *L. fermentum* (CCT 0559) e *L. mesenteroides* (CCT0605), além da levedura *S. cerevisiae*. (CAT-1). As culturas liofilizadas foram obtidas de centros comerciais especializados.

Para preparar o inóculo da levedura, 1g de *S. cerevisiae* foi diluída em 10 mL de solução de glicose 0,5% (m/v). As bactérias *L. mesenteroides* e *L. fermentum* também foram cultivadas em placas de Petri com meio Muller-Hinton (pH 7-7,5) usando alça de Drygalski estéril.

Discos de papel filtro foram embebidos com 10 μ L de cada extrato bruto na concentração de 100 mg/mL e colocados na superfície do meio de cultura. Discos embebidos com Dimetilsulfóxido (DMSO) serviram como controle negativo, enquanto discos contendo ampicilina (1 mg/mL), actidiona (1 mg/mL) e própolis verde comercial Propomax® (100 mg/mL) foram usados como controles positivos.

As placas foram incubadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 30 °C para *L. mesenteroides* e *S. cerevisiae*, e a 35 °C para *L. fermentum*, por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos e os resultados interpretados de acordo com CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010). Microrganismos foram considerados resistentes se o diâmetro do halo fosse inferior a 8 mm, intermediários se entre 9 e 14 mm, e sensíveis se igual ou superior

a 14 mm.

3.2.7. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente procedeu-se com o preparo dos antimicrobianos, sendo que 500 mg de cada extrato seco foram diluídos em 1 mL de DMSO, ajustando-se as concentrações para 10 mg/mL, 30 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL, que foram usadas no teste.

Para o teste, adicionou-se 1 mL do meio de cultura MRS líquido (extrato de levedura – 5g/L; peptona – 10g/L; extrato de carne – 5g/L; glicose – 20g/L; fosfato de hidrogênio dipotássico – 2g/L; tween 80 – 1g/L; acetato de sódio – 5g/L; sulfato de magnésio – 0,05g/L) em tubos de ensaio, os quais foram posteriormente esterilizados em autoclave a 121 °C/15min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de cada cultura de microrganismo (10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /mL). As amostras foram alocadas em shaker a 140rpm a 30 °C (*L. mesenteroides*) ou 35 °C (*L. fermentum*) por período de 2 horas. Na sequência, os extratos foram incorporados nas concentrações do teste e os tubos retornaram ao shaker.

Para avaliar o efeito bactericida dos antimicrobianos, realizou-se a quantificação da população de microrganismos logo após a adição dos extratos, e após 2 e 8 horas de agitação. Para isso, alíquotas dos tubos foram retiradas e adicionadas em placas de petri contendo o meio MRS sólido (MRS líquido mais adição de ágar – 15g/L). As placas foram incubadas em B.O.D. a 30 °C (*L. mesenteroides*) ou 35 °C (*L. fermentum*) por 24 horas.

3.2.8. Análise estatística

As quantificações e avaliações antimicrobianas foram realizadas em triplicata. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises estatísticas foram processadas por meio dos softwares AgroEstat e Minitab (versão 17.1.0).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Caracterização fitoquímica

O primeiro passo foi avaliar qualitativamente os metabólitos presentes nos extratos etanólicos de folhas (FEt), cascas (CEt) e sementes (SEt) de *A. indica*, indicando quais compostos foram extraídos com a técnica de maceração. Para isso, utilizou-se a técnica da triagem fitoquímica por CCD (figuras 1 e 2) e avaliação por ATR-FTIR (figura 3). Na

sequência, os dados foram sintetizados e apresentados na tabela 1.

Os perfis cromatográficos em CCD revelaram a presença de uma variedade de classes de metabólitos secundários nos extratos FEt, CEt e SEt de Neem. Importante destacar que foram observadas a presença de terpenos nos extratos etanólicos de folhas (FEt), cascas (CEt) e sementes (SEt), evidenciada pelas manchas roxas observadas (Figura 1A) (Alexandre; Rocha, 2017). O teste de Liebermann-Burchard confirmou a presença de esteroides e terpenos, identificados por manchas azul-esverdeadas e amareladas, respectivamente. Além disso, manchas avermelhadas específicas nas folhas reforçaram a presença de esteroides nessa matriz (Figura 1B). A análise sob luz UV revelou fluorescência azulada em todas as amostras, corroborando a presença de terpenos nos extratos de folhas, cascas e sementes (Figura 1C) (Lucas Filho, 2009).

De forma complementar, a revelação cromatográfica com NP+PEG sob aquecimento (Figura 2A) e luz UV-365 nm (Figura 2B) indicou flavonoides e compostos fenólicos, detectados por bandas amareladas e fluorescência (Von Zuben; De Souza, 2022). A presença de taninos foi identificada por manchas azuladas e, com solução de cloreto férrico a 1%, manchas negro-azuladas e verdes evidenciaram taninos hidrolisáveis nas cascas e taninos condensados no FEt (Figura 2D) (Silva *et al*, 2004).

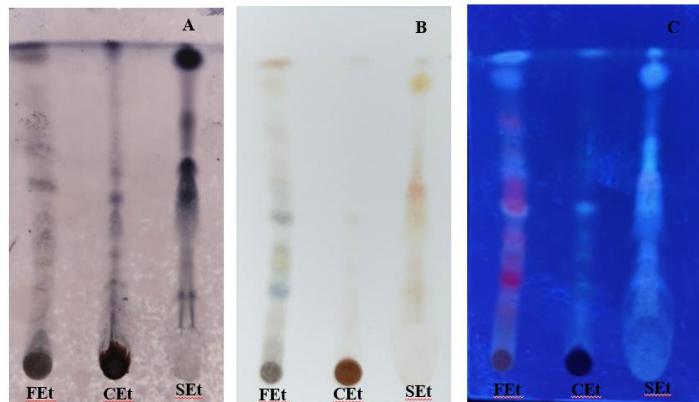


Figura 1 – Perfil cromatográfico dos extratos FEt, CEt e SEt. Fase móvel: Hexano/Acetato de etila (80:20). Reveladores: (A) Anisaldeído sulfúrico e aquecimento, (B) Liebermann-Burchard, (C) Liebermann-Burchard – sob luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2025).

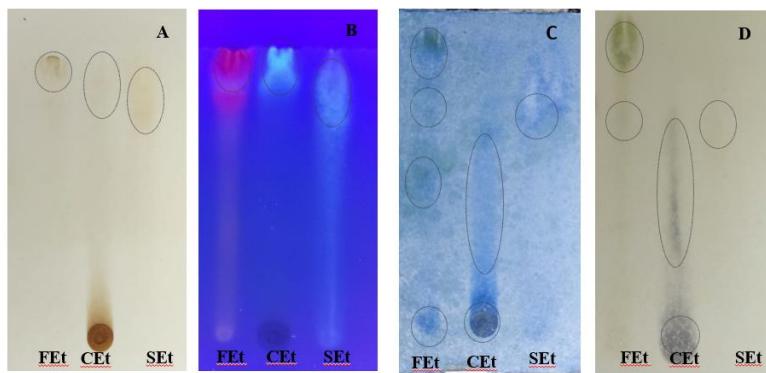


Figura 2 –Perfil cromatográfico dos extratos FEt, CEt e SEt Fase móvel para A e B: Butanol/Água/ Ácido acético (99: 1:0,5, v/v). Reveladores: A. NP+PEG com aquecimento – visível; B. NP+PEG – UV 365 nm; Fase móvel para (C e D: Acetato de etila/Metanol (97:3). Reveladores: C. Soluções de Cloreto férrico 1% (m/v) e Ferrocianeto de potássio 1% (m/v), D. Solução Cloreto Férrico a 1% (m/v). Fonte: os autores (2025).

As análises espectroscópicas por FTIR de FEt e CEt (Figura 3) revelaram bandas em 3395 e 3283 cm^{-1} , atribuídas às hidroxilas (-OH) associadas por ligações de hidrogênio, com bandas adicionais em 1233 e 1033 cm^{-1} (FEt) e 1234 e 1033 cm^{-1} (CEt), indicando a presença de estruturas polihidroxiladas. Nos espectros, foi observada uma banda em 1455 cm^{-1} , característica do estiramento C=C de anéis aromáticos (Freire, 2020). No SEt (Figura 3), uma banda fraca em 3383 cm^{-1} indicou uma menor concentração de compostos hidroxilados, corroborando os teores de fenólicos totais, flavonoides e taninos previamente identificados.

Adicionalmente, o espectro do CEt apresentou uma banda forte em 1580 cm^{-1} , típica de vibrações de ligação C=C em anéis aromáticos ou de grupos carbonila (C=O) conjugados, associadas a flavonoides e taninos (Silverstein *et al.*, 2019). Esses achados corroboram os resultados da CCD e da quantificação de taninos e flavonoides, confirmando a presença dessas classes no extrato.

Os espectros de FEt e SEt também exibiram sinais fracos em 3030 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento =C-H de compostos aromáticos, confirmados pelas bandas em 1455 e 1464 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento C=C do anel aromático. Sinais em 2933, 2915, 2853, 2843, 1455 e 1454 cm^{-1} indicaram grupos funcionais C-H do esqueleto hidrocarboníco, sugerindo a presença de ácidos graxos (Pavia *et al.*, 2015). No CEt, sinais fracos em 2924 e 2842 cm^{-1} apontaram uma baixa concentração de compostos alifáticos. A absorção em torno de 1740 cm^{-1} , associada à carbonila (C=O), e as bandas em 1375 cm^{-1} , atribuídas a ligações C-O, confirmaram a

presença de ésteres nos extratos de FEt e CEt, possivelmente derivados de ácidos graxos saturados e insaturados, bem como estruturas triterpênicas.

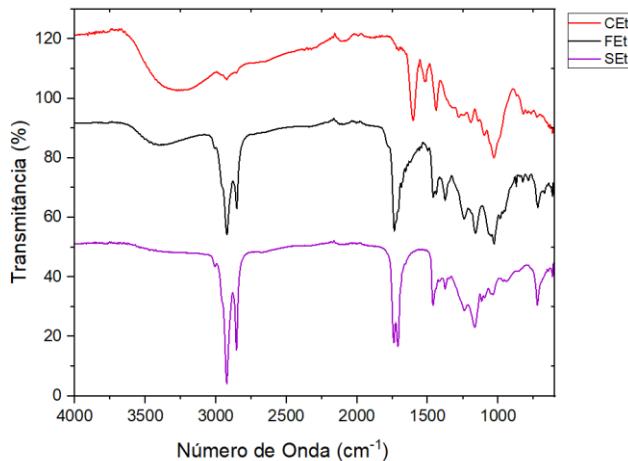


Figura 3 – Espectro ATR-FTIR de FEt, CEt e SEt. Fonte: os autores (2025).

Desta maneira, pode-se elaborar a tabela 2, que apresenta a síntese dos resultados obtidos para a caracterização dos compostos identificados por CCD e espectroscopia de infravermelho.

Tabela 2 – Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de Neem por CCD em sílica gel.

Extrato	Metabolitos secundários						
	Fenólico	Flavonoide	Taninos hidrolisáveis	Taninos condensado	Terpeno	Esteroide	
FEt	+	+	+	+	+	+	+
CEt	+	+	+	-	+	-	-
SEt	+	+	+	-	+	-	-

Legenda: + presença; - ausência. Fonte – os autores (2025).

Verificou-se que a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos hidrolisáveis e terpenos para todas as matrizes do Neem estudadas. Esse resultado é interessante, pois nem todos os trabalhos presentes na literatura conseguiram essa identificação. Galeane (2017), por exemplo, não encontrou terpenos ou taninos em extratos hidroetanólicos das folhas da planta. Já Bappah *et al.* (2022) determinaram flavonoides e alcaloides em extratos alcoólicos de folhas e cascas. Por sua vez, estudos de Adaramola *et al.* (2023), Nagano e Batalini (2021), Abdulkadir *et al.* (2017) e Fernando e Dissanayake (2020), utilizando testes fitoquímicos por

via úmida, confirmaram a presença de taninos, flavonoides e terpenos para todas as matrizes da planta.

Esses resultados apontam para a ampla diversidade de compostos bioativos em *A. indica*, com variações dependentes de fatores ambientais inerentes a matéria-prima, bem como das técnicas físico-químicas empregadas para preparo do extrato.

Tabela 3 – Estatísticas descritivas da concentração dos compostos fenólicos totais, taninos totais, flavonoides e atividade antioxidante de FEt, CEt e SEt do Neem.

Amostras	Fenólicos Totais	Taninos Totais mg/g	Flavonoides Totais	Antioxidante μM ET
FEt	0,88 ± 0,10 ^B	0,19 ± 0,02 ^B	0,16 ± 0,00 ^A	0,81 ± 0,00 ^B
CEt	4,10 ± 0,18 ^A	1,59 ± 0,30 ^A	0,01 ± 0,00 ^C	5,28 ± 0,17 ^A
SEt	0,31 ± 0,02 ^C	0,06 ± 0,00 ^B	0,03 ± 0,00 ^B	0,88 ± 0,00 ^B

Letras diferentes na mesma coluna indicam médias significativamente diferentes pela aplicação do teste de comparação múltipla de Tukey a P<0,05. Fonte- os autores (2025).

Foi observada uma variação significativa nas concentrações desses metabólitos e na atividade antioxidante entre as diferentes matrizes estudadas. Especificamente, o CEt apresentou uma concentração significativamente mais alta de compostos fenólicos quando comparado ao FEt, que por sua vez mostrou valores superiores ao SEt. Os dados sugerem uma distribuição diferenciada de tais compostos nas matrizes vegetais analisadas, o que pode influenciar diretamente suas propriedades e atividade antioxidante.

Na análise de taninos totais, o CEt mostrou uma concentração superior em comparação aos outros extratos. Por outro lado, na avaliação de flavonoides, o FEt registrou a maior concentração, seguida pelo SEt e, por fim, pelo CEt. De acordo com a literatura, taninos identificados nas cascas incluem tipos como galo-catecol e ácido tântico (Haroun; Ahmed, 2022). As folhas, por sua vez, apresentam uma diversidade de flavonoides incluindo catequinas, flavonas, flavonoides, xantonas, além de taninos como as leucoantocianidinas (Nagano; Batalini, 2021). As sementes contêm compostos como quercetina, rutina e ácido tântico (Sharma *et al.*, 2022).

No que se refere à atividade antioxidante, não houve diferença significativa entre FEt e SEt, diferenciando de forma significativa de CEt. A atividade antioxidante de CEt, pode estar relacionada ao teor superior de compostos fenólicos em relação as outras matrizes. Entretanto, as FEt e SEt apresentaram diferenças significativas no teor de fenólicos totais, mas

não apresentaram diferenças significativas na atividade antioxidante. Assim, as presenças de outros compostos, como os triterpenos e ácidos graxos presentes nas sementes, podem ter contribuído para sua atividade antioxidante (Atta *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos para compostos fenólicos corroboram com dados de Abdulkadir *et al.* (2017), que encontraram concentrações mais altas nas cascas comparadas a outras partes da planta. Para flavonoides, as folhas apresentaram a maior concentração, superando sementes e cascas, como também encontrado por Fernando e Dissanayake (2020).

Airaodion *et al.* (2019) observaram maior concentração de taninos nas folhas de *A. indica* em relação aos flavonoides, enquanto Adaramola *et al.* (2023) relataram o oposto para as cascas. Essas variações sugerem que fatores ambientais, como ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV e nutrientes, influenciam a concentração de metabólitos secundários (Gobbo-Neto; Lopes, 2007). Além disso, solventes e métodos de extração impactam distintamente os órgãos vegetais (Lezoul *et al.*, 2020).

3.3.2. Avaliação antimicrobiana

Finalizada a caracterização fitoquímica dos extratos, o próximo passo foi avaliar o potencial antimicrobiano dos mesmos contra as bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Para isso, realizou-se teste preliminar de antibiograma com discos de difusão para avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos (Figura 4), seguido de concentração inibitória mínima para os compostos que apresentaram ação (Figuras 5 e 6).

Os halos de inibição observados no teste de antibiograma (Figura 4) evidenciaram que os extratos FEt e CEt apresentaram atividade antimicrobiana superior à própolis contra *L. mesenteroides*, entretanto inferior a ampicilina. No caso de *L. fermentum*, o FEt apresentou atividade comparável à da própolis, enquanto o CEt não exibiu atividade significativa contra essa bactéria. Com base na escala CLSI (2010), classificou-se *L. mesenteroides* como sensível ao FEt e ao CEt, enquanto o FEt mostrou-se um antimicrobiano intermediário para *L. fermentum*. Importante destacar que o SEt não apresentou halo de inibição para nenhuma bactéria estudada. Adicionalmente, não foram observados halos de inibição dos compostos FEt, CEt e SEt para a *S. cerevisiae* (dados não apresentados).

Desta maneira, foi utilizado apenas os extratos FEt e CEt para avaliação da concentração inibitória mínima.

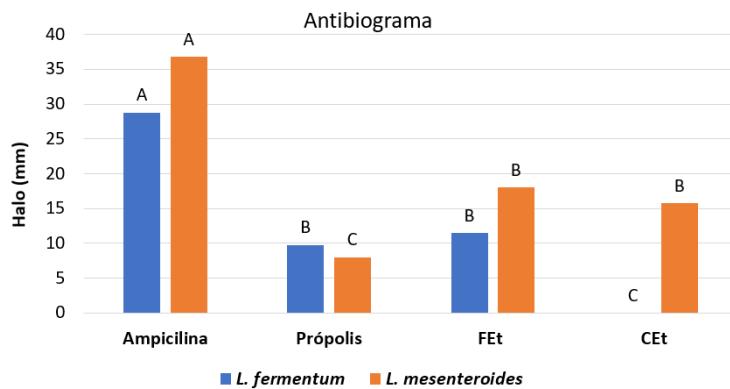


Figura 4 – Teste de antibiograma realizado com o ampicilina, Própolis e FEt e CEt. Letras nas colunas diferem de acordo com o teste de Tukey (5%). Fonte: os autores (2025).

Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) permitiram validar os resultados do antibiograma, indicando interações significativas entre a dose dos extratos e o tempo de exposição. Para *L. mesenteroides* (Figura 5A), o FEt demonstrou efeito bacteriostático a 30 mg/mL e bactericida a partir de 50 mg/mL, com redução populacional significativa a partir de 2 horas. Em *L. fermentum* (Figura 5B), doses de 50 e 100 mg/mL resultaram em efeitos bactericidas mais rápidos, enquanto doses menores (30 mg/mL) tiveram ação bacteriostática.

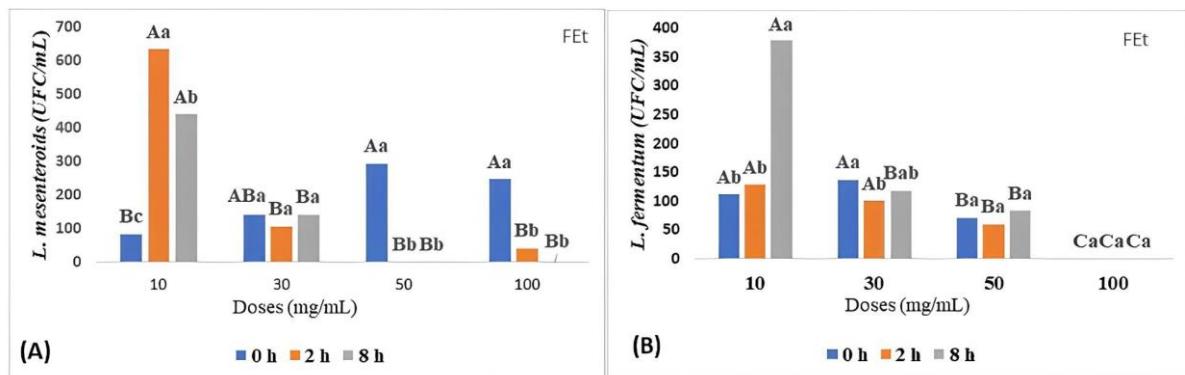


Figura 5 – Interação entre doses e tempos para o controle mínimo inibitório utilizando FEt e os microrganismos *L. mesenteroides* (A) e *L. fermentum* (B). Letras maiúsculas comparam doses. Letras minúsculas comparam tempos. Fonte: os autores (2025).

O CEt mostrou alta eficácia contra *L. mesenteroides*, com doses de 30 mg/mL ou superiores resultando em efeito bactericida em todos os tempos avaliados (Figura 6A). Para *L. fermentum*, apenas doses de 50 mg/mL ou superiores exibiram efeitos bactericidas consistentes (Figura 6B). É importante notar que os resultados de CIM diferiram do

antibiograma no caso de *L. fermentum*, evidenciando a importância do tempo e concentração no desempenho antimicrobiano.

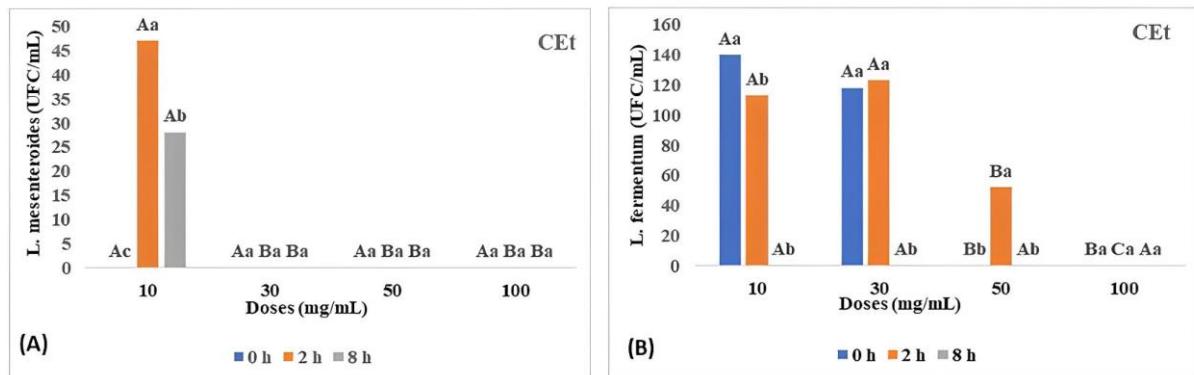


Figura 6 – Interação entre doses e tempos para o controle mínimo inibitório utilizando CEt os microrganismos *L. mesenteroides* (A) e *L. fermentum* (B). Letras maiúsculas comparam doses. Letras minúsculas comparam tempo. Fonte: os autores (2025).

Os resultados obtidos destacam a relação entre a composição química dos extratos de *A. indica* e sua eficácia antimicrobiana, com evidências de que os extratos etanólicos de folhas (FEt) e cascas (CEt) apresentam atividade significativa contra *L. mesenteroides*, superando a eficácia da própolis. Essa atividade pode ser atribuída à concentração de compostos fenólicos e taninos presentes nos extratos, que desempenham papel fundamental na alteração da funcionalidade da parede celular bacteriana (Prasad *et al.*, 2023). Os compostos fenólicos interagem com a parede celular, alterando sua permeabilidade e provocando falhas no controle quimiosmótico e na síntese de DNA, enquanto os taninos formam complexos com proteínas, inibem enzimas essenciais e privam os microrganismos de nutrientes indispensáveis ao seu crescimento (Prasad *et al.*, 2023).

A ausência de uma membrana externa em *L. mesenteroides*, característica de bactérias gram-positivas, facilita a interação dos compostos bioativos com a parede celular, aumentando sua sensibilidade. Flavonoides, presentes no FEt, potencializam essa ação por meio da inibição da síntese de ácidos nucleicos e pela indução de alterações estruturais na membrana celular (Francolini; Piozzi, 2020). Em contrapartida, *L. fermentum* apresentou maior resistência, com apenas o FEt demonstrando uma atividade antimicrobiana comparável à da própolis, enquanto o CEt e o extrato de sementes (SEt) não apresentaram resultados significativos. Essa menor sensibilidade pode ser explicada por diferenças estruturais na parede celular do *L. fermentum*, que modulam sua resistência a compostos fenólicos e antioxidantes (Tasanarong *et al.*, 2021).

A composição química do SEt, composta predominantemente por terpenos e ácidos graxos, ajuda a explicar sua baixa eficácia antimicrobiana contra as bactérias avaliadas. Enquanto esses compostos demonstram maior afinidade por bactérias gram-negativas, devido à interação com a membrana externa, eles possuem eficácia reduzida contra bactérias gram-positivas (Mahizan *et al.*, 2019). A seletividade dos extratos também se mostrou evidente em sua incapacidade de inibir *S. cerevisiae*, sugerindo um potencial uso em processos fermentativos onde a preservação das leveduras é essencial. Essa especificidade é atribuída às interações seletivas dos compostos bioativos com estruturas bacterianas, sem afetar a integridade das células de levedura.

O desempenho superior dos extratos em comparação à própolis reforça o potencial do Neem como fonte de compostos antimicrobianos naturais, especialmente em aplicações voltadas ao controle de contaminações em processos fermentativos. Estudos prévios corroboram esses resultados, como o de Alqahtani (2020), que relatou halos de inibição semelhantes aos obtidos com o extrato de folhas (FEt) contra *Lactobacillus spp.*. Adaramola *et al.* (2023), por sua vez, destacaram a eficácia dos taninos presentes nas cascas da planta contra *Leuconostoc spp.*. Além disso, flavonoides e compostos fenólicos extraídos do Neem também foram associados à atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, conforme relatado por Abdulkadir *et al.* (2017) e Prasad *et al.* (2023).

3.4. Conclusão

O presente estudo evidencia a diversidade de compostos bioativos presentes nos extratos etanólicos de *A. indica* e sua influência direta nas atividades antioxidantes e antimicrobianas. A composição química diferenciada entre os extratos mostra-se determinante para suas propriedades biológicas. O extrato das cascas apresenta maior teor de compostos fenólicos e taninos, com atividade antioxidante superior e eficácia antimicrobiana contra *L. mesenteroides*, com uma dosagem de 30 mg/mL.

O extrato das folhas é rico em flavonoides e compostos fenólicos, e apresenta eficácia antimicrobiana contra *L. fermentum* e *L. mesenteroides*, com uma dosagem de 50 mg/mL necessária para o controle dessas bactérias.

O extrato de sementes de Neem é rico em ácido graxo e triterpenóides, e não apresenta ação antimicrobiana ante a *L. fermentum* e *L. mesenteroides*.

Os extratos de folhas, cascas e sementes não afetam a levedura *S. Cerevisiae*.

Esses resultados ressaltam o potencial de *A. indica* como biocida natural, especialmente os extratos de cascas e folhas, que apresentam eficácia no controle seletivo de bactérias gram-positivas, o que reforça sua viabilidade para uso em processos de fermentação etanólica. Assim, a planta se mostra promissora para aplicações biotecnológicas e industriais, com destaque para processos fermentativos, oferecendo uma solução sustentável e eficiente para o controle microbiano.

REFERÊNCIAS

- ABDULKADIR, A. R.; MAT, N.; JAHAN, MD, S. *In-vitro* antioxidant potential in leaf, stem and bark of *Azadirachta indica*. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v.40, n. 4, p. 497-506, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322977309_In-vitro_Antioxidant_Potential_in_Leaf_Stem_and_Bark_of_Azadirachta_indica. Acesso em 5 abr. 2024.
- ADARAMOLA, F.; ADEWOLE, S.; ADEWOLE, O. Avaliação de atividades fitoquímicas, antioxidantes e antimicrobianas do extrato aquoso de etanol e frações da casca do caule de *Azadirachta indica*. **Revista Internacional de Ciência para Sustentabilidade Global**, vol. 9, n. 1, p. 13, 2021. Disponível em: <https://www.fugus-ijsgs.com.ng/index.php/ijsgs/article/view/401>. Acesso em: 5 mar. 2024.
- AIRAODION, A. I.; OLATOYINBO, P.O.; OGBUAGU, U.; OGBUAGU, E. O.; AKINMOLAYAN, J.D.; ADEKALE, O.A.; AWOSANYA, O.O.; AGUNBIADE, A.P.; OLORUNTOBA, A.P.; OBAJIMI, O.O.; ADENIJI, A.R.; AIRAODION, E. Comparative assessment of phytochemical content and antioxidant potential of *Azadirachta indica* and *Parquetina nigrescens* leaves. **Asian Plant Research Journal** al, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://journalaprj.com/index.php/APRJ/article/view/37>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- ALEXANDRE, A. S.; ROCHA, W. C. Perfil cromatográfico por TLC do óleo e dos extratos das folhas e caule de andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. **Scientia Amazonia**, v. V. 6, n. 2, p 117-125, 2017. Disponível em: <http://www.scientia-amazonia.org>. Acesso em: 13 de mai. 2024.
- ALQAHTANI, S. M. Antimicrobial efficacy of neem and liquorice with chlorhexidine on *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* and *Actinomyces naeslundii* – an *in vitro* study., **BioRxiv**, p. 2020.09. 23.311019, 2020. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.09.23.311019>. Acesso em: 13 mai. 2024.
- AMMARA, A.; SOBIA, A.; NUREEN, Z.; SOHAIL, A.; ABID, S.; AZIZ, T.; NAHAA, M.; REWAA, S., AHELLAH, M.; NOUF, S.; NEHAD, A.; MANAL, Y.; AMNAH, A.; MAJID, A.; ABDULHAKEEM, S.; ANAS, S.; SAA, A. Revolutionizing the effect of *Azadirachta indica* extracts on edema induced changes in C-reactive protein and interleukin-6 in albino rats: in silico and in vivo approach. **European Review for medical & Pharmacological Sciences**, v. 27, n.13, p. 5951-5963, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.26355/eurrev_202307_32947. Acesso em: 12 mai. 2024.
- ATTA, N. M.; ISMAIEL, G. H.; HASHISH, A. E. M. S.; MOHAMED, E. Sh. Physical and chemical characteristics of neem oils extracted from seed, whole fruit and flesh. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v. 93, n. 3, p. 887-899, 2015. Disponível em: https://ejar.journals.ekb.eg/article_155469.html. Acesso em: 13 mar. 2024.
- BAPPAH, A. M.; QOSSIM, M.; DAMBAM, Z. N.; USMAN, A. S.; AWALU, U. Antibacterial activity of alkaloid, flavonoids and lipids from crude extracts of *Azadirachta indica* on some selected medically important bacteria. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 20-24, 2022. 2022. Disponível em:

<https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/JOBIMB/article/view/752>. Acesso em: 13 mai. 2024.

BASSEY, E. E.; MOHAMMED, G. A.; BALA, H. M.; OGONNA, U. S.; YAWURI, B. B.; MADUCHI, O. C., Phytochemical analysis and antimicrobial activity of methanolic, ethanolic and acetonic extracts of stem bark and leaf of neem plant (*Azadirachta indica*). **Journal of Diseases and Medicinal Plants**, v. 2, p. 14-23, 2016.

Disponível em:

<https://www.sciencepublishinggroup.com/article/10.11648/j.jdmp.20160203.11>. Acesso em: 12 mai. 2024.

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. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117301624>. Acesso em: 1 mai. 2024.

CAETANO, A. C.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011. Disponível em:
<https://publicacoes.fatecjaboticabal.edu.br/citec/article/view/63>. Acesso em: 10 abr. 2024.

CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**. (6a ed.), M7-A6, v. 23, n. 2, p. 49, 2010. Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo3.pdf. Acesso em; 5 abr. 2024.

OLIVEIRA, G.M.; SILVA, T. F.; NETO, J. I. H. Estudo dos impactos provocados por microrganismos no rendimento da fermentação alcoólica. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 30434-30448, 2020. Disponível em:
<http://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/10548/8806>. Acesso em: 25 abr. 2024.

FERNANDO, S. M.; DISSANAYAKE, I. Determinação da capacidade antioxidante de diferentes extrações solventes de folhas e casca de *Azadirachta indica* (Neem). **Medicinal Plant**, v. 6, n. 5, p. 61-75, 2020. Disponível em:
<https://digilib.natlib.lk/bitstream/handle/123456789/41503/Sandini%20Melosha%20Fernando.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 30 abr. 2024.

FARIA, C. A. **Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de rutina em *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (FABACEAE)**. 2021. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2021. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/28640>. Acesso em: 2 mai. 2024.

FRANCOLINI, I.; PIOZZI, A. Papel das moléculas antioxidantes e polímeros na prevenção do crescimento bacteriano e formação de biofilme. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 29, p. 4882-4904, 2020. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/171477/article>. Acesso em: 5 mai. 2024.

FREIRE, J. S. **Perfil fitoquímico, atividade antioxidante e citogenotoxicidade da catingueira (Poincianella bracteosa (Tul.) L.P. Queiroz).** 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, 2020. Disponível em: <http://localhost:8080/tede/handle/tede/312>. Acesso em: 8 mai. 2024.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gn5mhqcFHSbXXgTKNLJTS9t/>. Acesso em: 3 de abr. 2024.

GALEANE, M.; MARTINS, C.; MASSUCO, J.; BAUAB, T.; SACRAMENTO, L. Triagem fitoquímica de *Azadirachta indica* A. Juss para atividade antimicrobiana. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 4, p. 117-122, 2017. Disponível em: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/36B474862486>. Acesso em: 12 mai. 2024.

HAROUN, M. A.; AHMED, M. M. Poder de curtimento e métodos combinados para caracterização do tanino vegetal em plantas. **GSC Advanced Research and Reviews**, v. 13, n. 3, p. 097-102, 2022. Disponível em: <https://gsconlinepress.com/journals/gscarr/content/hide-power-and-combined-methods-characterization-vegetable-tannin-plant>. Acesso em: 13 mai. 2024.

LEZOUL, N. E. H; BELKADI, M.; HABIBI, F.; GUILLÉN, F, Processos de extração com diversos solventes para compostos bioativos totais em diferentes órgãos de três plantas medicinais. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4672, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25204672>. Acesso em: 15 mai. 2024.

LUCAS FILHO, M. D. **Estudo fitoquímico de espécies do gênero Erythroxylum com potencial atividade vasodilatadora e inibidora da enzima conversora de angiotensina.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Escola de Farmácia, Ouro Preto, Minas Gerais, 2009. Acesso em: 18 abr. 2024.

MAHIZAN, N.; YANG, S.; MOO, C.; SONG, A.; CHONG, C.; CHONG, C.; ABUSHELAIBI, A.; LIM, S.; LAI, K., 2019. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Moléculas**, v. 24, n. 14, p. 2631. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/14/2631>. Acesso em: 20 abr. 2024.

MATHEW, B.; AMOS, Y.; ABIMBOLA, O. A.; ANEKOSON, JI.; ALVAN, A. *In vitro* antimicrobial activity of stem bark extract of *Azadirachta indica* A. (Juss) against antibiotic Resistant *Salmonella enterica* serovar *typhi*. **American Journal of Laboratory Medicine**, v. 2, n. 6, p. 163-171, 2017. Disponível em: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=235&doi=10.11648/j.ajlm.20170206.18>. Acesso em: 23 abr. 2024.

MENEZES FILHO, A. C. P.; MALAQUIAS, K. S.; CASTRO, C. F. S. Caracterização dos compostos químicos dos óleos extraídos da casca, arilo e semente dos frutos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Jatobá-do-Cerrado). **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 23, n. 3, p. 171-174, 2019. Disponível em:

<https://seer.pgsskroton.com/index.php/ensaioeciencia/article/view/6568>. Acesso em: 25 abr. 2024.

MINITAB, version 17.1.0. **Software Informer**. 2024. Disponível em: <https://minitab.informer.com/17.1/>. Acesso em: 27 abr. 2024.

MOTA, N. C. J. Efeito da aplicação foliar de silício na fisiologia e na qualidade da produção da casta Touriga Francesa–Douro Superior. 2023. Dissertação (Mestrado em Enologia e Viticultura) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2023. Disponível em: <https://repositorio.utad.pt/server/api/core/bitstreams/742fc4bc-b797-4948-85af-50a3d5e5ac55/content>. Acesso em: 30 abr. 2024.

NAGANO, M. S.; BATALINI, C. Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 50, n. 1, p. 29-47, 2021. Disponível em: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/95447>. Acesso em: 2 mai. 2024.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 5^a edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PRADO, J. L.; VENTURINI FILHO, W. G. Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica. **Revista Energia na Agricultura**, v. 29, n. 4, p. 277-281, 2014. Disponível em: <https://revistas.fca.unesp.br/index.php/energia/article/view/1646>. Acesso 5 abr. 2024.

PRASAD, K.; SASI, S.; WEERASINGHE, J.; LEVCHENKO, I.; BAZAKA, K. Enhanced antimicrobial activity through synergistic effects of cold atmospheric plasma and plant secondary metabolites: opportunities and challenges. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7481, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/22/7481>. Acesso em: 7 mai. 2024.

REIS, D. P.; CAMPOS, R.; DE LIMA, C. P. Determinação de compostos fenólicos e avaliação do poder redutor de infusões de amostras de chá de *Camelia sinensis*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4842-4854, 2019. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/4198>. Acesso em: 10 mai. 2024.

SANTOS, P. A. L.; SANTOS, L.C.; COSTA, R. A.; ESTEVAM, A. S.; SILVA, M. R. P.; REIS, I. A. O.; OLIVEIRA, J. S.; ARAÚJO, B. S.; LUCCA JUNIOR, W.; SANTOS, SB.; ESTEVAM, CS. Chemical profile and antimicrobial activity of abarema cochlaciacarpos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e22911427226. 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27226>. Acesso em: 12 mai. 2024.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC.2019.

SOUSA, J. A. C. Fitoquímica, citotoxicidade e atividade anti-Zika vírus in vitro de extratos etanólicos de espécies da família Rutaceae. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro

Preto, 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/12965>. Acesso em: 14 mai. 2024.

TASANARONG, T.; PATNTIRAPONG, S.; AUPAPHONG, V. The inhibitory effect of a novel neem paste against cariogenic bacteria. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 13, n. 11, p. e1083. 2021. Disponível em: <https://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/58781.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2024.

VON ZUBEN, G.; DE SOUZA, E. O. Identificação de flavonoides em extrato vegetal de *Passiflora incarnata linnaeus* utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). **Revista Eletrônica FACP**, n. 22, 2022. Disponível em: <https://revistaunifacp.com.br/revista/index.php/reFACP/article/view/96>. Acesso em: 20 abr. 2024.

WAGNER, H.; BLADT, S., 1996. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas** (2nd ed.). Springer-Verlag.

CAPÍTULO 4 – INFLUÊNCIA DO FRACIONAMENTO NA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Azadirachta indica* CONTRA BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

Resumo

Com a crescente preocupação com a contaminação bacteriana na fermentação etanólica, buscam-se alternativas naturais para o controle de microrganismos indesejáveis, que competem com as leveduras e comprometem a eficiência do processo fermentativo e a qualidade das bebidas. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e fracionados das folhas e cascas de *Azadirachta indica* (Neem) contra *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, correlacionando os metabólitos secundários com a atividade observada. Os extratos foram obtidos por maceração e fracionados por extração líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes. A caracterização fitoquímica foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada, e a atividade antimicrobiana avaliada pela Concentração Inibitória Mínima (0,5 a 100 mg/mL). Foram identificados terpenoides, esteroides, taninos, flavonoides e compostos fenólicos. O extrato de casca inibiu ambas bactérias a partir de 0,5 mg/mL, sendo os taninos os principais responsáveis pelo efeito contra *L. fermentum*. O extrato de folhas apresentou ação com a fração hexano contra *L. mesenteroides* com (0,5 mg/mL), enquanto o extrato bruto inibiu *L. fermentum* com 1,0 mg/mL, possivelmente por efeito sinérgico entre os metabólitos presentes. Esses resultados reforçam o potencial de *A. indica* como alternativa natural eficaz para o controle microbiano na fermentação etanólica, com aplicação na indústria de bebidas fermentadas.

Palavras-chaves: Fitocompostos, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, metabólitos secundários.

Influence of Fractionation on the Antimicrobial Efficacy of *Azadirachta indica* Extracts Against Bacteria Contaminants in Ethanol Fermentation

Abstract

With the growing concern over bacterial contamination in ethanol fermentation, natural alternatives are being sought for the control of undesirable microorganisms that compete with yeasts and compromise the efficiency of the fermentation process and the quality of beverages. This study evaluated the antimicrobial activity of crude and fractionated extracts from the leaves and bark of *Azadirachta indica* (Neem) against *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc mesenteroides*, correlating secondary metabolites with the observed activity. The extracts were obtained by maceration and fractionated by liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarities. Phytochemical characterization was performed through Thin-Layer Chromatography, and antimicrobial activity was assessed by the Minimum Inhibitory Concentration (0.5 to 100 mg/mL). Terpenoids, steroids, tannins, flavonoids, and phenolic compounds were identified. The bark extract inhibited both bacteria starting at 0.5 mg/mL, with tannins being the main agents against *L. fermentum*. The leaf extract showed action with the hexane fraction against *L. mesenteroides* (0.5 mg/mL), while the crude extract inhibited *L. fermentum* at 1.0 mg/mL, possibly due to a synergistic effect between the metabolites present. These findings reinforce the potential of *A. indica* as an effective natural alternative for microbial control in ethanol fermentation, with applications in the fermented beverage industry.

Keywords: Phytocompounds; *Lactobacillus fermentum*; *Leuconostoc mesenteroides*; secondary metabolites.

4.1. Introdução

A fermentação alcoólica é um processo biotecnológico fundamental na produção de biocombustíveis, bebidas alcoólicas e diversos produtos industriais. Nesse processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* converte os açúcares presentes no mosto em etanol e dióxido de carbono (Cruz 2019). Entretanto, a eficiência desse processo pode ser comprometida por contaminações microbianas, especialmente por bactérias ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Esses microrganismos competem com as leveduras por nutrientes essenciais e produzem compostos indesejáveis, como ácidos orgânicos e gomas, que reduzem a viabilidade das leveduras e afetam diretamente o rendimento do processo (Messetti *et al.*, 2024).

Para controlar essas contaminações bacterianas, a indústria tradicionalmente utiliza antimicrobianos sintéticos, como penicilina, eritromicina e virginiamicina. No entanto, o uso desses compostos apresenta desvantagens significativas, incluindo alto custo, risco de desenvolvimento de resistência microbiana e a possibilidade de resíduos no produto final (Menezes *et al.*, 2021). Diante disso, a busca por alternativas naturais tem se intensificado. Produtos como própolis e lúpulo têm demonstrado eficácia no controle microbiano durante a fermentação alcoólica, oferecendo vantagens como a redução dos efeitos adversos associados aos compostos sintéticos e minimizando o risco de resistência bacteriana (Caetano e Madaleno 2011; Viégas, 2011).

Nesse contexto, a exploração de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas (biocidas), surge como uma estratégia promissora. A planta *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como Neem, destaca-se por sua composição rica em limonoides, terpenoides, flavonoides e taninos, classes de compostos que possuem diversificadas atividades biológicas, como antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas e anti-inflamatórias comprovadas (Guedes *et al.*, 2022; Mulyani *et al.*, 2023; Rana *et al.*, 2023). Embora essas propriedades sejam amplamente reconhecidas, sua aplicação específica no controle de contaminantes durante a fermentação alcoólica ainda não é explorada.

Para aumentar a eficácia dos extratos vegetais, o uso de técnicas de fracionamento ou semi-purificação são empregadas para o isolamento de compostos bioativos específicos. O fracionamento explora as propriedades físico-químicas dos componentes presentes no extrato bruto, como polaridade, solubilidade e peso molecular, promovendo a separação de moléculas com maior potencial biológico (Sasidharan *et al.*, 2011). Dentre as metodologias empregadas,

a extração líquido-líquido destaca-se pela sua eficiência, sendo amplamente utilizada devido à possibilidade de seleção criteriosa de solventes com polaridades variadas, como hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, o que facilita a separação seletiva dos compostos de interesse (Soares *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2021). Essa estratégia permite a obtenção de frações enriquecidas em compostos bioativos, otimizando a atividade antimicrobiana, uma vez que diferentes classes de metabólitos secundários apresentam modos de ação específicos e variados contra microrganismos (Cushnie; Lamb, 2011). No contexto da fermentação etanólica, o uso de frações específicas pode ampliar a seletividade do tratamento antimicrobiano, favorecendo a viabilidade do processo fermentativo.

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antimicrobiana e a composição fitoquímica dos extratos brutos e fracionados das folhas e cascas do Neem (*Azadirachta indica*), avaliando seu potencial contra as bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, contaminantes da fermentação etanólica, e correlacionando as classes de metabólitos secundários identificadas com os resultados observados.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta e preparação de material vegetal

As folhas e cascas do tronco da árvore Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) foram coletadas em área urbana do município de Frutal, Minas Gerais, Brasil, no mês de agosto de 2024. A identificação do material vegetal foi realizada por comparação com amostra depositada no Herbário/BHCB do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O material coletado foi submetido a um processo de higienização, seguido de secagem em estufa a 45 °C por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram trituradas em moinho de facas (Willey SL-31) até atingir a granulometria de pó e armazenadas protegidas da luz e umidade.

4.2.2. Obtenção dos extratos brutos e fracionados

Porções de 100 g das folhas e cascas secas e trituradas foram submetidas a maceração dinâmica com 400 mL de etanol absoluto P.A, por 48 horas (10 horas diárias) com temperatura de 23°C, em incubadora Shaker. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel qualitativo, e o solvente evaporado até a secura sob pressão reduzida. Os resíduos secos foram congelados em ultrafreezer e liofilizados.

Para o fracionamento, os extratos secos foram solubilizados em 100 mL de água

destilada e submetidos a banho ultrassônico a 40ºC, para completa solubilização. Em seguida, realizou-se o processo de partição líquido-líquido, empregando solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila) em três etapas consecutivas (3 x 100 mL) (Abrantes, 2017). As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida, congeladas em ultrafreezer e liofilizadas. Os produtos finais foram armazenados ao abrigo da luz, sob temperatura de 5 ºC, até o momento das análises subsequentes.

Os extratos etanólicos das folhas e suas frações foram denominados: FEt (Folha extrato etanólico bruto), FFH (Folha fração hexano), FFD (Folha fração diclorometano), FFA (Folha fração acetato de etila) e FFAq (Folha fração aquosa). Para os extratos das cascas, as denominações adotadas foram: CEt (Casca extrato etanólico bruto), CFH (Casca fração hexano), CFD (Casca fração diclorometano), CFA (Casca fração acetato de etila) e CFAq (Casca fração aquosa). Os extratos brutos e suas respectivas frações foram pesados para a determinação do rendimento final, conforme descrito na Equação 1.

Equação 1:

$$R_e = (P_{ext} / P_{mat}) \times 100$$

Sendo:

R_e : rendimento do extrato (%);

P_{ext} : massa do extrato seco (g)

P_{mat} : massado material vegetal seco (g).

4.2.3. Caracterização por Cromatografia em Camada delgada

A prospecção fitoquímica foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme metodologia descrita por Wagner e Bladt (1996). Foram utilizadas cromatoplacas pré-fabricadas de sílica gel F254 sobre suporte de alumínio (Merck) e uma cuba de saturação com migração ascendente.

Os extratos brutos e fracionados obtidos foram preparados na concentração de 50 mg/mL, utilizando os respectivos solventes empregados no processo de extração líquido-líquido: hexano, diclorometano, acetato de etila e água destilada. As soluções resultantes foram aplicadas em placas cromatográficas de dimensões 3,5 x 6 cm². A Tabela 1 apresenta os metabólitos identificados, os sistemas de eluentes e os agentes reveladores utilizados na identificação.

Tabela 1 – Sistemas de Eluentes e Agentes Reveladores para Identificação de Metabólitos Secundários na Cromatografia em Camada Delgada dos Extratos Brutos e Fracionados de Neem.

Metabólitos	Eluentes (mL)	Reveladores	Observações	Método de Referência
Terpenos	hexano/acetato de etila (8:2)	Anisaldeído sulfúrico	Coloração roxa	Alexandre e Rocha (2017)
Esteroides	hexano/acetato de etila (8:2)	Libermann- Burchard	Coloração azul esverdeada, fluorescências do alaranjado ao vermelho – luz UV 365 nm	Lucas Filho (2009) Sousa (2020)
Taninos hidrolisáveis	acetato de etila /metanol (9,7:0,3)	Cloreto férrico 1%	Coloração negro-azuladas	Silva et al. (2004)
Taninos condensados			Coloração verde	
Flavonoides	clorofórmio/ metanol (9:1)	NP (Aminoetil difenilborinato) + PEG (polietilenoglicol 4000)	Fluorescência laranja (luz visível) amarelo esverdeado (luz UV 365 nm)	Lage (2011)
Fenóis			Fluorescência azulada- luz UV 365 nm	Ataides (2016)

4.2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As cepas *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum*, obtidas de centros comerciais especializados, foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 32 °C e 35 °C, respectivamente, até atingirem a concentração de 1×10^6 UFC/mL. Na sequência, essas foram distribuídas em microplacas de 96 poços estéril. Após preparação das diluições, foram adicionados 5 µL de suspensão bacteriana a cada poço, resultando em um volume final de 200 µL por cavidade (150 µL de BHI, 45 µL de extrato ou fração, e 5 µL de inóculo microbiano). As placas foram incubadas por 24 horas, a 32 °C para *L. mesenteroides* e a 35 °C para *L. fermentum*. Em seguida, absorbância das amostras foram medidas a 700 nm em leitor de microplacas (Multiskan SkyHigh).

Ao processo, foram incluídos controles positivos (BHI e suspensão bacteriana), controles negativos (BHI e compostos testados sem bactérias) e controles de solvente (BHI, DMSO e suspensão bacteriana). A ampicilina (4 mg/mL) foi utilizada como antimicrobiano padrão para comparação.

O crescimento bacteriano foi indicado pela turvação do meio, enquanto a ausência de alterações visuais confirmou a inibição do crescimento microbiano. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de impedir o crescimento visível das bactérias. Os extratos foram testados nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 mg/mL. Para os extratos que apresentaram atividade inibitória na concentração de 10 mg/mL, foram avaliadas concentrações inferiores (5, 3, 1 e 0,5 mg/mL).

4.2.5. Análise estatística

As avaliações antimicrobianas foram realizadas em triplicata. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o teste F, e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises estatísticas foram processadas por meio dos softwares AgroEstat e Minitab (versão 17.1.0).

4.3. Resultados

4.3.1. Rendimento dos extratos

A análise dos rendimentos revelou que os extratos brutos das folhas (FEt, 4,59 g) e das cascas (CEt; 4,70 g) do Neem, obtidos por maceração com etanol absoluto, tiveram eficiência semelhante, sem diferenças significativas. Contudo, ao analisar as frações desses extratos, notaram-se variações consideráveis nas massas obtidas, indicando diferenças na composição química entre as matrizes.

As frações aquosas apresentaram o maior rendimento em massa entre os extratos obtidos, evidenciando uma maior extração de compostos hidrofílicos. Nas folhas, a fração FFAq atingiu 46,88% (2,20 g), enquanto nas cascas, a CFAq alcançou 79,20% (3,64 g). Em contrapartida, as frações de menor rendimento foram observadas com o uso dos solventes: o acetato de etila (FFA: 8,25%, 0,39 g) nas folhas, bem como diclorometano (CFD: 0,61%, 0,03 g) e hexano (CFH: 1,36%, 0,06 g) nas cascas.

Tabela 2 – Massa e Rendimentos dos Extratos Brutos e das Frações Obtidas das Folhas e Cascas de Neem.

<i>Extrato bruto e fracionamento das folhas</i>			<i>Extrato bruto e fracionamento das Cascas</i>		
Produtos	Massa (g)	Rendimento (%)	Produtos	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>FEt</i>	4,70	100,00	<i>CEt</i>	4,59	100,00
<i>FFH</i>	1,21	25,70	<i>CFH</i>	0,06	1,36
<i>FFD</i>	0,72	15,36	<i>CFD</i>	0,03	0,61
<i>FFA</i>	0,39	8,25	<i>CFA</i>	0,46	9,97
<i>FFAq</i>	2,20	46,88	<i>CFAq</i>	3,64	79,20

Fonte: os autores (2025).

4.3.2. Avaliação fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise fitoquímica dos extratos revelou diferenças na composição terpênica nas folhas e cascas do Neem. Extratos das folhas (FEt, FFH, FFD, FFA e FFAq) apresentaram sinais com intensa coloração roxa, característica da presença significativa de compostos terpênicos (Figura 1A). Nas cascas, os extratos CEt, CFH, CFD e CFA exibiram coloração semelhante, porém menos intensa, indicando uma menor concentração desses metabólitos. Já na fração aquosa das cascas (CFAq), não foram observados sinais desses constituintes (Figura 1B).

As manchas amareladas, indicativas da presença de terpenoides, foram observadas nos extratos das cascas após reação com a solução de Libermann-Burchard (Figura 2C). Sob luz ultravioleta, esses extratos exibiram fluorescência característica (Figura 2D), exceto o extrato CFAq, que não demonstrou a presença desses compostos.

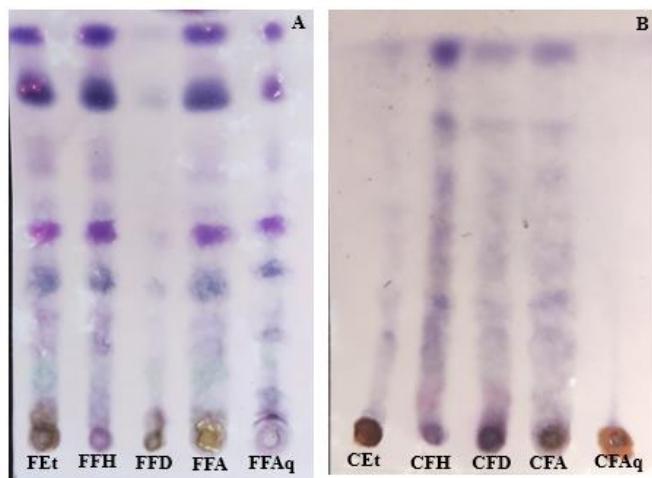


Figura 1 – Identificação de terpenos por CCD: A) Extrato bruto (FET) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); B) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: Hexano/acetato de etila (8:2); Reveladores: Anisaldeído sulfúrico e aquecimento. Fonte: os autores (2025).

A presença de esteroides foi observada em FET, FFH, FFD, FFA e FFAq, por meio de manchas azul-esverdeadas sob luz visível (Figura 2A) e vermelhas sob luz UV a 365 nm (Figura 2B) (Sousa, 2020; Lucas Filho, 2009). Nos extratos das cascas e suas frações não foram identificados esteroides (Figuras 2C e 2D), indicando ausência ou concentração muito baixa desses metabólitos, não detectável pela metodologia utilizada.

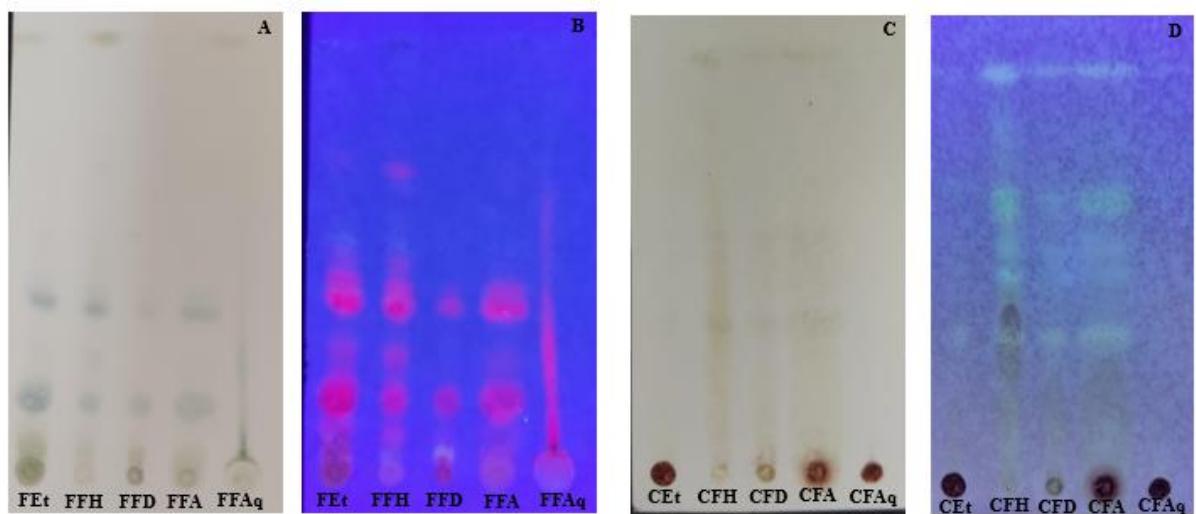


Figura 2 – Identificação de esteroides por CCD: A) e B) Extrato bruto (FET) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); C e D) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: hexano/acetato de etila (8:2). Reveladores: A) e C) Libermann-Burchard – luz Visível; (B e D) Libermann-Burchard – luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2025).

Os resultados de taninos evidenciaram que o FEt, FFH, FFA, FFAq e CFH, CFD, CFA apresentaram manchas de coloração verde, indicando a presença de taninos condensados, bem como a presença de taninos hidrolisáveis em FEt, CEt, CFH, CFD, CFA e CFAq através da presença de manchas negro-azuladas (Figura 3) (Silva *et al.*, 2004).

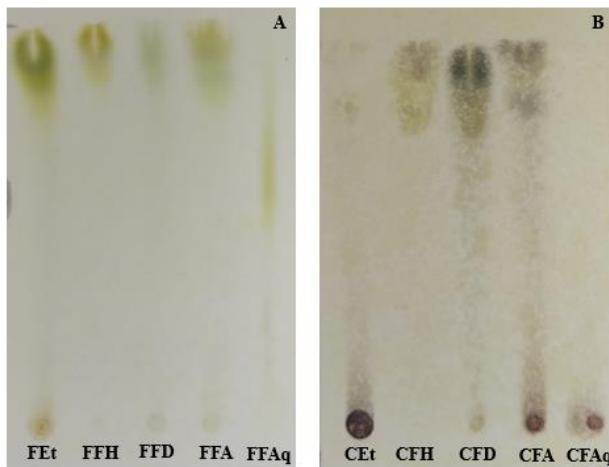


Figura 3 – Identificação de Taninos por CCD: A) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq); B) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: Hexano/acetato de etila (8:2); Fase móvel: Acetato de etila/metanol (9,7:0,3). Revelador: Cloreto férreo 1%. Fonte: os autores (2025).

Os flavonoides foram identificados em todas as amostras das folhas (FEt, FFH, FFD, FDA e FFAq) por meio da revelação de manchas amarelas visíveis (Figura 4A), e enquanto nas cascas foi observada a pequena presença na CFH e CFD desses compostos (Figura 4C). Além disso, a fluorescência azulada observada nas amostras sob luz UV (Figura 4B e 4D), indicativa de compostos fenólicos (Ataides, 2016; Kulasari *et al.*, 2019), esteve presente tanto nas folhas quanto nas cascas, com exceção das frações aquosas.

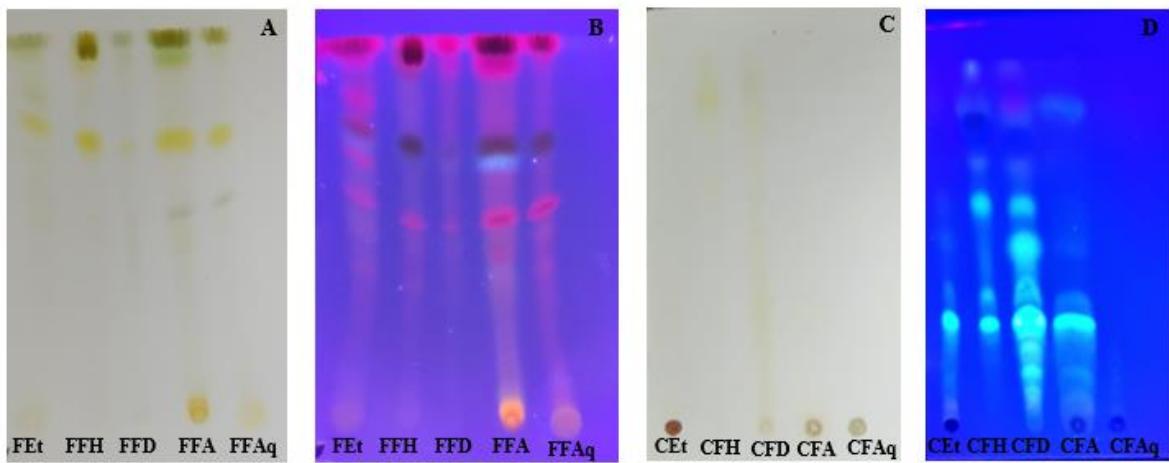


Figura 4 – Identificação de Flavonoides e fenólicos por CCD: A) e B) Extrato bruto (FEt) e fracionados das folhas (FFH, FFD, FFA e FFAq). C) e D) Extrato bruto (CEt) e fracionado das cascas (CFH, CFD, CFA e CFAq). Fase móvel: clorofórmio/metanol (9:1), Reveladores: A) e C) : NP+Peg – luz visível; B) e D): NP+Peg – luz UV 365 nm. Fonte: os autores (2025).

4.3.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Considerando as avaliações contra *L. fermentum* (Figura 5A), observou-se que o FEt iniciou inibição na menor concentração testada (0,5 mg/mL), atingindo 100% de ação a partir de 1 mg/mL. A FFH e FFA somente apresentaram ação antimicrobiana a partir de 10 mg/mL. Para FFAq a inibição de *L. fermentum* foi verificada a partir de 30 mg/mL, com potencial máximo atingido aos 100 mg/mL.

Nas avaliações contra a bactéria *L. mesenteroides* (Figura 5B), o FEt apresentou 33% de inibição na concentração de 10 mg/mL, alcançando 100% de inibição nas concentrações superiores. A FFH demonstrou alta eficácia, inibindo 90% do crescimento bacteriano na menor dose testada e 100% nas concentrações superiores a 30 mg/mL. A fração FFD mostrou inibição mínima de 85% na dose de 5 mg/mL. A fração FFA atingiu 100% de inibição apenas a partir de 50 mg/mL. A fração FFAq apresentou atividade antimicrobiana completa (100%) já na concentração de 10 mg/mL.

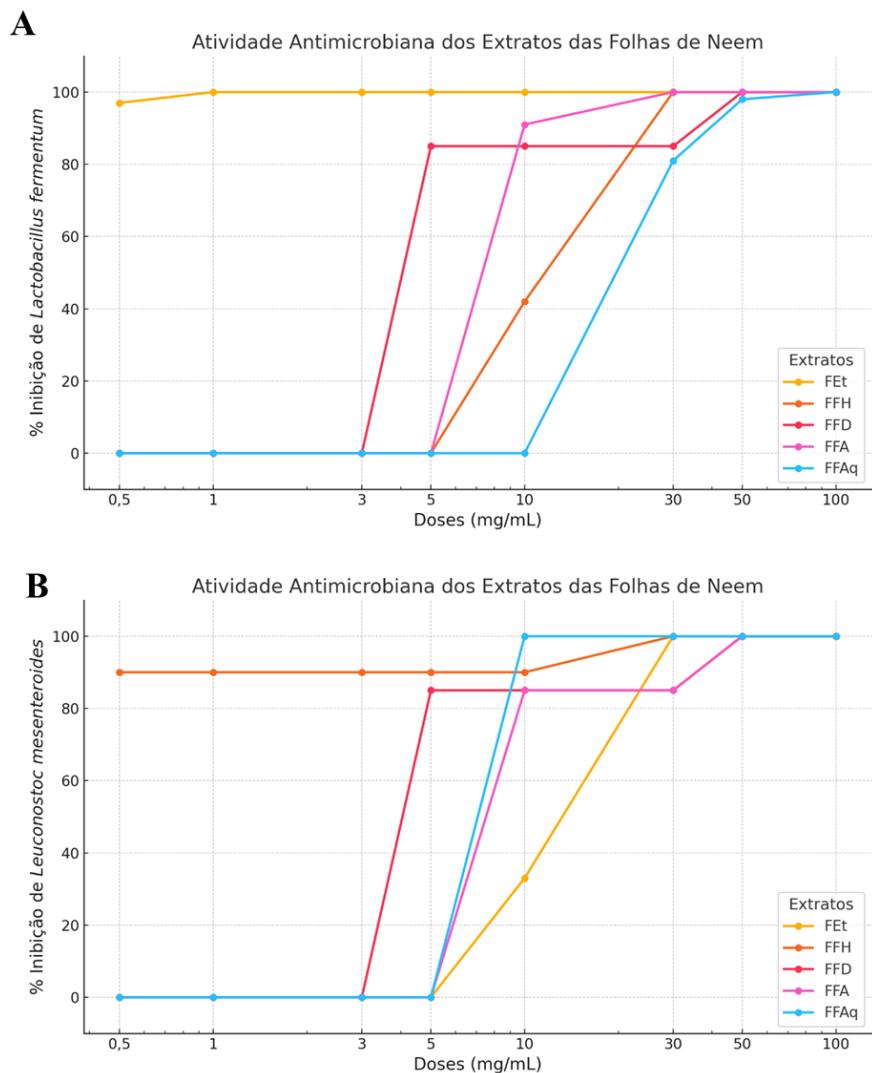


Figura 5 – Inibição do crescimento de *L. fermentum* (A) e *L. mesenteroides* (B) diferentes concentrações de FEt, FFH, FFD, FFA e FFAq. Fonte: os autores (2025).

As avaliações de CEt e CFAq contra *L. fermentum*, (Figura 6A) demonstraram inibição de 100% em todas as concentrações avaliadas, no entanto na fração CFA a ação antimicrobiana ocorreu a partir de 30 mg/mL. Contra *L. mesenteroide* somente CEt inibiu 100 % em todas as doses testadas, a CFA inibiu 53 % em 50 mg/mL e 100 % na dose 100 mg/mL. A CFAq obteve 100% de inibição somente na concentração de 100 mg/mL (Figura 6B). Ressalta-se que as frações CFH e CFD não foram avaliadas devido a baixa massa de compostos obtidos, o que inviabilizaram os testes.

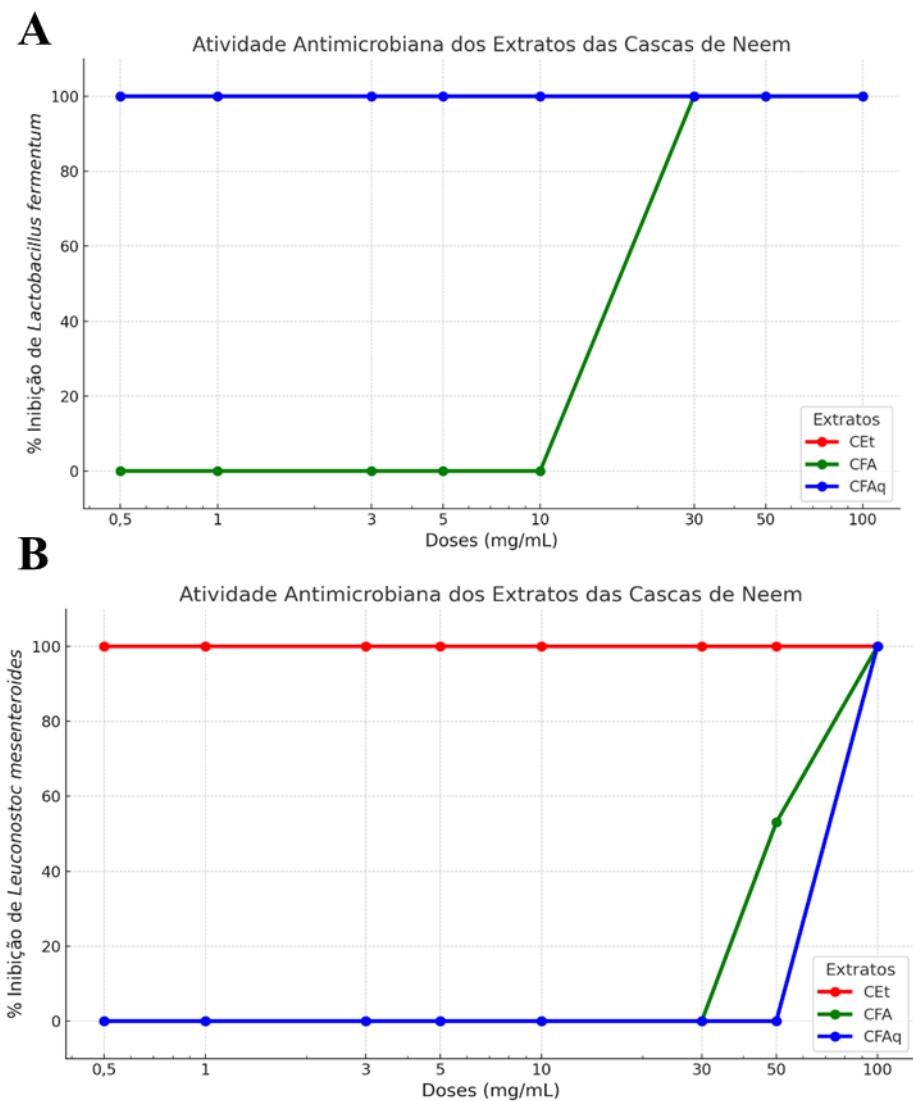


Figura 6 – Inibição do crescimento de *L. Fermentum* (A) e *L. Mesenteroides* (B) com diferentes concentrações de CEt, CFA e CFAq. Fonte: os autores (2025).

4.4. Discussão

A correlação entre os compostos fitoquímicos identificados nos extratos brutos e fracionados e a atividade antimicrobiana contra *L. fermentum* e *L. mesenteroides* revela a influência da composição química na atividade biológica (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil Fitoquímico e Eficácia Antimicrobiana dos Extratos brutos e Fracionados de folhas e cascas de *A.indica* frente a *L. fermentum* e *L. mesenteroides*

Extrato/Fração	Composição Fitoquímica (CCD)	CIM	
		<i>L. fermentum</i>	<i>L. mesenteroides</i>
FEt	Terpenoides, Esteroides,		
	Flavonoides, Taninos condensados e hidrolisáveis,	97% (0,5 mg/mL); 100% \geq 1 mg/mL	33% (10 mg/mL); 100% \geq 30 mg/mL
	Compostos Fenólicos		
FFH	Terpenoides, Esteroides,		90% (0,5mg/mL);
	Flavonoides e Taninos condensados	42% (10 mg/mL); 100% \geq 30 mg/mL	100% \geq 30 mg/mL
FFD	Terpenos, Esteroides,		85% (5 mg/mL);
	Flavonoides e Taninos condensados	100% \geq 50 mg/mL	100% \geq 50 mg/ml
FFA	Terpenoides, Esteroides,		85% (10 mg/mL);
	Flavonoides, Taninos condensados e Compostos	91% (10 mg/mL); 100% \geq 30 mg/mL	100 % \geq 50 mg/mL
	Fenólicos		
FFAq	Terpenos, Esteroides,		
	Flavonoides e Taninos condensados	81% (30 mg/mL); 100% \geq 100 mg/mL	100% \geq 10 mg/mL
CEt	Terpenos, Taninos hidrolisáveis e Compostos		100% \geq 0,5 mg/mL
	Fenólicos		100% \geq 0,5 mg/mL
CFH*	Terpenoides, Flavonoides, Taninos Condensados e hidrolisáveis, Compostos	---	---
	Fenólicos		
CFD*	Terpenoides, Flavonoides,	---	---

Taninos condensados e Hidrolisáveis, Compostos Fenólicos		
	Terpenoides, Taninos	53% (50 mg/mL)
CFA	condensados e Hidrolisáveis, 100% \geq 30 mg/mL	100% \geq 100 mg/mL
CFAq	Taninos hidrolisáveis 100% \geq 0,5 mg/mL	100% \geq 100 mg/mL

* Não foram analisados devido à quantidade insuficiente de amostra para os testes. Fonte: os autores (2025).

Os terpenoides, amplamente distribuídos em FEt, FFH, FFA, FFD, CEt, CFH, CFD e CFA, se destacaram pela sua ação antimicrobiana. Em especial, FFH, FFA e CFH apresentaram maior concentração desses compostos, sugerindo uma interação favorável com membranas bacterianas, promovendo sua desestabilização. Estudos prévios indicam que limonoides como azadiractina, nimbina, nimbidina, nimbolida e gedunina são os principais responsáveis por essa atividade (Kharwar *et al.*, 2020). A afinidade desses compostos por solventes apolares, como hexano e acetato de etila, reforça sua capacidade de interferência na integridade das células bacterianas (Wojtunik-Kulesza, 2020).

A presença de flavonoides em todas as frações/extrato bruto e compostos fenólicos no extrato bruto (FEt) e na fração acetato e etila (FFA) de folhas reforça o potencial antibacteriano dessas amostras. Flavonoides como rutina e queracetina já foram descritos por sua ação antimicrobiana e antioxidante, atuando na inibição de enzimas essenciais ao metabolismo bacteriano (Ataides, 2016; Kulasari *et al.*, 2019). A extração eficiente desses compostos com acetato de etila está de acordo com estudos anteriores sobre seletividade de solventes na obtenção de metabólitos bioativos (Soares *et al.*, 2016).

Os taninos, tanto condensados quanto hidrolisáveis, demonstraram impacto significativo na atividade antimicrobiana observada. As frações FEt, FFH, FFD, FFA, FFAq e CFH, CFD, CFA foram ricas em taninos condensados, e em taninos hidrolisáveis FEt, CET, CFH, CFD, CFA e CFAq. Essa distinção é relevante, pois os taninos possuem mecanismos distintos de ação antimicrobiana: enquanto os condensados atuam na precipitação de proteínas

da parede celular bacteriana, os hidrolisáveis interagem com enzimas metabólicas, impedindo o crescimento microbiano (Menezes *et al.*, 2021). Além disso, a presença de esteroides nos extratos das folhas (FEt, FFH, FFD, FFA e FFAq) pode ter potencializado a ação dos outros compostos devido à sua interação com membranas lipídicas.

Os ensaios de CIM revelaram que tanto os extratos brutos quanto as frações apresentaram atividade antimicrobiana significativa para ambos microrganismos. As frações FEt e FFD exibiram efeito bactericida contra *L. fermentum*, nas dosagens mais baixas (1,0 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente), enquanto nas cascas, CEt e CFAq demonstraram atividade bactericida na concentração de 0,5 mg/mL, indicando que diferentes classes de compostos identificados nas matrizes, como terpenoides, esteroides, flavonoides, taninos e compostos fenólicos nas folhas e taninos nas cascas podem desempenhar papéis importantes na ação na ação antimicrobiana.

Para *L. mesenteroides*, os produtos FFH, FFD, FFA, FFAq e CFA apresentaram efeito bactericida nas menores dosagens, evidenciando que para o extrato das folhas as frações a partir do hexano e acetato de etila, ricas em terpenoides, esteroides, flavonoides e taninos condensados, contribuíram com maior efetividade na atividade antimicrobiana. Para as cascas a fração CFA, foi a que apresentou efeito bactericida na maior dose avaliada (100 mg/mL), entretanto a CEt apresentou atividade bactericida em todas as doses testadas, evidenciando que outras classes de compostos, podem ter atuado na ação, como terpenoides, flavonoides, taninos e fenólicos, presentes no extrato bruto. Como as frações a partir de diclorometano e acetato de etila não foram avaliadas separadamente, não foi possível revelar qual a ação efetiva desses compostos na atividade antimicrobiana.

Observou-se que os taninos estão presentes em todas as amostras, sendo eles condensados ou hidrolisáveis. Entretanto, o extrato bruto e fracionado das cascas, apresentaram um maior teor desses compostos, observados pela CCD. Maia (2021) relatou que o teor de taninos na casca da *A. indica* é comparável ao de espécies conhecidas por sua elevada produção desses compostos, como *Mimosa tenuiflora*, o que reforça seu potencial antimicrobiano. Esse efeito foi corroborado por Singaravelu *et al.* (2019), que observaram atividade bactericida em extratos das cascas do Neem contra bactérias.

A resistência diferencial entre *L. fermentum* e *L. mesenteroides* pode ser atribuída às suas diferenças estruturais. A bactéria *L. fermentum*, que apresenta uma parede celular menos espessa e mais permeável, foi mais suscetível aos compostos bioativos, enquanto *L.*

mesenteroides, com uma estrutura mais robusta, exigiu concentrações mais elevadas para inibição total (Freire *et al.*, 2021). Esse fenômeno está alinhado com a literatura, que destaca a maior resistência das bactérias com paredes celulares espessas aos compostos antimicrobianos naturais (Dimic, 2006).

Outro fator relevante para a ação antimicrobiana dos extratos e frações avaliadas é a possível presença de hidrocarbonetos bioativos no FEt e FFH. Estudos de Menezes *et al.* (2018) demonstraram que o óleo essencial das folhas de Neem contém 1,3-dimetilbenzeno e etilbenzeno, compostos que apresentam ação antimicrobiana ao interagir com a bicamada lipídica das bactérias (Guedes *et al.*, 2022). Esses componentes podem ter sido extraídos pelos métodos empregados neste estudo, já que o extrato bruto das folhas (FEt) e a fração hexânica (FFH) apresentaram características resinosas, indicando possivelmente a presença dos hidrocarbonetos determinado pelos autores.

Diante do exposto, a sinergia entre os metabólitos secundários evidencia a eficácia antimicrobiana dos extratos e frações avaliados do Neem. Os terpenoides e esteroides, por sua natureza lipofílica, podem promover a ruptura da membrana celular bacteriana, enquanto os taninos, flavonoides e compostos fenólicos, aumentar a permeabilidade celular, causando deformação, ruptura e vazamento citoplasmático (Álvarez-Martínez *et al.*, 2021; Mahizan *et al.*, 2019). Essa combinação de mecanismos sugerem a potencialização da ação dos extratos, justificando os percentuais de inibição observados.

Os resultados reforçam o potencial do Neem como uma fonte valiosa de compostos bioativos, com aplicações promissoras na indústria de bebidas fermentadas/destiladas. Esses produtos oferecem uma alternativa sustentável aos antimicrobianos convencionais, reforçando a importância da escolha de solventes adequados para maximizar a extração e a eficácia dos metabólitos desejados. A abordagem seletiva na extração pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de produtos mais eficazes e ambientalmente amigáveis.

4.5 Conclusão

O extrato de casca de Neem demonstra alta eficácia contra *L. fermentum* e *L. mesenteroides*, com uma dose a partir de 0,5 mg/mL. Neste caso, o fracionamento não aumenta a eficácia do extrato, sendo os taninos a principal classe responsável pelo efeito antimicrobiano. O extrato de folhas de Neem apresenta uma ação diferenciada para cada microrganismo. O fracionamento com hexano, ao possibilitar a extração de compostos adicionais, como

hidrocarbonetos, intensifica a atividade antimicrobiana contra *L. mesenteroides*, com uma dose eficaz de 0,5 mg/mL. Em contrapartida, para *L. fermentum*, o extrato bruto demonstra inibição completa a 1,0 mg/mL, possivelmente devido à sinergia entre os metabólitos presentes.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. A. **Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de *Eugenia florida* DC.** 2017. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27486>. Acesso em: 10 abr. 2024.
- ALEXANDRE, A. S.; ROCHA, W. C. Perfil cromatográfico por TLC do óleo e dos extratos das folhas e caule de andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. **Scientia Amazônia**, v. 6, n. 2, p. 117-125. Disponível em: <https://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2017/01/v6-n2-117-125-2017.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2025.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJON-CATALAN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial activity of plant-origin compounds against multidrug-resistant bacteria. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711321001690>. Acesso em: 15 fev. 2025.
- ATAIDES, A. C. C. **Caracterização fitoquímica e avaliação acaricida de extratos vegetais.** 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) — Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, setembro de 2015. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/3>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Control of bacterial contaminants in CAETANO, AC; MADALENO, LL, Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011. Disponível em: <https://publicacoes.fatecjaboticabal.edu.br/citec/article/view/63>. Acesso em: 10 fev. 2025.
- CHASSAGNE, F.; HUANG, X.; LYLES, J. T.; QUAVE, C. L. Validation of a 16th century traditional Chinese medicine use of Ginkgo biloba as a topical antimicrobial. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 444865, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00775/full>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24567>. Acesso em: 24 fev. 2025.
- DIMIĆ, G. R. Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. **Acta Periodica Technologica**, v. 37, p. 3-11, 2006. Disponível em: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=1450-71880637003D>. Acesso em: 26 jan. 2025.
- GUEDES, E. M.; MENDONÇA, C. M. S. D.; NUNES, L. E.; ARAÚJO, Í. D. R. D. Antimicrobial activity of the plant *Azadirachta indica* (Indian neem) – an integrative review. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 17, p. 2615–2636, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.48017/dj.v7i4.2350>. Acesso em: 13 maio 2024.

FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T.; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M. dos. Lactic acid bacteria: their characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e513101119964, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19964>. Acesso em: 28 jan. 2025.

KHARWAR, R.; SHARMA, V.; MISHRA, A.; KUMAR, J.; SINGH, D.; VERMA, S.; GOND, S.; KUMAR, A.; KAUSHIK, N.; REVURU, B.; KUSARI, S. Harnessing the phytotherapeutic treasure troves of the ancient medicinal plant *Azadirachta indica* (Neem) and associated endophytic microorganisms. **Planta Med**, v. 86, p. 906-940, 2020. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1107-9370>. Acesso em: 01 fev 2025.

KUSARI, S.; SINGH, M. F.; BHANDARI, S. Polyphenols: phytochemistry and health benefits. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, p. 3344-3358, 2019. Disponível em: <https://www.phytojournal.com/archives/2019.v8.i4.9468/polyphenols-phytochemistry-and-health-benefits>. Acesso em: 03 fev. 2025.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários em folhas de *Annona crassiflora Mart.*** 2011. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SFSA-8R2NVM>. Acesso em: 05 fev. 2025.

LUCAS FILHO, M. D. **Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* com potencial atividade vasodilatadora e inibição da enzima conversora de angiotensina.** 2009. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Ouro Preto, Minas Gerais, 2009. Disponível em: <https://www.repositorio.ufop.br/items/b797d2a8-bf7c-416b-a01a-b96a103cd8b0>. Acesso em: 07 fev. 2025.

MAHIZAN, N. A.; YANG, S. K.; MOO, C. L.; SONG, A. A. L.; CHONG, C. M.; CHONG, C.W.; LAI, K. S. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 2631, 2019. doi: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/14/2631>. Acesso em: 09 fev 2025.

MAIA, D. R. **Extrato a base de taninos da casca da *Azadirachta indica A Juss.* e seu potencial antioxidante e antibacteriano.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal), Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/38286>. Acesso em: 11 fev 2025.

MENEZES, R. M. D. S.; LIMA, J. R. D.; SANTOS, D. D. S.; SANTOS, J. C. D.; VIANA, A. C. Extração, caracterização, prospecção por CG-EM e efeito bactericida do óleo essencial de NIM (*Azadirachta indica*). **Research, Society and Development**, v. 10, n.15, p. e507101523154, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/23154>. Acesso em: 18 fev. 2025.

MESSETTI, M. A.; DOS SANTOS, A. M.; DE ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Study of a *Ricinus communis L.* (castor oil) derivative as a biocidal agent

and viscosity reducer on *Leuconostoc mesenteroides* in the sugar and alcohol industries. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 5, p. 301-308, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-1657201000200301&tlang=pt. Acesso em: 15 jan. 2025.

MULYANI, Y.; SINAGA, S.; SUPRATMAN, U. Phytochemistry and biological activities of endophytic fungi from the *Meliaceae* family. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 778-805, 2023. Acesso em: 20 abr. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/778>. Acesso em: 13 fev. 2025.

RANA, A.; KUMARI, A.; CHAUDHARY, A.K.; SRIVASTAVA, R.; KAMIL, D.; VASHISHTHA, P.; SHARMA, S.N. An investigation of antimicrobial activity for plant pathogens by green-synthesized silver nanoparticles using *Azadirachta indica* and *Mangifera indica*. **Physchem**, v. 3, n. 1, p. 125–146, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-7167/3/1/10>. Acesso em: 25 fev. 2025.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDARAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483>. Acesso em: 30 jan. 2025.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000500005&tlang=pt&tlang=pt. Acesso em: 28 fev. 2025.

SINGARAVELU, S.; SANKARAPILLAI, J.; CHANDRAKUMARI, A.S.; SINHA, P. Effect of *Azadirachta indica* crude bark extracts concentrations against Gram-positive and Gram-negative bacterial pathogens. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 11, n. 2, p. 33-37, 2019. Disponível em: https://journals.lww.com/10.4103/JPBS.JPBS_150_18. Acesso em: 04 fev. 2025.

SOARES, N.; SANTOS, P.; VIEIRA, V.; PIMENTA, V.; ARAÚJO, E. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 4, p. 991-1010, 2016. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2016b/agrarias/Tecnica%20de%20prospeccao.pdf>. Acesso em: 06 fev. 2025.

SOUSA, J. A. C. **Fitoquímica, citotoxicidade e atividade anti-Zika vírus in vitro de extratos etanólicos de espécies da família Rutaceae**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/12965>. Acesso em: 08 fev. 2025.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/D.11.2011.tde-02082011-093349>. Acesso em: 10 fev. 2025.

VON ZUBEN, G.; DE SOUZA, E. O. Identificação de flavonóides em extrato vegetal de *Passiflora Incarnata Linnaeus* usando cromatografia em camada delgada (TLC). **Revista Eletrônica FACP**, v. 22, n. 3, p. 9-29, 2022. Disponível em: <https://revistaunifacp.com.br/revista/index.php/reFACP/article/view/96>. Acesso em: 12 fev. 2025.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** Springer Verlag, Berlin, 320p, 1996.

WEN, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; DZAH, C.S.; ZANDILE, M.; DUAN, Y.; MA, H. Advances in ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, n. 1, p. 538–549, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417718307405>. Acesso em: 15 fev. 2025.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A. Approach to optimization of frap methodology for studies based on selected monoterpenes. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 5267, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/22/5267>. Acesso em: 20 fev. 2025.

CAPITULO 5 – EXTRATOS DE *Azadirachta indica* COMO AGENTE ANTIMICROBIANO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Resumo

O etanol é um biocombustível renovável obtido pela fermentação de soluções açucaradas, com a cana-de-açúcar sendo a principal matéria-prima na América Latina e Ásia. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação, mas sua viabilidade é afetada por fatores ambientais e contaminantes, como bactérias láticas. Para mitigar contaminações, indústrias utilizam antimicrobianos sintéticos, que podem causar resistência bacteriana e impactos ambientais. Alternativas naturais, como os extratos vegetais, têm propriedades antimicrobianas eficazes sem induzir resistência. O presente estudo avaliou a ação antimicrobiana de extratos de *Azadirachta indica* na fermentação alcoólica por nove ciclos, comparando-os com o controle sem antimicrobianos. O caldo de cana foi preparado, fermentado com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em Erlenmeyer, e monitorado o Brix. A levedura foi tratada com solução salina/antimicrobiano, o vinho analisado, e as bactérias contaminantes foram quantificadas. Os dados foram analisados estatisticamente. Os resultados indicaram que a viabilidade celular foi superior a 89% em todos os tratamentos. A aplicação de antimicrobianos e os ciclos fermentativos influenciaram o índice de brotamentos e a viabilidade de brotos. O extrato de casca de Neem promoveu maior crescimento das leveduras e controle de bactérias contaminantes, enquanto as folhas resultaram em menores sobras de açúcar. O teor de glicerol diminuiu em todos os tratamentos, e o teor de etanol aumentou com os extratos de Neem. Conclui-se que o uso do extrato de casca de Neem na fermentação etanólica controla bactérias contaminantes ao longo dos ciclos de fermentação, bem como é promotor de crescimento da levedura e aumenta a produção de etanol por esse microrganismo.

Palavras-chaves: Bactérias contaminantes; Fermentação; Levedura; *Saccharomyces cerevisiae*.

Extracts of *Azadirachta indica* as an Antimicrobial Agent in the Ethanol Production Process

Abstract

Ethanol is a renewable biofuel obtained by the fermentation of sugar solutions, with sugarcane being the main raw material in Latin America and Asia. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main yeast responsible for fermentation, but its viability is affected by environmental factors and contaminants, such as lactic acid bacteria. To mitigate contamination, industries use synthetic antimicrobials, which can cause bacterial resistance and environmental impacts. Natural alternatives, such as plant extracts, have effective antimicrobial properties without inducing resistance. The study evaluated the antimicrobial action of *Azadirachta indica* extracts in alcoholic fermentation for nine cycles, comparing them with the control without antimicrobials. Sugarcane juice was prepared, fermented with *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in Erlenmeyer flasks, and Brix was monitored. The yeast was treated with saline/antimicrobial solution, the wine was analyzed, and the contaminating bacteria were quantified. The data were analyzed statistically. The results indicated that cell viability was higher than 89% in all treatments. The application of antimicrobials and the fermentation cycles influenced the sprouting index and shoot viability. Neem bark extract promoted greater yeast growth and control of contaminating bacteria, while the leaves resulted in lower sugar residues. The glycerol content decreased in all treatments, and the ethanol content increased with Neem extracts. It is concluded that the use of Neem bark extract in ethanolic fermentation controls contaminating bacteria throughout the fermentation cycles, as well as promoting yeast growth and increasing ethanol production by this microorganism.

Keywords: Contaminant bacteria; fermentation; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*;

5.1. Introdução

O etanol é um biocombustível derivado da fermentação alcoólica, considerado mundialmente como uma fonte renovável, que contribui para a redução das emissões de gases do efeito estufa, ajudando a atingir metas ambientais e promovendo a sustentabilidade (Liu *et al.*, 2023).

A obtenção de etanol ocorre a partir da fermentação de soluções açucaradas (mosto/substrato), sendo a cana-de-açúcar a principal matéria-prima utilizada em países da América Latina e da Ásia. A *Saccharomyces cerevisiae* é considerada a principal levedura responsável pela fermentação alcoólica industrial, devido sua elevada capacidade fermentativa, parâmetros fisiológicos e tolerância a altas concentrações de etanol (Cruz, 2019; Parapouli *et al.*, 2020). Contudo, sua viabilidade sofre influência direta de fatores ambientais, incluindo disponibilidade de nutrientes, mudanças de temperatura, pressão osmótica e a presença de microrganismos contaminantes (Chen *et al.*, 2022).

Os microrganismos contaminantes, como as bactérias láticas, são os principais interferentes do processo de fermentação alcoólica em indústrias que utilizam a cana-de-açúcar como matéria-prima. Isso ocorre, pois, essas indústrias realizam processo de fermentação por batelada, com reciclo das células da levedura, sem que ocorra a esterilização do substrato; favorecendo que microrganismos contaminantes se alojem no processo do início ao final da safra. Neste contexto, as bactérias consomem os açúcares disponíveis do meio e produzem metabólitos (gomas e ácidos orgânicos) que impactam negativamente a levedura, podendo resultar em floculação e morte celular das mesmas (Lopes *et al.*, 2016).

A fim de mitigar as contaminações na fermentação alcoólica, as indústrias sucroalcooleira utilizam antimicrobianos sintéticos como a penicilina, virginiamicina e monensina sódica (Ceccato-Antonini, 2018). Entretanto, o uso contínuo favorece a resistência bacteriana, inviabiliza o controle biológico a longo prazo e gera impactos ambientais adversos. Por isso, alternativas naturais tem sido utilizadas na fermentação etanólica como agentes antimicrobianos (Viégas, 2011; Oliveira filho, 2011; Caetano; Madaleno, 2011).

Os extratos vegetais são ricos em compostos bioativos, cujas propriedades antimicrobianas não induzem a resistência bacteriana (Álvarez-Martínez *et al.*, 2021). Dentre os compostos de origem vegetal, os derivados de *Azadirachta indica* apresentam relevância crescente devido à presença de limonoides, flavonoides e compostos fenólicos, que são capazes de inibir o crescimento por meio de múltiplos mecanismos de ação (Mulyani; Sinaga;

Supratman, 2023; Ninkuu *et al.*, 2021). Além do controle de contaminantes, é importante avaliar a ação desses compostos sobre a levedura. A presença dos extratos no meio fermentativo pode influenciar na viabilidade através de interferências nos processos metabólicos ou causando estímulos que auxiliam a mesma na produção de etanol.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *Azadirachta indica* no processo de fermentação alcoólica, ao longo de 9 ciclos fermentativos consecutivos.

5.2. Material e métodos

O experimento foi realizado no ano de 2024 no Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica, e no Laboratório de Sucroenergia da Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Frutal, Brasil.

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, com 3 repetições. Os tratamentos principais foram constituídos por 3 antimicrobianos: Testemunha (sem adição de antimicrobiano), Extrato de Folhas de Neem e Extrato de Cascas de Neem. Os tratamentos secundários foram compostos por 9 ciclos consecutivos de fermentação.

5.2.1. Preparo dos extratos de Neem (antimicrobianos)

As folhas e cascas de Neem (figura 1) foram coletadas no ano de 2024, no município de Frutal, Minas Gerais Brasil (figura 2). Após a coleta as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica da UEMG- Frutal, onde foram higienizadas com água destilada e solução de hipoclorito de sódio a 5%. Em seguida, os materiais vegetais foram secos em estufa com ventilação forçada, mantidos a 45 °C, por um período de 48 h. Após a secagem, as amostras de folhas e cascas foram trituradas em moinho de facas (Willey SL-31). Posteriormente, 100 g das amostras trituradas foram submetidas ao processo de maceração com 400 mL de etanol P.A por 48 h. Os extratos obtidos foram filtrados, concentrados em evaporador rotativo, em seguida, congelados por 24 h e liofilizados. Em seguida foram preparadas soluções com DMSO de 30 mg/mL para as cascas e 50 mg/mg para as folhas para serem utilizadas como antimicrobianos na fermentação alcoólica.

5.2.2. Preparo e caracterização do substrato para fermentação

Para obtenção de caldo, foram coletadas manualmente colmos de cana-de-açúcar sem

queima prévia da palha, estando seu período útil de industrialização. Na sequência, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Sucroenergia da UEMG- Frutal. Os colmos foram submetidos a processo de extração utilizando moenda elétrica de três cilindros de ácido inoxidável, sendo posteriormente peneirado e filtrado em tecido de algodão. O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi ajustado para 16% com água destilada, sendo a medição realizada com refratômetro digital, originando o substrato.

O caldo extraído e o substrato foram caracterizados quanto ao teor de Brix, pH (CTC, 2005), teor de carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e ácidos orgânicos totais. Para determinação do teor de carboidratos, utilizou-se o Cromatógrafo Shimadzu LC-2030C LT Plus acoplado com coluna CarboSep Coregel 87MM, 200mm (CETEC, 2023). Para determinação dos ácidos orgânicos, utilizou-se o Cromatógrafo Shimadzu LC-2030C LT Plus acoplado com coluna (CETEC, 2023).

5.2.3. Fermentação

5.2.3.1. Ativação da Levedura

Para a fermentação do mosto, utilizou-se a leveduras industrial comercial CAT-1. A mesma foi obtida de centros comerciais especializados em sua forma liofilizada. Primeiramente, para ativação deste microrganismo, pesou-se 22,5g da levedura, a qual foi transferida para 1 L de caldo de cana-de-açúcar a 6% de Brix. Quando o teor de sólidos solúveis foi menor ou igual a 1%, o microrganismo foi recuperado por centrifugação e suspenso em 100 mL de solução salina (NaCl 0,75%). Na sequência, foi avaliado a viabilidade celular por microscopia (CTC, 2005). O processo de ativação foi repetido até que a viabilidade fosse superior a 90%.

5.2.3.2. Fermentação

As leveduras foram suspensas no substrato preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar (5.2.2), na proporção de 7,5g do microrganismo para 250 mL de mosto. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de vidro de 500 mL, os quais foram dispostos em Shaker refrigerado a 140 rpm e 32 °C.

Inicialmente, adicionavam-se 7,5g da levedura em 50 mL do substrato, o qual permanecia no shaker por 1 hora. Na sequência, adicionavam-se mais 200 mL do substrato. A cada 4 horas da segunda alimentação, monitorava-se o Brix até que esse fosse igual ou inferior

a 1%. O material fermentado foi então centrifugado para recuperação da levedura e do vinho. A levedura foi tratada com solução salina/antimicrobiana, e o vinho foi acondicionado em recipientes de polietileno e armazenados em temperatura de 8 °C para posterior caracterização. O processo foi repetido por 9 ciclos consecutivos, utilizando sempre a mesma levedura.

Destaca-se que ao final dos ciclos 1, 3, 5, 6, e 8, a levedura, após a centrifugação, foi pesada para quantificação do crescimento celular, e por último, suspendida em 25 mL de solução salina, onde permaneceu por 60 minutos antes de iniciar novo ciclo fermentativo.

Nos ciclos 2, 4 e 7, além da solução salina, foram adicionados os extratos de folhas e cascas de Neem nas doses de 50 mg/L e 30 mg/L respectivamente (dose obtida em ensaios preliminares – dados não apresentados). Após aplicação dos extratos, a levedura também permanecia em contato com a solução por 60 minutos antes de iniciar nova fermentação.

5.2.4. Avaliações do processo fermentativo

5.2.4.1. Leveduras durante a fermentação

Durante o processo fermentativa a levedura foi caracterizada quanto a viabilidade celular (Figura 1), índice de brotamentos e viabilidade de brotos pela coloração das células pela solução de ringer a pela contagem das células viáveis e não viáveis presentes em 50 retículos da câmara de Newbauer espelhada, com o auxílio de microscópia ótica, em microscópio (Panthera C2 Motic) em aumento de 100x, de acordo com a metodologia de (CTC, 2005). Essas avaliações ocorreram em todos os ciclos no inóculo (suspenção de levedura e solução salina/antimicrobiana antes da adição de substrato), início (60 minutos após a segunda alimentação de caldo) e final da fermentação (quando o Brix foi menor ou inferior a 1%).

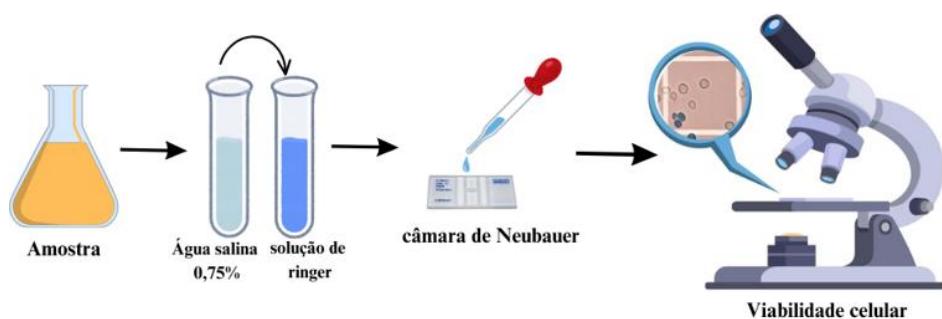


Figura 1 – Representação esquemática da análise da viabilidade celular das células da levedura. Fonte: os autores (2025).

Também foi realizada a taxa de crescimento da levedura a partir da pesagem ao final de cada ciclo fermentativo, após realização do processo de centrifugação (Figura 2). Os dados foram expressos em porcentagem (%).

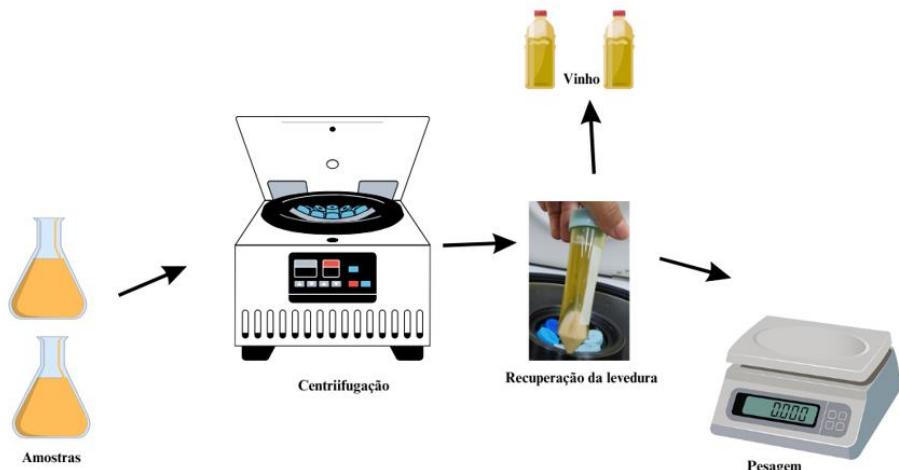


Figura 2 – Processo de pesagem da levedura após a centrifugação.

Fonte: os autores (2025).

5.2.4.2. Metabólitos da levedura presentes no vinho

O vinho final de cada ciclo foi submetido a análise cromatográfica para determinação de glicose, sacarose, frutose, glicerol e teor alcoólico; utilizando o Cromatógrafo Shimadzu LC-2030C LT Plus acoplado com coluna CarboSep Coregel 87MM, 200mm (CETEC, 2023).

5.2.4.3. Rendimentos de processo

Com base nos açúcares totais presentes no substrato e no teor alcoólico produzido pela levedura, calculou-se o rendimento fermentativo, utilizando metodologia descrita por Fernandes (2003).

5.2.4.4. Bactérias contaminantes

Nos ciclos 3, 5 e 8 foram quantificadas as bactérias láticas presentes no inóculo antes da adição de substrato, por meio do método de plaqueamento em superfície. Para isso, utilizou-se o meio de cultura MRS⁺ (10g Peptona, 10g de Extrato de Carne, 5g Extrato de Levedura, 20g de Glicose, 1g Tween 80, 2g de Citrato de amônio, 5g de Acetato de sódio, 0,1g de Sulfato de Magnésio, 0,05g de Sulfato de Manganês, 2g de Fosfato Dissódico, 15g de Ágar, 1L de água

destilada; pH 6,5; Cicloheximida 100 mg/L) vertido em placa de petri 90x15mm. Utilizou-se o método de diluição seriada para semeadura de 100 μ L de suspensão diluída em 10⁶, as quais foram espalhados com alça de drigalski. As placas foram incubadas em BOD a 30 °C por 24 horas para crescimento e posterior a contagem das colônias.

5.2.5. Análise dos dados

Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas segundo o teste de Tukey (5%) utilizando o programa Agroestat (Barbosa; Maldonado, 2017).

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterização do Substrato

Na tabela 1 estão apresentados os dados obtidos para Glicose, Frutose, Sacarose e Brix do caldo e do mosto utilizados nos ensaios. Verificou-se que embora a matéria-prima apresentava valores variáveis de acordo com o dia do experimento, a padronização o mosto, o qual foi corrigido a Brix 16%, possibilitou que o substrato disponibilizado para a levedura apresentava quantidade similar de açúcar em todos os ciclos fermentativos.

Tabela 1 – Valores obtidos para Glicose, Frutose, Sacarose e Brix do Caldo e do Mosto utilizados no ensaio.

Ciclo	Caldo				Mosto			
	Glicose	Frutose	Sacarose	Brix	Glicose	Frutose	Sacarose	Brix
				%				%
1	0,52	0,65	19,86	20,0	0,45	0,59	14,90	16,3
2	0,21	0,31	18,44	18,3	0,00	0,01	15,50	16,0
3	0,16	0,47	17,73	22,3	0,09	0,29	13,66	16,0
4	0,27	0,28	16,13	23,0	0,09	0,09	15,09	15,9
5	0,07	0,25	19,66	19,0	0,05	0,23	15,00	16,0
6	0,03	0,35	19,83	20,8	0,00	0,45	15,80	16,2
7	0,33	0,43	16,55	23,0	0,36	0,45	15,50	16,4
8	0,57	0,64	16,73	22,0	0,47	0,61	14,08	15,9
9	0,66	0,73	12,53	20,1	0,81	0,92	14,00	16,1

5.3.2. Levedura na fermentação

Na Tabela 2 estão apresentados os dados obtidos para viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade de brotos da levedura no inóculo, início e final do processo

fermentativo de 9 ciclos consecutivos, contendo tratamentos com antimicrobiano.

Tabela 2 – Valores médios obtidos para viabilidade celular (VC), índice de brotamentos (BR) e viabilidade de brotos (VB) da levedura no inóculo, início e final do processo fermentativo de 9 ciclos consecutivos, contendo tratamentos com antimicrobiano.

	Inóculo			Início			Final		
	VC	BR	VB	VC	BR	VB	VC	BR	VB
	%								
Ant	0,31ns	1,88ns	11,48**	5,41ns	1,20ns	0,31ns	0,45ns	3,46ns	0,60n s
Test	92,9A	20,9A	95,5A	89,2B	38,35 A	94,7A	92,7A	29,5A	94,5 A
Folha	94,3A	18,0A	90,5A	94,4A	33,64 A	94,1A	95,0A	26,6A	90,3 A
Casca	94,0A	19,9A	78,9B	92,5AB	40,65 A	97,5A	93,8A	34,2A	95,8 A
DMS	5,7	4,6	10,9	4,9	14,1	14,2	7,3	8,8	16,2
CV	7,37	28,15	14,81	6,38	45,12	17,85	9,33	35,30	20,77
Ci	7,53**	83,17* *	7,95**	27,38* *	32,33**	1,59ns	1,27ns	40,96* *	1,32n s
1	89,0C	21,2BC	98,2A	88,8B	75,0A	99,4A	95,8A	66,1A	100A
2	89,8BC	50,3A	96,2A	88,4B	62,5AB	96,1A	89,7A	43,8B	95,2 A
3	97,2A	27,1B	99,4A	69,5C	38,2CD	86,5A	94,2A	33,4BC	96,1 A
4	97,3A	20,5BC	96,3A	97,4A	23,0DE	100A	96,1A	30,2CD	94,5a
5	89,3C	19,1C	86,3A	91,98B	48,8BC	98,1A	93,1A	34,1BC	96,3 A
6	93,1abc	17,9C	94,8A	98,7A	30,7DE	97,4A	92,2A	24,7CD	95,2 A
7	98,5A	4,0D	50,0B	99,3A	26,0DE	100A	95,8A	18,3DE	89,2 A
8	94,0abc	9,8D	96,9A	97,7A	16,3E	100A	91,3A	8,6E	77,7 A
9	95,4AB C	6,5D	76,8A	96,4AB	17,0E	81,7A	96,2A	11,7E	97,6 A
DMS	6,1	6,9	26,2	8,2	16,7	24,3	7,3	12,6	26,3
CV	4,27	23,04	19,37	5,86	29,10	16,62	6,72	27,33	18,41
Inter AntxCi	1,00ns	3,17**	2,21**	1,92*	3,03**	0,98ns	1,02ns	1,17ns	0,66n s

*Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. DMS: Diferença Mínima Significativa. CV: Coeficiente de Variação. ns: não significativo. Ant: Antimicrobiano. Ci: Ciclos. Test: Testemunha. *significativo a 1% de probabilidade.

De maneira geral, observou-se que o inóculo, em todos os tratamentos avaliados, apresentou viabilidade celular superior a 89%. Entretanto, o índice de brotamentos e a viabilidade de brotos variou em função da aplicação dos antimicrobianos e dos ciclos fermentativos analisados. Esses resultados foram apresentados na Figura 3.

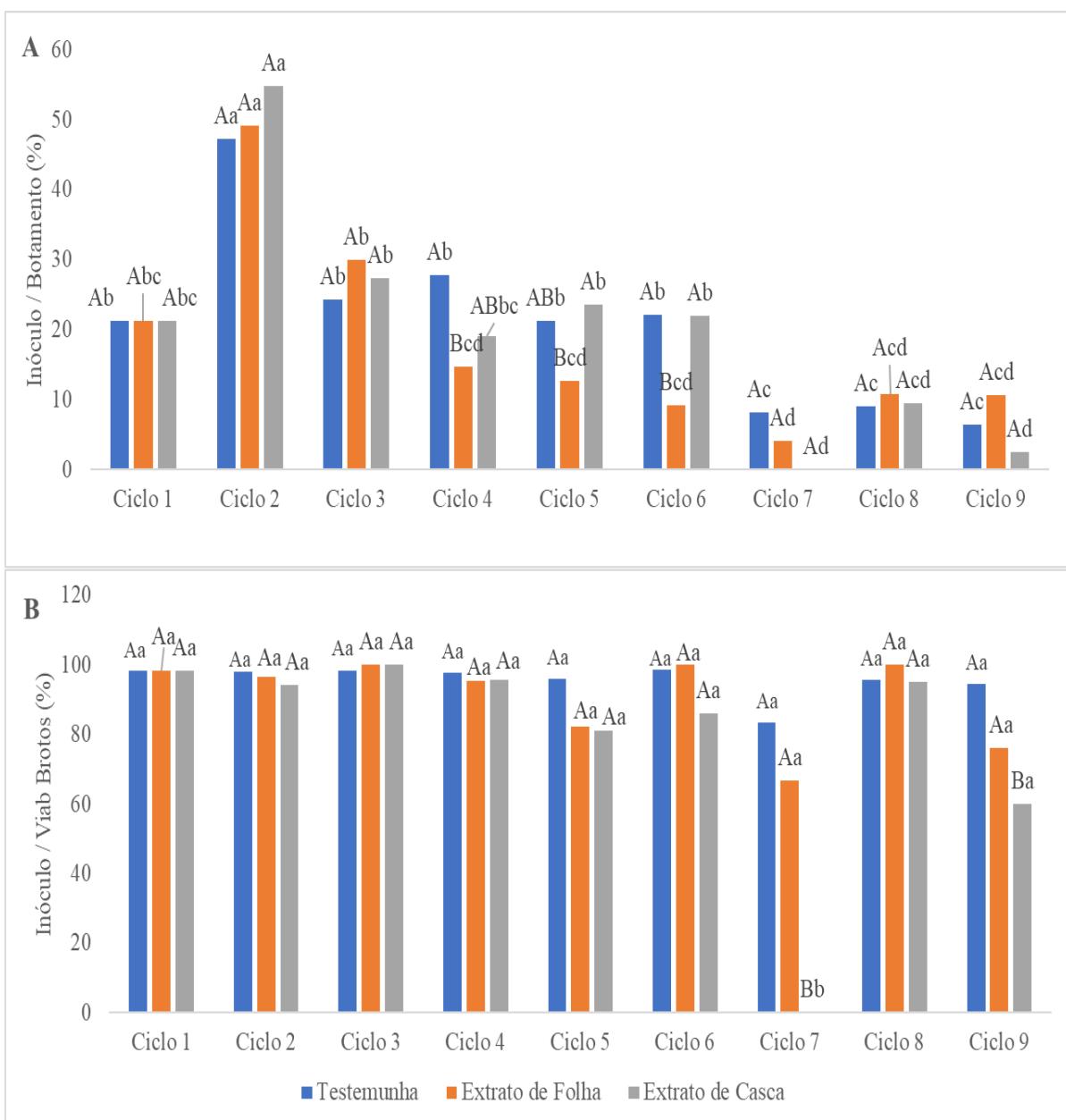


Figura 3 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para índice de brotamentos (A) e viabilidade de brotos (B) de leveduras no inóculo. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento. Fonte: os autores (2025).

Para o início da fermentação não foram detectadas diferenças significativas para a viabilidade de brotos para todos os tratamentos estudados. Porém, houve interação entre antimicrobiano e ciclo, para a viabilidade celular e índice de brotamentos da levedura, sendo essas apresentadas na Figura 4.

No final da fermentação verificou-se que, de maneira geral, o percentual de leveduras multiplicando-se foi reduzindo ciclo a ciclo, independentemente do antimicrobiano utilizado.

Contudo, a viabilidade celular e de brotos não foi alterada de acordo com os tratamentos aplicados.

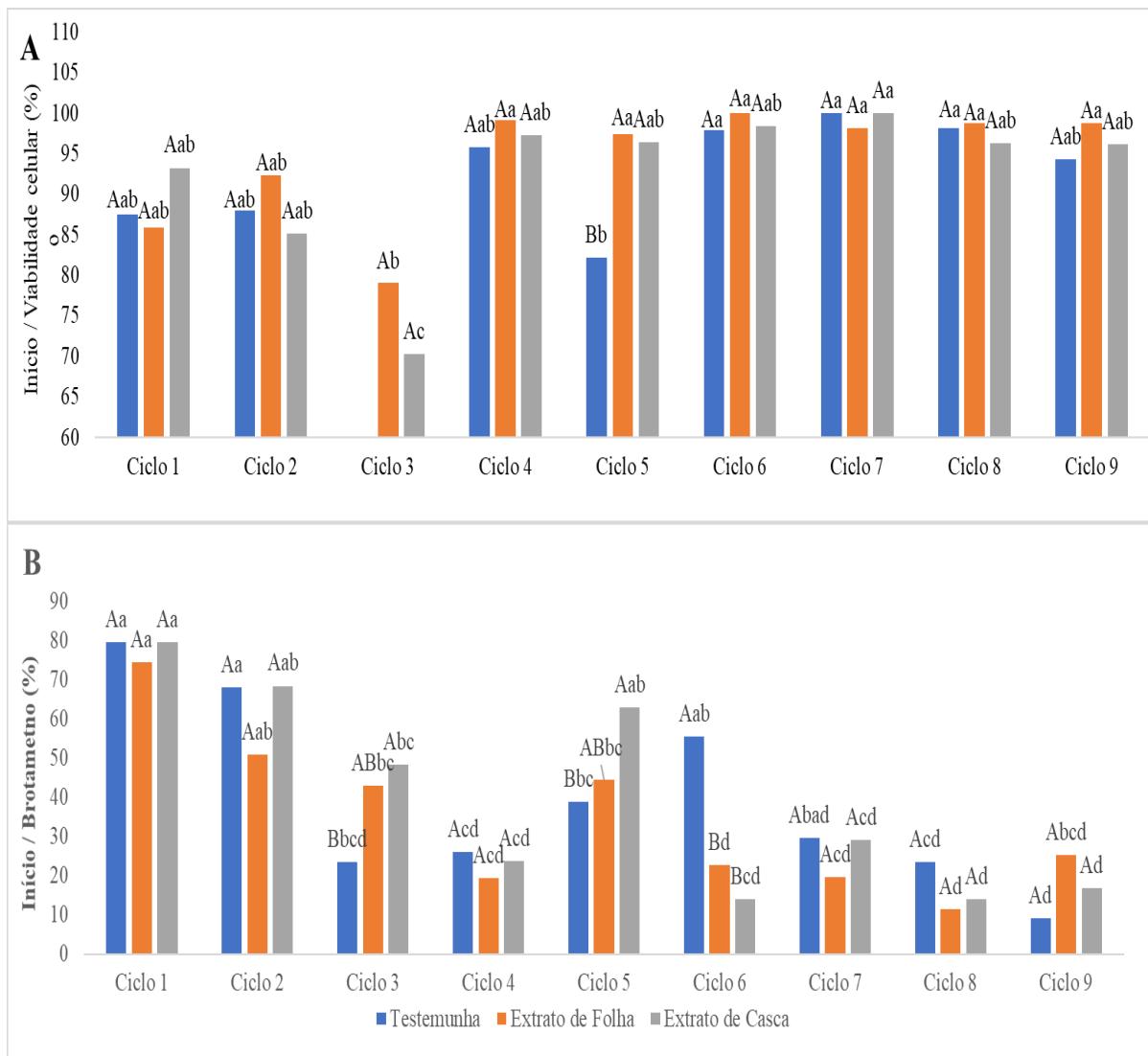


Figura 4 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para viabilidade celular (A) índice de brotamentos (B) de leveduras no início. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento. Fonte: os autores (2025).

Considerando a taxa de crescimento da levedura em cada ciclo fermentativo, observou-se que o extrato de casca de Neem promoveu maior crescimento das leveduras em comparação com os demais tratamentos. Esse comportamento foi observado desde o ciclo 2 (Figura 5A). Para a contaminação bacteriana, o extrato de casca promoveu maior controle de bactérias contaminantes da fermentação no ciclo 8 (Figura 5B).

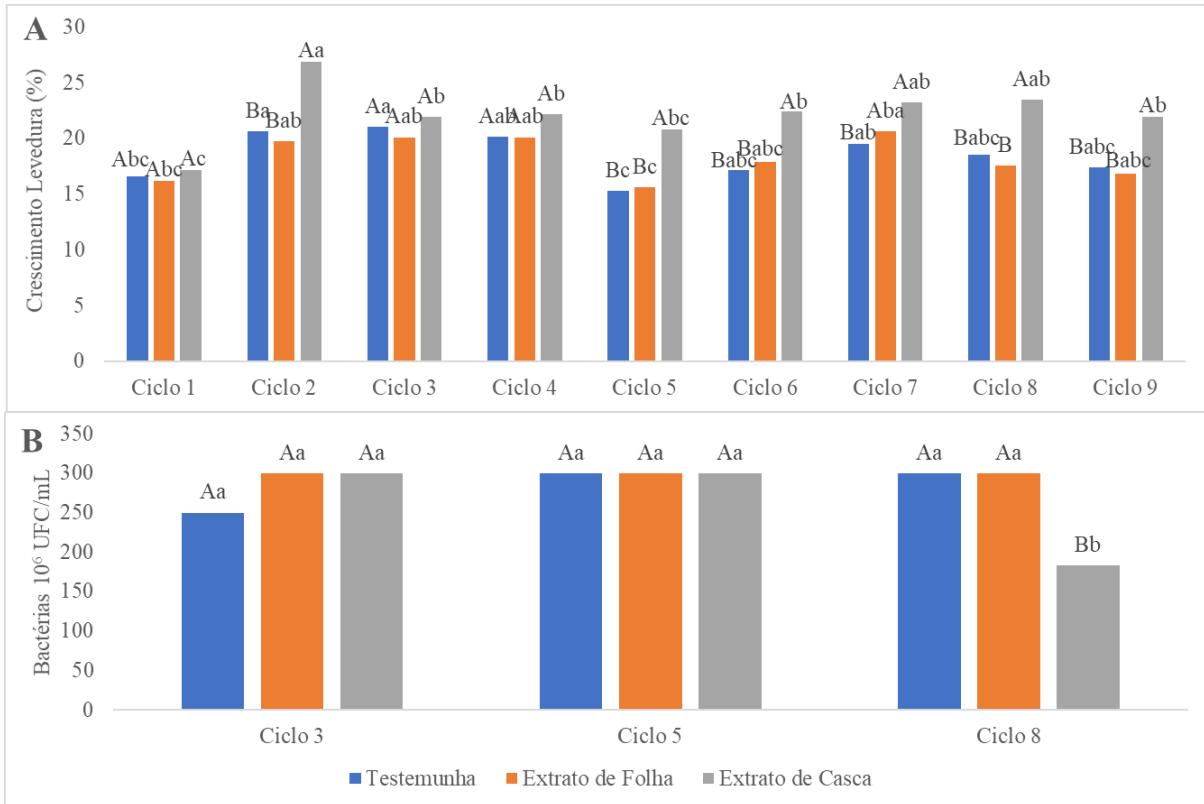


Figura 5 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para crescimento de levedura (A) contaminação do inóculo por bactérias láticas (B). Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento. Fonte: os autores (2025).

5.3.3. Análise do vinho

Considerando os açúcares presentes no vinho (Figura 6A e 6B), observou-se que o tratamento testemunha resultou em maiores de sobras de glicose e frutose, com efeitos iniciais no quinto ciclo, e maior intensidade a partir do sétimo ciclo. Para os tratamentos em que se aplicou o antimicrobiano, verificou-se que o extrato de folhas foi o insumo que melhor promoveu um ambiente propício para a fermentação da levedura, haja vista que resultou em menores sobras de açúcar nos ciclos finais. Importante destacar que não detectou-se presença de sacarose no vinho (dados não apresentados), o que era esperado, uma vez que a levedura libera enzima invertase no substrato para a inversão da sacarose em glicose e frutose, os quais são absorvidos pela célula (Margetic; Vujcic, 2016).

Considerando o teor de glicerol produzido pela levedura durante o processo fermentativo, verificou-se que o mesmo diminuiu ciclo a ciclo para todos os tratamentos estudados, não sendo possível identificar uma relação entre os tratamentos analisados (Figura 6C).

Avaliando o teor de etanol produzido pela levedura, observou-se que nos ciclos em que se aplicou os extratos de folhas e cascas de Neem, ou mesmo no ciclo posterior, houve incremento desta biomolécula no meio, em comparação com o tratamento testemunha (Figura 6D), o que também resultou em maior eficiência fermentativa (Figura 7).

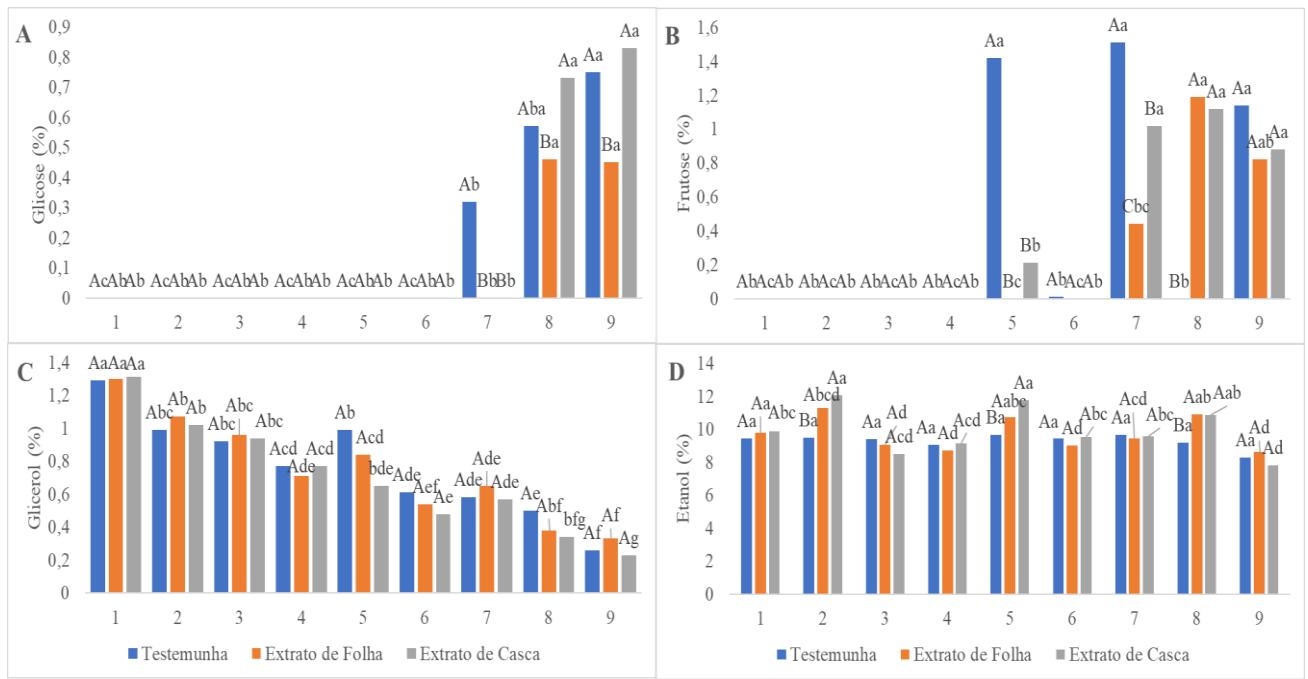


Figura 6 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para os seguintes parâmetros do vinho: Glicose (A), Frutose (B), Glicerol (C) e Etanol (D). Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento. Fonte: os autores (2025).

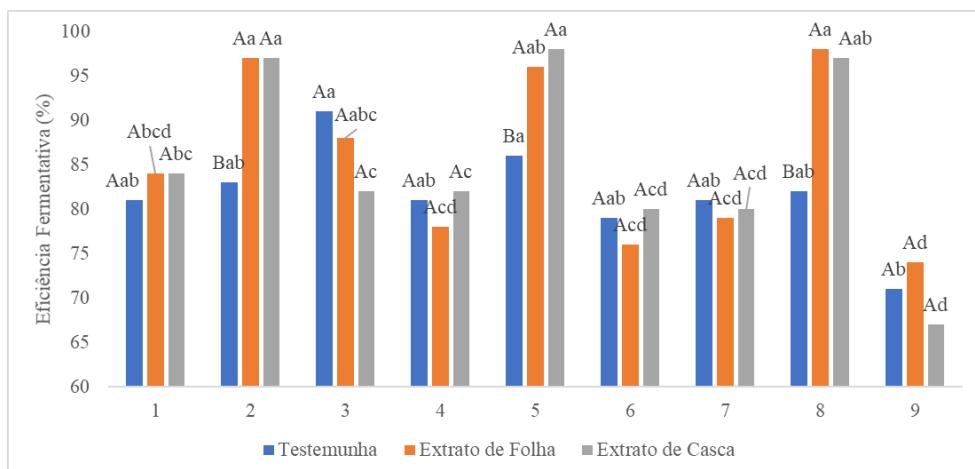


Figura 7 – Interação entre antimicrobianos e ciclos para a eficiência fermentativa. Letra maiúsculas indicam comparação das médias de tratamento dentro dos ciclos. Letras minúsculas comparação dos ciclos em cada tratamento. Fonte: os autores (2025).

5.4. Discussão

O primeiro passo foi avaliar o substrato disponibilizado para a levedura. Observou-se que as características tecnológicas do caldo de cana-de-açúcar variaram de acordo com o dia de coleta (Tabela 1). Esse resultado era esperado, uma vez que a planta é um organismo biológico e sujeita a variações climáticas que podem afetar suas características tecnológicas (Araujo *et al.*, 2017), bem como não é possível garantir a homogeneidade do canavial no momento da coleta. Entretanto, os dados obtidos estão de acordo com os disponibilizados na literatura que apontam cana-de-açúcar em seu período útil de industrialização, apresenta Brix superior a 18% e teor de sacarose superior a 14% (Ripoli; Ripoli, 2004).

Para mitigar o efeito da variabilidade do caldo, o mesmo foi submetido a ajuste de Brix com água destilada, padronizando-o para 16%, possibilitando a visualização apenas do comportamento da levedura perante os antimicrobianos. Importante destacar que não foi controlado a quantidade de bactérias que vieram junto com a matéria-prima, justamente para averiguar o potencial antimicrobiano dos extratos.

Na sequência, avaliou-se o efeito dos antimicrobianos sobre as características da levedura ciclo a ciclo. De maneira geral, observou-se que o inóculo apresentou teor de células vivas adequados para a realização de processo fermentativo industrial, para todos os tratamentos e em todos os ciclos; haja vista que os dados corroboram com Douradinho *et al.* (2023), que apontam que a levedura para iniciar o processo fermentativo deve apresentar viabilidade celular superior a 85%. Entretanto, verificou-se queda no teor de brotamentos e viabilidade de brotos do inóculo ciclo a ciclo, o que também era esperado, tendo em vista que após adaptação do microrganismo ao meio, ele tende a diminuir a taxa de brotamentos e maximizar a produção de etanol (Montijo *et al.*, 2014). Importante destacar que nos ciclos intermediários o extrato de folhas de Neem foi o que maior impactou negativamente a taxa de brotamentos da levedura, igualando ao final dos ensaios. Esse comportamento pode ser decorrente das biomoléculas presentes no mesmo, como os compostos fenólicos, que podem reduzir o brotamento e a viabilidade de brotos da levedura em fermentação (Henrique; Venturini Filho, 2014).

Considerando o início e final da fermentação, verificou-se que a levedura apresentou viabilidade celular e de brotos superior a 80%, valor considerado adequado para a fermentação, e viabilidade de brotos superior a 80%. Para o índice de brotamentos, observou que esse foi

reduzindo ciclo a ciclo, sem que fosse possível determinar um efeito direto dos antimicrobianos sobre esse comportamento.

Embora a quantidade de células e brotos da levedura tenham tido comportamento similar para os tratamentos em que se aplicou antimicrobiano, constatou-se que o extrato de cascas de Neem promoveu maior crescimento da levedura a partir do 2º ciclo. Tal fato, pode explicado pelos compostos fenólicos presentes no Neem, como queracetina (Kiranmai *et al.*, 2011), resveratrol (Tchinda *et al.*, 2020) e rutina (Hemdma *et al.*, 2023), os quais propiciam um maior crescimento celular da levedura *S. cerevisiae*, principalmente quando solubilizado em etanol (Silva, 2013), que foi o caso deste experimento.

Outro fator que pode ter contribuído é o efeito protetor de compostos com ação antioxidantes, como os fenólicos e os taninos. De acordo com os estudos Galano *et al.* (2021) e Dumanović *et al.* (2021) a presença dos metabolitos secundários com ação antioxidante presentes em extratos vegetais agem em defesa contra estresse oxidativo.

Considerando o efeito antimicrobiano dos extratos de folha e casca de Neem, observou-se que, nos ciclos que foram adicionados (3, 4 e 7), resultaram em menor contaminação no ciclo posterior, especialmente para o ciclo 8 utilizando o extrato de casca da planta.

A composição química dos compostos das folhas e cascas são distintos. As folhas possuem compostos químicos como os flavonoides, taninos condensados, terpenos e esteroides, além de ácidos graxos em sua composição, que possuem ação antibacteriana contra diversas bactérias (Nigussie *et al.*, 2021; Galeane *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2017; Jindal; Chauhan, 2017; Flaifel *et al.*, 2023) esses compostos terem ação antibacteriana é essencial que os mesmos sejam solúveis ao meio contaminante. Durante o experimento, observou-se partículas oleosas do extrato da folha não foram completamente dissolvidas ao mosto, vale ressaltar que compostos triterpenos e ácidos graxos são substâncias oleosas, e não possuem solubilidade em meios aquosos. Tal fato, pode ter dificultado a ação sinérgica desses compostos juntamente com os outros.

A casca possui mais compostos fenólicos, que estão associados a presença de taninos. A ação antibacteriana dessa classe está correlacionada com sua estrutura molecular (Olchowik-Grabarek *et al.*, 2022). Esses compostos químicos afetam principalmente a integridade das membranas bacterianas, causando alterações nas propriedades funcionais, estruturais e mudanças nas propriedades físico-químicas, resultando na supressão do crescimento (Farha *et al.*, 2020). O fato de os taninos agirem diretamente sob a membrana bacteriana, pode levar a

alteração na fluidez da membrana, que por sua vez facilita a ação de outros compostos que estão presentes no extrato da casca (Czarkas *et al.*, 2024). Além disso a presença de outros compostos antibacterianos (flavonoides, terpenos), presentes nos extratos etanolicos da casca favoreceram a inibição do crescimento bacteriano no meio fermentativo.

Aliado a esses resultados, observou-se que o extrato de casca resultou em maior teor alcoólico no vinho, principalmente nos ciclos em que foi adicionado, sem que ocorresse sobra de açúcares ou maior produção de glicerol pela levedura (Figura 6). Esse resultado é interessante pois demonstra que além de ação antimicrobiana ante as bactérias contaminantes da fermentação, o extrato de casca também age como promotor de maior produção de etanol. Tais resultados, impactaram significativamente a eficiência fermentativa, a qual foi maior para esses mesmos tratamentos (Figura 7).

Possivelmente, os compostos presentes no extrato da casca podem impactar na fluidez da membrana plasmática da levedura, facilitando o transporte de açúcares e íons essenciais para o metabolismo fermentativo. Além disso, essa alteração pode permitir que a levedura elimine para o meio o etanol intracelular produzido em sua via metabólica, reduzindo sua toxicidade (Topaloglu *et al.*, 2023). Estudos futuros podem confirmar os compostos químicos presentes nos extratos de Neem, bem como podem confirmar essa hipótese.

5.5. Conclusão

Conclui-se que o uso do Extrato de Casca de *Azadirachta indica* na fermentação etanólica de substrato preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar, utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae*, controla bactérias contaminantes ao longo dos ciclos de fermentação, bem como é promotor de crescimento de biomassa levedura e aumenta a produção de etanol por esse microrganismo.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711321001690?via%3Dihub>. Acesso em: 21 fev. 2025.
- ARAÚJO, R. M.; OLIVEIRA, R. A. D.; CUADRA, S. V.; ALMEIDA, I. R. D.; WEBER, H. Condições agrometeorológicas para perfilhamento máximo da cultura de cana-de-açúcar em dois ambientes distintos de produção. **Agrometeoros**, v. 25, n. 1, 2018. Disponível em: <http://seer.sct.embrapa.br/index.php/agrometeoros/article/view/26287>. Acesso em: 13 mar. 2025.
- BARBOSA J. C.; MALDONADO, J. W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat** – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. FUNEP: Jaboticabal. .2017.
- BOUYAHYA, A.; CHAMKHI, I.; BALAHBIB, A.; REBEZOV, M.; SHARIATI, M. A.; WILAIRATANA, P.; MUBARAK, M. S.; BENALI, T.; EL OMARI, N. Mechanisms, Anti-Quorum-Sensing Actions, and Clinical Trials of Medicinal Plant Bioactive Compounds against Bacteria: A Comprehensive Review. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1484, 22 fev. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/5/1484>. Acesso em: 13 fev. 2025.
- CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, 2011. Disponível em: <https://publicacoes.fatecjaboticabal.edu.br/citec/article/view/63>. Acesso: 15 fev. 2025.
- 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. 80, 2018. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003014415>. Acesso 20 jan. 2025.
- CTC (2005) Manual de análises para açúcar. Piracicaba, Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises. CD ROM.
- CETEC (2023) Determinação da concentração de carboidratos e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC. 3^a revisão. Ribeirão Preto, CETEC.
- CHEN, Y.; YANG, Y.; CAI, W.; ZENG, J.; LIU, N.; WAN, Y.; FU, G. Research progress of anti-environmental factor stress mechanism and anti-stress tolerance way of *Saccharomyces cerevisiae* during the brewing process. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 63, n.º 33, p. 12308–12323, 20 dez. 2023. DOI 10.1080/10408398.2022.2101090. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2022.2101090>. Acesso em: 19 fev. 2025.
- CRUZ, M. L.; RESENDE, M. M. D.; RIBEIRO, E. J. Evaluation of process conditions in the

performance of yeast on alcoholic fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 6, p. 846-855, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Cruz18/publication/323618255_Evaluation_of_process_conditions_in_the_performance_of_yeast_on_alcoholic_fermentation/links/5b5fc4e70f7e9bc79a70327d/Evaluation-of-process-conditions-in-the-performance-of-yeast-on-alcoholic-fermentation.pdf. Acesso em: 16 fev. 2025.

CLAUS, S.; JEZIERSKA, S.; VAN BOGAERT, I. N. A. Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane. **FEBS Letters**, v. 593, n.13, p. 1508–1527, 2019. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.13469>. Acedido em: 13 mar. 2025.

CZERKAS, K.; OLCHOWIK-GRABAREK, E.; ŁOMANOWSKA, M.; ABDULLADJANOVA, N.; SĘKOWSKI, S. Antibacterial Activity of Plant Polyphenols Belonging to the Tannins against *Streptococcus mutans*—Potential against Dental Caries. **Molecules**, v. 29, n. 4, p. 879, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/4/879>. Acesso em: 13 mar. 2025.

DOURADINHO, R.; SICA, P.; TONOLI, F.; MATTOS, E.; OLIVEIRA, M.; PINTO, A.; MOTA, L.; FARIA, T.; COSTA, V. F.; LEITE, G.; ARTHUR, V.; COELHO, S.; BAPTISTA, A. Osmotic Stress Alleviation in *Saccharomyces cerevisiae* for High Ethanol Fermentations with Different Wort Substrates. **Stresses**, v. 3, n. 4, p. 813–826, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-7140/3/4/55>. Acesso em: 13 fev. 2025.

DUMANOVIC, J.; NEPOVIMOVA, E.; NATIĆ, M.; KUČA, K.; JAĆEVIĆ, V. (2021). A importância das espécies reativas de oxigênio e do sistema de defesa antioxidante em plantas: uma visão geral concisa. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, p. 55296911. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>. Acesso em: 19 fev. 2025.

FARHA, A. K.; YANG, Q.-Q.; KIM, G.; LI, H.-B.; ZHU, F.; LIU, H.-Y.; GAN, R.-Y.; CORKE, H. Tannins as an alternative to antibiotics. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100751, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429220310890>. Acesso em: 13 fev. 2025.

FERNANDES A.C. **Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar**. Piracicaba: EME/STAB. 2003.

FLAIFEL, M.; QARALLEH, H., DMOUR, S.; ALQARALEH, M.; AL-KABARITI, A. Folha de *Azadirachta indica* (Neem): composição química e atividade antibacteriana determinadas por diferentes solventes de polaridade. **Research Journal of Biotechnology**. v. 18, n. 2, p. 55-62, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.25303/1802rjbt55062>.

GALANO, A.; CASTAÑEDA-ARRIAGA, R.; PÉREZ-GONZÁLEZ, A.; TAN, D.; REITER, R. Compostos Relacionados a Melatonina Phenolic: Their Role as Chemical Protectors against Oxidative Stress. **Moléculas** 21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21111442>.

GALEANE, M.; MARTINS, C.; MASSUCO, J.; BAUAB, T.; SACRAMENTO, L.

Phytochemical screening of *Azadirachta indica* A. Juss for antimicrobial activity. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, p. 117-122. 2017. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8337>.

HEMDAN, B. A.; MOSTAFA, A.; ELBATANONY, M. M.; EL-FEKY, A. M.; PAUNOVA-KRASTEVA, T.; STOITSOVA, S.; EL-LIETHY, M. A.; EL-TAWEEL, G. E.; ABU MRAHEIL, M. Bioactive *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* leaves extracts with anti-SARS-CoV-2 and antibacterial activities. **PLOS ONE**, v. 18, n. 3, p. e0282729, 8 mar. 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0282729. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0282729>. Acesso em: 13 fev. 2025

HENRIQUE, M. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Relação entre a concentração dos compostos fenólicos do mosto e a eficiência da fermentação alcoólica por subprodutos em processo contínuo. **Energia na Agricultura**, v. 29, n. 4, p. 265-271, 2014. Disponível em: <http://revistas.fca.unesp.br/index.php/energia/article/view/883>. Acesso em: 13 fev. 2025.

JINDAL, M.; CHAUHAN, S. Comparação in vitro da atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* com gentamicina, ampicilina, nitrofurantoína e cotrimoxazol em patógenos bacterianos isolados de pacientes com infecção do trato urinário". **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, vol. 10, n. 8, pp. 72-74, 2017, Disponível em: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/18557>. Acesso 15 fev. 2025.

KHAN S.; IMRAN M.; Imran M. Pindari NAntimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida* spp. **Bioinformation**, v. 13, n. 03, p. 67–72, 2017. Disponível em: <http://www.bioinformation.net/013/97320630013067.htm>. Acesso em: 13 fev. 2025.

KIRANMAI, M.; KUMAR, M.; IBRAHIM, M.D. Atividade de eliminação de radicais livres do extrato da casca da raiz de nim (*Azadirachta indica* A. Juss var., *Meliaceae*). **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. 4, p. 134-136, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287164930_Free_radical_scavenging_activity_of_nim_root_bark_of_Azadirachta_indica_A_Juss_Var_Meliaceae_root_barks_extract. Acesso em: 20 fev. 2025.

LIU, X.; KWON, H.; WANG, M.; O'CONNOR, D. Life Cycle Greenhouse Gas Emissions of Brazilian Sugar Cane Ethanol Evaluated with the GREET Model Using Data Submitted to RenovaBio. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 32, p. 11814–11822, 2023. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.2c08488>. Acesso em: 18 fev. 2025.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. D. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. D.; AMORIM, H. V. D. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216310346>. Acesso: em: 13 jan. 2025.

MARGETIĆ, A.; VUJČIĆ, Z. Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 305–311, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826068.2016.1244683>. Acesso em: 13 fev. 2025.

MONTIJO, N. A.; SILVA, A. F.; COSTA, G. H. G.; FERREIRA, O. E.; MUTTON, M. J. Yeast CA-11 fermentation in musts treated with brown and green propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 39, p. 3515–3522, 2014. Disponível em: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/B07353448033>. Acesso em: 13 fev. 2025.

MULYANI, Y.; SINAGA, S.; SUPRATMAN, U. Phytochemistry and biological activities of endophytic fungi from the meliaceae family. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 778, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/2/778>. Acesso em: 15 de fev. 2025.

NIGUSSIE, D.; DAVEY, G.; LEGESSE, B. A.; FEKADU, A.; MAKONNEN, E. Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 2, 2021. Disponível em: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-020-03183-0>. Acedido em: 20 fev. 2025.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de. **Atividade Antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça**. 2010. iii, 53 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94923>. Acesso em: 10 fev. 2025.

ON., N.; A., I.; JE, O.; E, E.; PO, U.; ON, R.; MO, E.; IA, O.; PN, A.; SO, O. Comparative analysis of the phytochemical compositions of eaf, stem-bark and root of *Azadirachta Indica* (Neem). **Universal Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 5, 2018. Disponível em: <https://ujpronline.com/index.php/journal/article/view/201>. Acesso em: 13 fev. 2025.

MENEZES, R.M de S.; LIMA, J.R de.; SANTOS, D. de S.; SANTOS, JC dos.; VIANA, A.C. Extração, caracterização, prospecção por CG-EM e efeito bactericida do óleo essencial de NIM (*Azadiracht indica*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e507101523154, 2021. Disponível em: <https://rsdjurnal.org/index.php/rsd/article/view/23154>. Acesso em: 15 fev. 2025.

NINKUU, V.; ZHANG, L.; YAN, J.; FU, Z.; YANG, T.; ZENG, H. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.11, p. 5710, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5710>. Acedido em: 13 mar. 2025.

OLCHOWIK-GRABAREK, E.; SĘKOWSKI, S.; KWIATEK, A.; PŁACZKIEWICZ, J.; ABDULLADJANOVA, N.; SHLYONSKY, V.; SWIECICKA, I.; ZAMARAEVA, M. The Structural Changes in the Membranes of *Staphylococcus aureus* Caused by Hydrolysable

Tannins Witness Their Antibacterial Activity. **Membranes**, v. 12, n. 11, p. 1124, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0375/12/11/1124>. Acesso em: 17 fev. 2022.

PARAPOULI, M.; VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A. S.; Hatziloukas, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2020. Disponível em: <https://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2020001>. Acesso em: 10 fev. 2025.

SAHA TCHINDA, J.; MBITNKEU FETNGNA TCHEBE, T.; ABDOU TCHOUKOUA; CHEUMANI YONA, A. M.; FAUCONNIER, M. L.; NDIKONTAR KOR, M.; RICHEL, A. Fatty acid profiles, antioxidant, and phenolic contents of oils extracted from *Acacia polyacantha* and *Azadirachta indica* (Neem) seeds using green solvents. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.15115>. Acesso em: 13 fev. 2025.

RIPOLI T.C.C.; RIPOLI M.L.C.; **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica. 302 p. 2004.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-02082011-093349/> Acesso: 10 fev. 2025.

.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, verificou-se que os extratos brutos e as frações de *Azadirachta indica* apresentam composições químicas específicas que influenciam diretamente suas propriedades antimicrobianas. Os extratos das cascas e folhas, ricos em compostos fenólicos, flavonoides e taninos, demonstraram atividade antimicrobiana significativa contra *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Em contrapartida, o extrato de sementes, composto majoritariamente por ácidos graxos e triterpenoides, não exibiu atividade contra essas bactérias. Além disso, os extratos alcoólicos do Neem não afetaram *Saccharomyces cerevisiae*, evidenciando sua seletividade antimicrobiana.

Os diferentes perfis de compostos bioativos entre os extratos resultaram em distintos níveis de atividade antimicrobiana. A fração hexânica das folhas intensificou a ação antimicrobiana contra *L. mesenteroides*, enquanto, para *L. fermentum*, a sinergia dos metabólitos no extrato bruto se mostrou mais eficaz, indicando que o perfil químico das frações influencia diretamente a bioatividade.

A fração hexânica das folhas apresentou maior atividade antimicrobiana contra *L. mesenteroides* em comparação com o extrato bruto. No entanto, para *L. fermentum*, o efeito contrário foi registrado, sugerindo que a interação entre os compostos no extrato bruto pode ser determinante para sua eficácia.

Entre os extratos avaliados, a casca de *Azadirachta indica* destacou-se por sua elevada eficácia antimicrobiana, inibindo *L. fermentum* e *L. mesenteroides* em menores concentrações. Adicionalmente, sua aplicação na fermentação etanólica não apenas auxiliou no controle microbiano, mas também favoreceu o crescimento de *S. cerevisiae*, sugerindo um possível efeito bioestimulante.

Esses resultados indicam que a casca de *Azadirachta indica* pode representar uma alternativa promissora para a fermentação etanólica, pois combina dois benefícios essenciais: controle microbiano e estímulo ao crescimento da levedura. Estudos mais aprofundados como a aplicação desses extratos em larga escala, podem contribuir para processos fermentativos mais sustentáveis e eficientes.