

ESTUDO DO DERIVADO DO ÓLEO DE *RICINUS COMMUNIS* L. (MAMONA) COMO AGENTE BIOCIDA E REDUTOR DA VISCOSIDADE PRODUZIDA POR *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* EM INDÚSTRIAS SUCROALCOOLEIRAS

M.A. Messetti<sup>1</sup>, A.M. dos Santos<sup>1</sup>, D.F de Angelis<sup>1</sup>, G.O. Chierice<sup>2</sup>, S. Claro Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, CP 199, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. E-mail: mari\_messetti@ig.com.br

RESUMO

Das sementes da mamona extrai-se o óleo de rícino, utilizado *in natura* ou em sua forma modificada nas áreas médica, farmacêutica e industrial. Um de seus derivados químicos - o Poliquilgerm<sup>®</sup> - evidencia propriedades antifúngicas sobre *Candida albicans* e bacteriostática/bactericida sobre *Escherichia coli* no nível de 99,9%. Considerando-se essas propriedades, aplicou-se o Poliquilgerm<sup>®</sup> em culturas de *Leuconostoc mesenteroides*, uma das espécies de bactéria contaminante dos mostos em indústrias sucroalcooleiras. Esta bactéria quando presente em mostos produz além do ácido láctico, a dextrana, que é um polímero da glicose que aumenta a viscosidade dos fluidos dos processos. No presente trabalho avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do Poliquilgerm<sup>®</sup> sobre a viscosidade produzida por *L. mesenteroides* em diferentes meios de cultivo, condições de pH, e temperatura. Verificou-se 20,56% de diminuição da viscosidade quando se utilizou 1,0% do produto, além da inibição do crescimento da bactéria após 20 horas em contato com 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm<sup>®</sup>. *L. mesenteroides* apresentou melhor crescimento em valores de pH 6,0, tanto a 28 como a 33° C, evidenciado pela maior produção de biomassa. Além disso, em meio de cultura neste pH verificou-se maior porcentagem de diminuição da viscosidade em ambas as concentrações utilizadas. Estas mesmas concentrações alcançaram até 100% de diminuição das UFC/mL após 24 horas em contato com o produto, evidenciado por quantificação da biomassa e confirmado mediante plaqueamento pela técnica "Pour Plate".

PALAVRAS-CHAVE: Poliquilgerm<sup>®</sup>, *Leuconostoc mesenteroides*, mamona, viscosidade.

ABSTRACT

STUDY OF A *RICINUS COMMUNIS* L. (CASTOR OIL) DERIVATIVE AS A BIOCIDAL AGENT AND VISCOSITY REDUCER ON *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* IN THE SUGAR AND ALCOHOL INDUSTRIES. Castor-oil, extracted from seeds of *Ricinus communis* L., is normally used *in natura* or in its modified form in the medical, pharmaceutical and industrial areas. One of its chemical derivatives - Poliquilgerm<sup>®</sup> - has shown antifungal properties on *Candida albicans*, and bacteriostatic/bactericide effects on *Escherichia coli* reaching 99.9%. Considering these features, in the present study Poliquilgerm<sup>®</sup> was applied in cultures of *Leuconostoc mesenteroides*, a frequent contaminant bacterium of musts in the sugar and alcohol industries. This bacterium, when a contaminant of must, produces lactic acid as well as dextran, a polymer of glucose which may increase the viscosity of fluids in the operation. The present study evaluated the effect of different concentrations of Poliquilgerm<sup>®</sup> on viscosity produced by *L. mesenteroides* cultures under different conditions of various culture media, pH and temperature. A 20.56% decrease in viscosity was verified when 1.0% of the product was used, and bacterium growth inhibition after 20 hours in media with 1.0 and 0.2% of Poliquilgerm<sup>®</sup>. *L. mesenteroides* showed a higher growth rate in pH 6.0, at both 28 and 33° C, evidenced by greater biomass production. Also, in the culture media at this pH a greater decrease in viscosity percentages was verified at both concentrations used. The media with these same concentrations reached up to 100% decrease of UFC/mL after 24 hours in the presence of the product, observed by biomass quantification and confirmed by the Pour Plate technique.

KEY WORDS: Poliquilgerm<sup>®</sup>, *Leuconostoc mesenteroides*, castor oil, viscosity.

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, SP, Brasil.

## INTRODUÇÃO

A fermentação etanólica no Brasil processa-se em condições não assépticas, sendo frequente a contaminação por bactérias. Esses contaminantes constituem um dos maiores problemas, tanto operacionais como econômicos na indústria. A situação nesta etapa agrava-se com o reciclo de células de levedura para aumentar a produtividade, pois também ocorre concentração das bactérias. A contaminação bacteriana origina-se durante as operações de transferência da cana-de-açúcar do campo até a unidade industrial, envolvendo corte, carregamento, transporte, descarregamento e armazenamento da matéria-prima (ROSALES, 1989).

São as bactérias Gram-positivas que mais induzem problemas no processo fermentativo, provavelmente devido ao fato da parede celular das bactérias Gram-negativas ser rica em lipídeos, os quais são facilmente solubilizados em álcool, presente nas dornas de fermentação. Os trabalhos de RODINI (1985) e GALLO (1989) comprovaram a dominância das bactérias Gram-positivas. As bactérias contaminantes concorrem com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo açúcar disponível, realizando fermentações secundárias que resultam na produção de outros subprodutos que não o álcool. Estes subprodutos podem alterar características físico-químicas como pH, acidez, viscosidade; bem como a morfologia das leveduras, induzindo a floculação e à deformação celular devido à presença de gomas e ácidos orgânicos, respectivamente (ROSALES, 1989).

*Leuconostoc mesenteroides* é um dos contaminantes mais frequentes no processo de fermentação industrial para produção de etanol, pois produz, além do ácido láctico, a dextrana. A dextrana manifesta-se na forma de uma massa gelatinosa transparente conhecida na indústria como "goma" ou "canjica"; causando diversos prejuízos físicos devido ao aumento da viscosidade do mosto, com conseqüente entupimento dos trocadores de calor, tubulações e centrífugas, além de possíveis danos para a levedura. De acordo com HOLT *et al.* (1986), o gênero *Leuconostoc* é formado por bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas. Sua sensibilidade a antibióticos e drogas é desconhecida visto que nenhuma espécie é confirmada como patogênica. A síntese de dextrana ocorre a partir de uma enzima extracelular, uma glicosiltransferase (dextran-sacarase), que possui a propriedade de atuar sobre a molécula de sacarose, liberando a frutose e transferindo a molécula de glicose a uma molécula receptora, no caso moléculas de dextrana em expansão.

Muitas técnicas vêm sendo utilizadas para controlar a contaminação bacteriana, como a aplicação de ácido sulfúrico para baixar o pH e biocidas que favorecem a levedura. Rotineiramente utiliza-se o

ácido sulfúrico após a centrifugação do fermento e antes de ser submetido a uma nova etapa fermentativa (SILVA FILHO, 1993). A acidez do meio é adequada para o desenvolvimento da levedura (pH 4,0-5,0), sendo prejudicial à maioria das bactérias contaminantes. Assim, a aplicação de ácido é empregada como medida preventiva e controladora de infecções, embora valores de pH muito baixos possam afetar a levedura (ROSALES, 1989). Segundo GUERRA (1995), a utilização frequente de ácido sulfúrico pelas destilarias no intuito de combater as contaminações bacterianas pode gerar alguns problemas, como aqueles associados à qualidade do álcool, morte das leveduras, corrosão nos equipamentos, segurança pessoal e instabilidade do sistema. Como substâncias alternativas são utilizados antibióticos e biocidas para o controle das infecções.

O óleo de mamona destaca-se economicamente pela versatilidade química no ramo industrial. Segundo CHIERICE; CLARO-NETO (2001), este óleo é um triglicerídeo rico em ácido ricinoleico, presente em 89,5% de sua composição. A presença de hidroxila, insaturação e carboxila – que são três grupos funcionais altamente reativos no ácido ricinoleico – faz com que este óleo possa ser submetido a diversos processos químicos para a obtenção de subprodutos utilizados nas áreas farmacêutica, cosmética, de lubrificantes, polímeros e produção de biodiesel etc. Os polímeros de ácidos graxos são utilizados na elaboração de próteses e implantes, substituindo o silicone e outros materiais em cirurgias ósseas e de próstata. Em 1984, o Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em São Carlos, desenvolveu novos polióis derivados do óleo de mamona (IGNÁCIO, 1995 apud REZENDE *et al.*, 2001). Dentre os polióis desenvolvidos, o Endoquil<sup>®</sup> tem sido aplicado como bactericida na área odontológica, sendo utilizado em substituição ao hipoclorito de sódio para irrigação de canais e apresentando atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (FERREIRA, 1996, LEONARDO *et al.*, 2001). O grupo GQATP sintetizou outros produtos com aplicações na área médica, como a poliuretana partindo de polióis derivados do óleo de mamona para implantes em aves (BOLSON *et al.*, 2005; REZENDE *et al.*, 2001). Outro poliól, o Poliquilgerm<sup>®</sup>, foi avaliado por BERTOLETTI *et al.* (2004) e MESSETTI *et al.* (2005), que verificaram *in vitro* efeito microbiostático sobre *Candida albicans* e *Escherichia coli* CCT 1457. OLIVEIRA (2005), estudando a decomposição de sacarose por hidrólise, utilizou uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona e verificou a sua capacidade hidrolítica na formação de glicose e frutose. Assim, acredita-se que os ésteres atuem como "transferidores" de água para a molécula de sacarose, catalisando a reação hidrolítica ao

romper a ligação glicosídica, que também está presente na parede celular das bactérias.

O presente estudo propõe a utilização do derivado do óleo de mamona – Poli quilgerm® – como agente biocida no controle das contaminações pela bactéria *L. mesenteroides* em indústrias sucro-alcooleiras, visando a diminuição da viscosidade do mosto contaminado. Para tanto, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de Poli quilgerm® sobre *L. mesenteroides*, com relação às mudanças de viscosidade dos meios de cultura e a verificação do crescimento da bactéria.

## MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (B512) foi inoculada em meio de cultura MAYEUX; COLMER (1961) para produção de goma e incubada por 24 horas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . A partir deste inóculo, a bactéria foi cultivada em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do mesmo meio de cultura, no qual foram acrescidos diferentes concentrações de Poli quilgerm®. No primeiro experimento, foram utilizadas as concentrações 2,0 e 1,0%. Nos experimentos seguintes, optou-se por manter a concentração 1,0% e avaliar uma concentração mais baixa do produto, no caso 0,2%. As culturas e os controles (contendo apenas meio de cultura) foram mantidos em "shaker" a 100 rpm, na temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Decorrido o tempo de cultivo, mediu-se a viscosidade utilizando-se viscosímetro de Cannon-Fenske, a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . O crescimento de *L. mesenteroides*, na ausência e presença de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®, foi verificado por meio de espectrofotometria, mediante medidas de absorbância a  $\lambda = 540\text{ nm}$  nos tempos 0, 6, 20 e 26 horas.

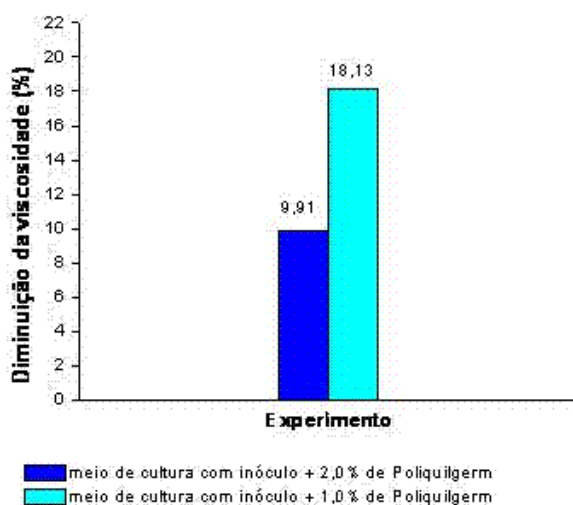


Fig. 1 - Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poli quilgerm®.

Em etapa posterior, preparou-se meio de caldo de cana suplementado com nutrientes (CSN) nos pHs 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0, onde adicionou-se 0,2 e 1,0% de Poli quilgerm®, na ausência e presença da cultura de *L. mesenteroides*. Os controles e as culturas foram incubados em "shaker" a 100 rpm nas temperaturas de  $33 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, mediu-se a viscosidade utilizando-se viscosímetro de Cannon-Fenske a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , e efetuou-se a verificação do crescimento da cultura mediante análise da biomassa.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as análises estatísticas efetuadas através do software The SAS System 9.1, utilizando-se análises de variância (ANOVA) com modelos fatoriais e teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade do Poli quilgerm® sobre culturas de *L. mesenteroides*, em meio Mayeux e Colmer.

#### Quantificação comparativa da viscosidade

A viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* diminuiu após 24 horas em contato com o produto, e a porcentagem de diminuição foi calculada com base na viscosidade das amostras controle. No primeiro experimento houve 18,13% de diminuição da viscosidade da cultura quando se adicionou 1,0% de Poli quilgerm® e 9,91% quando foi adicionado 2,0% (Fig. 1).

No segundo e terceiro experimentos, realizados em concentrações mais baixas do produto, verificou-se 20,56 e 13,92% de diminuição da viscosidade da cultura quando adicionou-se 1,0% de Poli quilgerm®; e 16,90 e 8,97% quando foi adicionado 0,2%, respectivamente (Fig. 2).

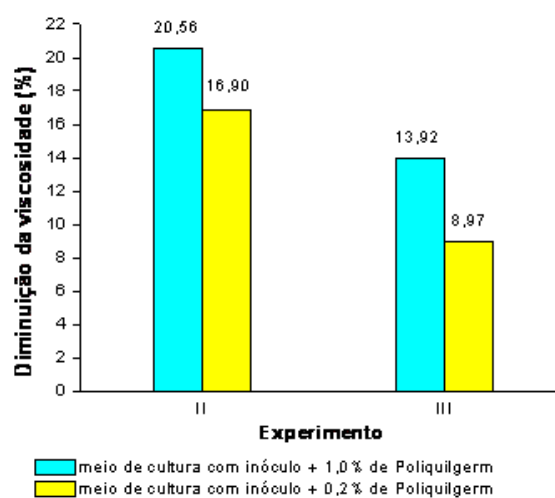


Fig. 2 - Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®.

As concentrações 0,2; 1,0 e 2,0% do produto não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, a concentração 1,0% de Poli quilgerm® foi a que apresentou as maiores porcentagens em diminuição da viscosidade. Pode-se concluir por meio desta análise que a adição de Poli quilgerm® nas culturas de *L. mesenteroides* induz a diminuição da viscosidade do meio, independente da dosagem utilizada.

A viscosidade causada por bactérias lácteas nos fluidos dos processos industriais assume importância quando estes devem ser agitados ou transferidos dos reatores para outros locais na indústria. A presença de alta viscosidade torna os processos energeticamente onerosos e isto reflete no custo geral dos produtos.

### Crescimento da cultura de *L. mesenteroides* mediante quantificação da absorvância

A análise por espectrofotometria na região do visível ( $\lambda = 540$  nm) nos intervalos 0; 6; 20 e 26 horas mostrou diminuição do crescimento do micro-organismo de 53,86, 67,59 e 56,56%, respectivamente, após 6, 20 e 26 horas em contato com 0,2% de Poli quilgerm®. Quando em contato com 1,0% de Poli quilgerm®, verificou-se diminuição do crescimento do micro-organismo de 22,39 e 17,97%, respectivamente após 20 e 26 horas (Fig. 3). A maior diminuição ocorreu em 20 horas para ambas as concentrações do produto, sendo que a menor concentração de Poli quilgerm® (0,2%) mostrou-se mais eficiente para promover o controle de *L. mesenteroides*. Segundo HOLT *et al.* (1986), a sensibilidade do gênero *Leuconostoc* a antibióticos e drogas é desconhecida, visto que nenhuma espécie é confirmada como patogênica.

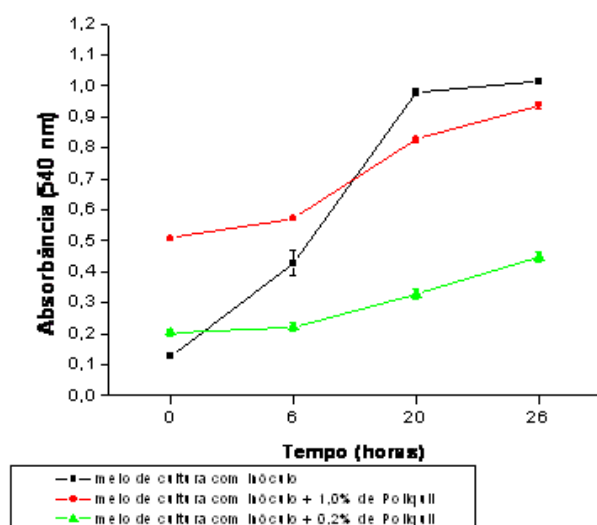


Fig. 3 - Quantificação da absorvância nas culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®.

A análise de variância mostrou que todas as variáveis analisadas apresentaram-se estatisticamente significativas. Os valores de absorvância nas concentrações de 0,0; 0,2 e 1,0% diferiram entre si. A maior média dos valores de absorvância foi obtida na ausência do produto (0,5798 nm), e a menor média na presença de 0,2% de Poli quilgerm® (0,1560 nm). Como a medida de absorvância por espectrofotometria é indicativa de crescimento de micro-organismos, estes resultados mostram o maior crescimento de *L. mesenteroides* na ausência do produto. Com a adição de 0,2% de Poli quilgerm® registrou-se menor crescimento do micro-organismo, indicando ação inibitória do produto adicionado quando presente em menor concentração. Os valores de absorvância também diferiram estatisticamente em relação ao tempo de incubação. A maior média de absorvância e, conseqüentemente o maior crescimento de *L. mesenteroides*, ocorreu no tempo de 26 horas. Verificou-se que o crescimento da bactéria ocorreu gradativamente ao longo do tempo, condição normal na curva de crescimento dos micro-organismos. A presença ou ausência do inóculo apresentou resultado estatisticamente significativo para a variável absorvância, sendo que a maior média foi obtida na presença do inóculo.

É bastante frequente a utilização do ácido sulfúrico, muitas vezes combinado com antibióticos, para combater a contaminação nas dornas de fermentação de indústrias sucroalcooleiras. Os baixos valores de pH (cerca de 2,0 a 3,0) podem diminuir a viabilidade celular da levedura. Quanto maior o tempo de exposição, que varia entre 0,5 a 2 horas, maior o impacto no metabolismo da levedura (LUDWIG, 1998). STUPIELLO (1993) em seu trabalho estudou os agentes antimicrobianos mais utilizados e seu modo de ação sobre bactérias Gram positivas. Como biocidas químicos, a autora encontrou fenol e compostos fenólicos, álcoois, halogênicos e halogenados, metais pesados e seus compostos, corantes, detergentes, composto de amônia quaternária, aldeídos e agentes gasosos. Os antibióticos mais utilizados nos processos fermentativos foram tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina.

OLIVA-NETO; YOKOYA (2001) avaliaram diversos compostos antimicrobianos sobre *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, dentre eles sulfito, nitrito, sulfato de cobre, penicilina V ácida e clindamicina. Vários destes biocidas afetaram seriamente o crescimento de *S. cerevisiae*, nas dosagens similares àquelas que inibiram as bactérias. Os autores concluem que estes produtos deveriam ser evitados ou usados somente em condições especiais; e que para esta etapa o controle de contaminantes por antibióticos é mais efetivo. MENEGHIN *et al.* (2007) avaliaram o dióxido de cloro

como biocida alternativo sobre o fermento: *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, comparando com a ação de Kamoran a 3ppm (indicado pelo fabricante). Obtiveram o mesmo efeito inibidor sobre as bactérias em concentrações que variaram de 50 a 200 ppm de dióxido de cloro. Os autores concluem que o dióxido de cloro deve ser usado com cautela, pois valores maiores que 50 ppm também inibiram a levedura.

### Verificação do crescimento de *L. mesenteroides* em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN

#### Quantificação comparativa da viscosidade

Na Figura 4, verifica-se que houve maior diminuição da viscosidade nos pHs 3,0 e 6,0. As maiores diminuições ocorreram quando se utilizou 1,0% de Poli quilgerm® (8,52% em pH 3,0 e 7,07% em pH 6,0). Em pH 4,0 verificou-se diminuição de 2,69%. Para as culturas com 0,2% de Poli quilgerm®, verificou-se maior diminuição da viscosidade nos pHs 3,0 e 5,0 (5,98 e 3,20%, respectivamente). Houve um pequeno aumento na viscosidade das culturas com 0,2% do produto no pH 4,0 e com 1,0% do produto no pH 5,0 (0,38 e 0,15%, respectivamente).

A Figura 4 indica ainda que *L. mesenteroides* tem sua atividade metabólica ativa nos pHs de 3,0 a 6,0, na temperatura de 33°C. Isso explica a maior formação de dextrana no processo de produção de etanol quando prevalecem essas condições de pH e temperatura.

No mesmo experimento, repetido em temperatura de 28°C, pode-se verificar na Figura 5 que os maiores valores de diminuição da viscosidade também ocorreram nas culturas em pHs 3,0 e 6,0. Em pH 6,0 foram registrados 16,84 e 16,71% de diminuição da viscosidade quando utilizados, respectivamente, 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®, sendo este o melhor resultado em ambos os experimentos. Em pH 3,0, houve 3,24% de diminuição

quando utilizados 0,2% do produto, e 1,78% quando utilizados 1,0%. Em pHs 4,0 e 5,0, os valores encontrados foram baixos, e houve aumento na viscosidade quando utilizou-se 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm® em pH 5,0 (0,54 e 4,20%, respectivamente).

Os dados de diferentes pHs e concentrações de Poli quilgerm® foram analisados através da análise de variância. O teste de Tukey, realizado para os dados de ambos os experimentos, revelou que o parâmetro inóculo foi significativo, e a maior média de viscosidade foi encontrada na presença de inóculo (1,4083 cp a 33°C e 1,4102 cp a 28°C) (Tabela 1). Em relação ao parâmetro pH, os valores de viscosidade não diferiram em valores de pHs 3,0 e 4,0 a 33°C. Por outro lado, os pHs 5,0 e 6,0 diferiram entre si e entre os demais. A 28°C os valores de viscosidade não diferiram nos pHs 4,0 e 6,0, assim como nos pHs 5,0 e 6,0. No entanto, houve diferenças entre os valores de viscosidade nos pHs 4,0 e 5,0, e os valores para pH 3,0 diferiram de todos os demais (Tabela 2). Lembrando que esta análise foi realizada a partir dos valores em viscosidade (cp), razão pela qual apresentou resultados que diferem da observação realizada quando se calculou os valores de porcentagem de diminuição da viscosidade.

O parâmetro concentração de Poli quilgerm® apresentou diferenças significativas para os valores de viscosidade em ambos os experimentos. A 33°C a ausência do produto apresentou a maior média de viscosidade (1,3914 cp) diferindo das demais, que não apresentaram diferenças (1,3744 cp a 0,2% do produto e 1,3592 a 1,0% do produto). A 28°C a ausência e a presença de 1,0% de Poli quilgerm® não apresentaram diferenças estatísticas (1,3904 cp a 0,0% e 1,3838 cp a 1,0% do produto). A presença de 0,2% de Poli quilgerm® foi significativa para os valores de viscosidade, que foram os menores valores encontrados (1,3539 cp) (Tabela 3).

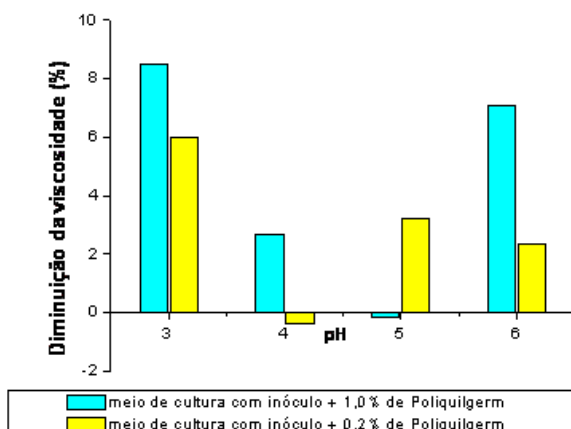


Fig. 4 - Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de Poli quilgerm®, em diferentes pHs a 33°C.

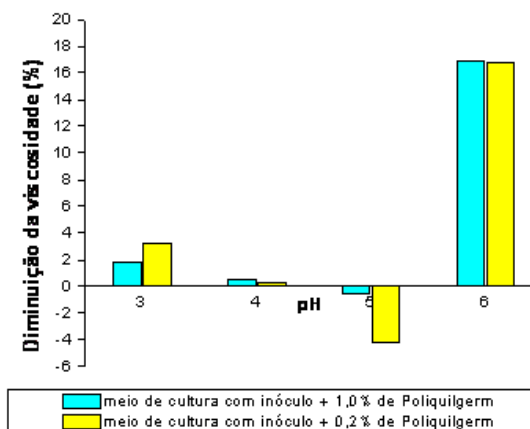


Fig. 5 - Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de Poli quilgerm®, em diferentes pHs a 28°C.

Embora a análise estatística indique não significância entre a temperatura e viscosidade, as Figuras 4 e 5 deixam claro que diferentes pHs e temperaturas podem influenciar a viscosidade do meio.

Tabela 1 - Valores das médias de viscosidade utilizadas na análise estatística (Teste de Tukey), para o parâmetro inóculo.

Inóculo	Valores de viscosidade (cp)	
	média a 33° C	média a 28° C
presente	1,4083	1,4102
ausente	1,3418	1,3418

Tabela 2 - Valores das médias de viscosidade utilizadas na análise estatística (Teste de Tukey), para o parâmetro pH.

pH	Valores de viscosidade (cp)	
	média a 33° C	média a 28° C
3,0	1,4205	1,2843
4,0	1,4121	1,4322
5,0	1,3138	1,3821
6,0	1,3537	1,4055

Tabela 3 - Valores das médias de viscosidade utilizadas na análise estatística (Teste de Tukey), para o parâmetro Concentração.

Concentração do produto (%)	Valores de viscosidade (cp)	
	média a 33° C	média a 28° C
0,0	1,3914	1,3904
0,2	1,3744	1,3539
1,0	1,3592	1,3838

**Análise da biomassa**

A Figura 6 revela que houve maior crescimento da cultura em pHs 6,0 e 5,0, alcançando 12,95 e 7,00 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, respectivamente.

Houve 97,1 e 100% de diminuição do crescimento de *L. mesenteroides* quando utilizados 1,0% de Poli quilgerm® e 98,1 e 99,8% para 0,2% do produto, respectivamente, nos pHs 6,0 e 5,0. Estes resultados evidenciam forte inibição do crescimento de *L. mesenteroides* pelo Poli quilgerm®. Em valores de pH 4,0 e 3,0, o crescimento da bactéria foi menor (0,47 e 0,30 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). O pequeno aumento evidenciado na biomassa da cultura quando se adicionou 1,0% do produto (0,78 e 0,73 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) pode indicar que o Poli quilgerm® teria ação menos efetiva em meio ácido, na temperatura de 33° C.

Os resultados para o crescimento da cultura em 28° C (Fig. 7) mostram, à semelhança da Figura 6, que houve maior crescimento em pHs 6,0 e 5,0, alcançando 6,73 e 6,86 x 10<sup>8</sup> UFC/mL, respectivamente.

No pH 6,0 houve 100% de diminuição do crescimento de *L. mesenteroides* em ambas as concentrações de Poli quilgerm®. Em pH 5,0, houve diminuição de 13,3 e 20,3% quando utilizados 1,0 e 0,2% do produto. Nos valores de pHs 3,0 e 4,0, o crescimento foi menor (0,73 e 0,65 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Houve aumento na biomassa da cultura quando se adicionou 1,0% do produto em pH 3,0 (2,47 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) e quando acrescentou-se 0,2% do produto em pH 4,0 (0,54 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Entretanto, são valores menores de crescimento, uma vez que a cultura encontra-se em condições desfavoráveis de pH.

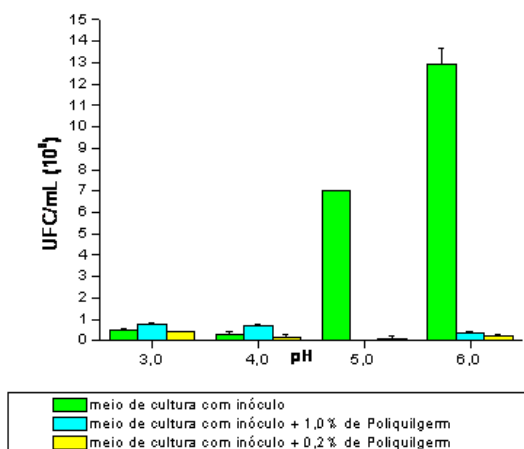


Fig. 6 - Quantificação comparativa da biomassa de *Leuconostoc mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poli quilgerm®, em diferentes pHs a 33° C.

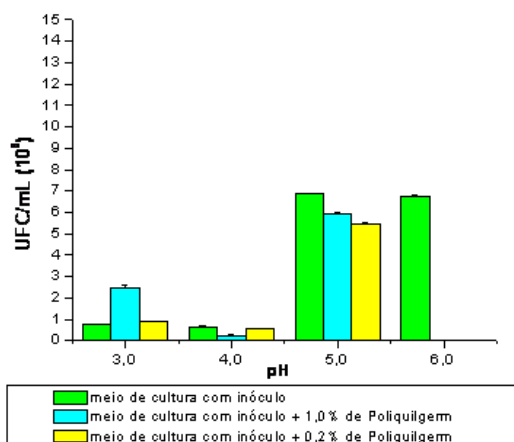


Fig. 7 - Quantificação comparativa da biomassa de *Leuconostoc mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poli quilgerm®, em diferentes pHs a 28° C.

O teste de Tukey realizado para o experimento a 33°C mostrou que apenas os pHs 3,0 e 4,0 não diferiram significativamente em relação à biomassa produzida. A 28°C todos os pHs diferiram entre si, sendo que o maior valor de biomassa foi encontrado em pH 5,0 ( $6,09 \times 10^8$  UFC/mL). Para o parâmetro concentração de Poli quilgerm®, o teste de Tukey mostrou que a ausência do produto foi significativa para o experimento a 33°C, no entanto não houve diferenças entre as concentrações do produto utilizadas (1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®). A 28°C, os resultados foram significativos para todas as concentrações nos diferentes pHs, sendo que a maior média dos valores de biomassa foram encontradas na ausência do produto ( $3,74 \times 10^8$  UFC/mL), seguida de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®, respectivamente ( $2,15$  e  $1,72 \times 10^8$  UFC/mL).

Comparando-se os resultados de crescimento de *L. mesenteroides* nas temperaturas de 33 e 28°C, pode-se inferir que a bactéria tem preferência a temperaturas mais elevadas e que o pH é limitante. O crescimento da bactéria manifestado no pH 3,0 em ambas as temperaturas mostra que a ação do Poli quilgerm® neste pH tem menor eficiência.

Os melhores resultados deste experimento, em temperaturas de 33 e 28°C, foram obtidos quando a cultura de *L. mesenteroides* cresceu em pH 6,0. Neste pH houve maior produção de biomassa e os melhores valores para diminuição da viscosidade quando aplicado Poli quilgerm® (28°C). Nestes experimentos em pHs mais baixos a bactéria tem menor tolerância e produz menos biomassa. No entanto, em temperatura de 33°C, verificou-se os melhores resultados de diminuição da viscosidade em pH 3,0 (Fig. 4), mesmo a bactéria produzindo pouquíssima biomassa (Fig. 6). Uma hipótese é a de que o micro-organismo em condições desfavoráveis de pH seja estimulado para sua defesa em aumentar a produção de dextrana e, conseqüentemente, a viscosidade do meio de cultura.

BREGAGNOLI (2006) verificou que a própolis apresentou o mesmo efeito que a ampicilina quando aplicada com finalidade de combater a contaminação por microrganismos na produção de cachaça. Desse modo, a aplicação de biocidas naturais para combater contaminações em indústrias de fermentação mostra-se potencialmente viável, já que podem ser uma alternativa em substituição aos biocidas já utilizados, economicamente mais onerosos.

BERTOLETTI (2008) verificou que o produto Poli quilgerm® apresenta ação biocida sobre *S. cerevisiae* apenas quando utilizado na concentração de 200 ppm, sendo que até a concentração de 1 ppm a viabilidade da levedura não é afetada a níveis significativos nas primeiras 24 horas. Em *L. fermentum* o produto mostrou ação bactericida na concentração de 50 ppm. Com 24 horas de tempo de contato nesta concentração a inviabilização do crescimento celular foi total. A

autora conclui que o Poli quilgerm® pode ser efetivo no controle de *L. fermentum* e de bactérias contaminantes da fermentação etanólica, uma vez que a diminuição na produção de ácido láctico atingiu cerca de 50% na concentração de 0,5 ppm do biocida e 90% em 20 ppm. Além disso, verificou que o rendimento alcoólico não é prejudicado com a adição do produto.

## CONCLUSÕES

O acréscimo de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poli quilgerm® provocou diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* após 24 horas, tanto em meio Mayeux e Colmer como em meio CSN. Verificou-se inibição do crescimento da bactéria quando se utilizou a menor concentração do produto (0,2%) após as primeiras 6 horas, e após 20 horas em contato com 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm®. Em meio de cultivo com pH 3,0 e 4,0, *L. mesenteroides* sofre menor inibição do crescimento em 28 e 33°C, evidenciando ação menos efetiva do produto sobre a bactéria em valores de pH baixos.

Estes resultados mostram que o produto Poli quilgerm® pode vir a ser uma alternativa no controle de contaminações por *L. mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras, já que se mostrou eficaz no controle do crescimento da bactéria nas primeiras 6 horas. A diminuição da viscosidade também assume importância na medida em que os experimentos evidenciaram ação do produto em valores de pH 3,0, condição frequente no processo de fermentação do etanol.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e ao Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (GQATP) do Instituto de Química da USP de São Carlos que, coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, gentilmente cedeu o produto para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

BERTOLETTI, A.C.D.; SANTOS, A.M.; ANGELIS, D.F.; CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. Viabilidade de *Candida albicans* CCT 0776 *in vitro* sob atividade antimicrobiana do Poli quilgerm® derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona). In: ENCONTRO DE BIÓLOGOS DO CONSELHO REGIONAL DE BIOLOGIA – 1, 15., 2004, São Pedro. *Resumos*. São Pedro: 2004. p.142. res. 11.28.

BERTOLETTI, A.C.D. *Ação biocida do Poli quilgerm® derivado do óleo de Ricinus communis* L. (mamona) sobre

- bactérias contaminantes da fermentação etanólica*. 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- BOLSON, J.; SCHOSLER, J.E.; ORNES, R.C.; MOTTIN, V.; ALBERTI, T. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). *Ciência Rural*, v.35, n.5, p.1123-1130, 2005.
- BREGAGNOLI, F.C.R. *Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça*. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- CHIERICE, G.O.; CLARO-NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). *O agronegócio da mamona no Brasil*. Brasília: Embrapa, 2001. cap.5.
- FERREIRA, C.M. *Atividade antimicrobiana. Estudo "in vivo" da atividade antimicrobiana do gel de papaína a 0,4%, detergente de mamona a 10%, hipoclorito de sódio a 0,5% utilizados como soluções irrigantes em Endodontia*. 1996. 85f. Monografia (Residência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.
- GALLO, C.R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica*. 1989. 388 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.
- GUERRA, E.J. *Isolamento de bactérias contaminantes da fermentação etanólica que induzem a floculação de Saccharomyces cerevisiae e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos*. 1995. 150 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- HOLT, J.G.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; SNEATH, P.H.A. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2.
- LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B.; FILHO, M.T.; BONIFÁCIO, K.C.; ITO, I.Y. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *Journal of Endodontics*, v.27, n.12, p.717-719, 2001.
- LUDWIG, K.M. *Floculação de Saccharomyces cerevisiae – caracterização e ação de enzimas desfloculantes*. 1998. 134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- MAYEUX, J.V.; COLMER, A.R. Selective medium for *Leuconostoc* detection. *Journal of Bacteriology*, v.81, n.6, p1009-1011, 1961.
- MENEGHIN, S.P.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Avaliação do emprego de dióxido de cloro como antibacteriano na fermentação alcoólica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007. Curitiba. *Anais*. Curitiba: 2007. 7p. 1 CD ROM.
- MESSETTI, M.A.; SANTOS, A.M.; ANGELIS, D.F.; DALFRÉ, I.A.B.; CHIERICE, G.O.; CLARO NETO, S. Viabilidade de *Escherichia coli* CCT 1457 *in vitro* sob atividade antimicrobiana do Poliulgerm® derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona). In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL – “DESAFIOS E OPORTUNIDADES NA AMÉRICA DO SUL”, 2005, Campinas. *Resumos*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 1 CD-ROM.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.10-14, 2001.
- OLIVEIRA, M.G.R. *Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona*. 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- REZENDE, C.M.F.; SILVA, M.C.; LARANJEIRA, M.G.; BORGES, A.P.B. Estudo experimental do poliuretano de óleo de mamona (*Ricinus communis*) como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.6, p.695-700, 2001.
- RODINI, M.A.T. *Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol*. 1985. 92f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.
- ROSALES, S.Y.R. *Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes*. 1989. 200 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.
- SILVA FILHO, E.A. *Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo e bactérias e leveduras contaminantes*. 1993. 65f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.
- STUPIELLO, M. G. *Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente às bactérias gram (+) isoladas da fermentação alcoólica*. 1993. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

Recebido em 5/2/09

Aceito em 14/4/10