

**ESTUDO DO COMPOSTO DERIVADO
DO ÓLEO DE *RICINUS COMMUNIS* L. (MAMONA) SOBRE
BACTÉRIA E BIOPOLÍMERO DA FERMENTAÇÃO
ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas (Área de
concentração: Microbiologia
Aplicada).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2008**

**ESTUDO DO COMPOSTO DERIVADO
DO ÓLEO DE *RICINUS COMMUNIS* L. (MAMONA) SOBRE BACTÉRIA
E BIOPOLÍMERO DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

MARIANE APARECIDA MESSETTI

Orientador: Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Co-orientadora: Prof. Dra. ANTONIA MARLI DOS SANTOS

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas (Área de
concentração: Microbiologia
Aplicada).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Março de 2008**

547.29 Messetti, Mariane Aparecida

M584e Estudo do composto derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) sobre bactéria e biopolímero da fermentação etanólica / Mariane Aparecida Messetti. – Rio Claro : [s.n.], 2008

127 f. : il., tabs, gráfs., figs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

Co-orientador: Antonia Marli dos Santos

1. Fermentação. 2. Poliquilgerm. 3. Dextrana. 4. *Leuconostoc mesenteroides*. 5. Mamona I. Título.

*A meus pais, pelo incentivo e apoio
incondicional*

Dedico

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por toda a força e confiança que depositou em mim, não me abandonando em nenhum momento da minha vida.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Dejanira de Franceschi de Angelis, que me acolheu no Depto. de Bioquímica e Microbiologia e me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço ainda por estar presente em todas as etapas durante a orientação e por todos os ensinamentos transmitidos.

A minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Antonia Marli dos Santos, pelo apoio, incentivo e pelas críticas e sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos Profs. Gilberto Orivaldo Chierice e Salvador Claro Neto, por gentilmente terem cedido o composto derivado do óleo de mamona (Poliquilgerm[®]) para a realização deste trabalho. As palavras de apoio durante a realização desta pesquisa serviram como estímulo para minha curiosidade científica e consequentemente, para me empenhar ainda mais.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, por gentilmente ceder o microrganismo necessário à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Naves Domingos, por ter aceitado minha orientação no início deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Antonio Carlos Simões Pião, por estar sempre disponível em ajudar. Com um sorriso, torna as coisas que antes pareciam complicadas em coisas simples. Devo a ele, todas as análises estatísticas presentes neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.

A todos os docentes e funcionários do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da Unesp Rio Claro, que estiveram sempre prontos a me ajudar em qualquer dificuldade.

A todos os técnicos dos laboratórios do Depto., em especial à Inês, Luiza e Beto, cujos ensinamentos, paciência e disponibilidade em ajudar enriqueceram em muito este trabalho, além de terem se tornado verdadeiros companheiros.

As bibliotecárias da Unesp, pela orientação e pelo atendimento prestado.

A Dilza Nalin, agradeço por tudo, você não imagina o quanto ajudou!

Aos demais alunos do Curso de Pós-Graduação e colegas de Departamento; meu agradecimento por colaborarem com a realização deste trabalho, cada um a sua maneira.

Aos amigos que fiz nesses dois anos, cujas lembranças levarei por toda a vida.

Agradeço também aos colegas da Unesp de Assis, em especial à Kassandra Mustafe, por ter se mostrado uma pessoa especial, na medida em que mesmo sem me conhecer direito, ofereceu sua amizade e gentilmente se dispôs a realizar as análises que faltavam. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, pela dedicação na correção do meu relatório, cujas dicas me ajudaram muito na elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, por tudo que me ensinaram nestes 27 anos. Por ensinarem que a vida deve ser vivida com honestidade, profissionalismo e acima de tudo, humildade.

A minha família, que sempre me incentivou. Passamos por momentos muito difíceis neste período, mas como Deus sempre orienta nossas vidas por um propósito, nossa família se tornou mais forte e mais unida.

Ao meu companheiro em todos os momentos, Janiel. Sempre me incentivando a seguir em frente, superando os obstáculos e me dando forças; contribuiu ativamente para a realização deste trabalho, com seu amor, dedicação, carinho, e alguns puxões de orelha de vez em quando... Desejo que você continue seguindo com fé pelo caminho que escolheu, com a mesma força que transmitiu a mim. Muito obrigada, de coração!

A todos os quais não citei nomes, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

Olhem meu corpo

*Olhem meu corpo e pensem:
Quantos espaços alcançam meus braços?
Quantos metros andam minhas pernas?
Talvez aí estejam meus limites.
Talvez aí estejam minhas finitudes.
Bem se falam de altitudes e latitudes.
Estes chegares da ciência e do avanço.
Eu estou no lugar que posso.
Eu estou no lugar que alcanço.*

Ulisses Tavares (2006)

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Contaminantes da fermentação etanólica.....	4
3.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> e a produção de dextrana.....	6
3.3. Antissépticos empregados na fermentação industrial.....	8
3.4. Derivados do óleo de mamona (<i>Ricinus communis</i>).....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Material.....	16
4.1.1. Microrganismos.....	16
4.1.2. Meios de cultura.....	16
4.1.3. Derivado do óleo de mamona - Poliquilgerm [®]	18
4.1.4. Reagentes.....	18
4.1.5. Vidraria e equipamentos.....	19
4.1.6. Kit enzimático LABORLAB.....	19
4.1.7. Ácido dinitroacetilsalicílico (ADNS, Miller).....	19
4.2 Métodos.....	19
4.2.1. Método de preparo dos meios de cultura.....	19
4.2.2. Método de preparo dos reagentes.....	21
4.2.3. Manutenção das linhagens de microrganismos.....	22
4.2.3.1. Preparo das culturas para os ensaios.....	22
4.2.4. Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm [®] sobre dextrana.....	22
4.2.4.1. Quantificação da viscosidade segundo o método de Cannon-Fenske.....	22

4.2.4.1.1. Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana.....	23
4.2.4.1.2. Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm [®]	24
4.2.4.2. Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm [®]	24
4.2.4.2.1. Mediante ensaio de glicose oxidase.....	24
4.2.4.2.2. Mediante o método ADNS para determinação de ART.....	25
4.2.5. Verificação da atividade do Poliquilgerm [®] sobre as culturas de <i>L. mesenteroides</i>	27
4.2.5.1. Em meio de cultura Mayeux e Colmer.....	27
4.2.5.1.1. Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm [®]	27
4.2.5.1.2. Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> por espectrofotometria.....	28
4.2.5.2. Em meio de cultura CSN.....	28
4.2.5.2.1. Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> em diferentes pHs e temperaturas.....	28
4.2.5.2.2. Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs e temperaturas.....	29
4.2.5.2.3 - Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> por espectrofotometria, através de análise da biomassa.....	29
4.2.6. Verificação da atividade do Poliquilgerm [®] sobre cultura mista (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), em meio CSN.....	33
4.2.6.1. Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®]	34

4.2.6.2. Quantificação da viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante contagem de células em câmara de Neubauer.....	34
4.2.6.3. Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> mediante plaqueamento pela técnica Pour Plate.....	35
4.2.7. Verificação da atividade do Poliquilgerm® diretamente sobre parede celular de bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras.....	35
4.2.8 - Delineamento Estatístico.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1. Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm® sobre dextrana.....	38
5.1.1. Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana.....	38
5.1.2. Quantificação comparativa da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm®, nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	41
5.1.2.1. Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm® mediante teste enzimático de glicose oxidase.....	45
5.1.3. Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm®, nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	47
5.1.3.1. Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm® mediante método de ácido dinitroacetilsalicílico (ADNS).....	49
5.2. Verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	52
5.2.1. Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> no mesmo meio acrescido de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm®	52
5.2.2. Quantificação da absorbância das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em meio Mayeux e Colmer nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®	59
5.2.3. Verificação do crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.....	61

5.2.4. Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.....	62
5.2.5. Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> por espectrofotometria, através de análise da biomassa.....	67
5.3. Verificação da atividade do Poliquilgerm [®] sobre cultura mista (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), em meio CSN.....	73
5.3.1. Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®]	73
5.3.2. Quantificação da viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> através de contagem de células em câmara de Neubauer.....	76
5.3.3. Verificação do crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> através de plaqueamento pela técnica Pour Plate.....	80
5.4. Verificação da atividade do Poliquilgerm [®] diretamente sobre parede celular de bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras.....	83
6. CONCLUSÕES.....	89
7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
9. ANEXO A.....	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura de um segmento de molécula de dextrana contendo cinco glicoses.....	7
Figura 2: Reta padrão de glicose: Absorbância (540 nm) x Concentração de glicose (mg/mL).....	26
Figura 3: Varredura espectral da cultura de <i>L. mesenteroides</i> em meio CSN.....	30
Figura 4: Absorbância (nm) x Unidades formadoras de colônias (UFC/mL x 10 ⁸) da bactéria <i>L. mesenteroides</i> (Reta Padrão).....	32
Figura 5: Absorbância (nm) x Concentração de glicose (mg/mL) (Reta Padrão).....	37
Figura 6: Quantificação comparativa da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0% medidas a 21±1°C.....	39
Figura 7: Quantificação comparativa da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	40
Figura 8: Quantificação comparativa da viscosidade das soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% após o acréscimo de 3,3% de Poliquilgerm [®] , medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	43
Figura 9: Quantificação comparativa da viscosidade das soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% após o acréscimo de 13,3% de Poliquilgerm [®] , medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	43
Figura 10: Quantificação comparativa das médias de viscosidade de todas as soluções de dextrana (70.000 Da) após o acréscimo de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm [®] , medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	44
Figura 11: Variação da viscosidade de todas as soluções de dextrana (70.000 Da), na ausência e presença de Poliquilgerm [®] , ao longo dos tempos 0; 24; 48 e 72 horas.....	45
Figura 12: Quantificação comparativa da viscosidade de solução de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% após o acréscimo de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm [®] , medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	48

Figura 13: Variação da viscosidade de soluções de dextrana (60-90.000 Da) na ausência e presença de Poliquilgerm® ao longo dos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	49
Figura 14: Quantificação comparativa da glicose (mg/mL) pelo método de ADNS, em solução de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% após o acréscimo de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm®, nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	51
Figura 15: Variação da glicose liberada (mg/mL) em todas as soluções de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0%, na ausência e presença de Poliquilgerm®, ao longo dos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	51
Figura 16: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm® (experimento I).....	53
Figura 17: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm® (experimento I).....	54
Figura 18: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento II).....	55
Figura 19: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento II).....	56
Figura 20: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento III).....	57
Figura 21: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento III).....	58
Figura 22: Quantificação da absorbância nas culturas de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®	60
Figura 23: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C.....	63
Figura 24: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 28°C.....	65

Figura 25: Valores médios de viscosidade encontrados em todas as amostras, em diferentes pHs.....	66
Figura 26: Valores médios de viscosidade encontrados em todas as amostras, em diferentes concentrações de Poliquilgerm®	67
Figura 27: Quantificação comparativa da biomassa de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C.....	68
Figura 28: Quantificação comparativa da biomassa de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 28°C.....	70
Figura 29: Indicação da turvação da cultura de <i>L. mesenteroides</i> ressuspensa em água destilada para demonstrar a efetiva ação inibitória do Poliquilgerm® (amostras em triplicata de experimento em pH 6,0 a 28°C).....	71
Figura 30: Valores médios de biomassa encontrados em todas as amostras, em diferentes concentrações de Poliquilgerm®, em experimento realizado a 28°C.....	72
Figura 31: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm®, medida através do método de Cannon-Fenske.....	74
Figura 32: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm®, medida através de viscosímetro Brookfield.....	74
Figura 33: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas mistas tratadas com Poliquilgerm®, medidas em diferentes viscosímetros.....	75
Figura 34: Porcentagem comparativa da viabilidade das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas.....	77
Figura 35: Porcentagem comparativa de brotamento das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas.....	78
Figura 36: Porcentagem comparativa da viabilidade dos brotos das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas.....	79
Figura 37: Quantificação comparativa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL 10 ⁶) encontradas no plaqueamento de <i>L. mesenteroides</i> na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas.....	81

Figura 38: Valores médios de glicose (mg/mL) encontrados ao longo do tempo para os diferentes microrganismos, na ausência e presença de 0,1 e 0,2% de Poliquilgerm [®] , submetidos ao tratamento em autoclave.....	86
Figura 39: Valores médios de glicose (mg/mL) encontrados ao longo do tempo para os diferentes microrganismos, na ausência e presença de 0,1 e 0,2% de Poliquilgerm [®] , que não foram submetidos ao tratamento em autoclave.....	87

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Protocolo do ensaio experimental de quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm®	24
Tabela 2: Quantidades de reativos para ensaio de glicose oxidase.....	25
Tabela 3: Protocolo para elaboração da reta padrão de glicose.....	26
Tabela 4: Protocolo do ensaio experimental de quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura inoculado com <i>L. mesenteroides</i> acrescido de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm®	27
Tabela 5: Protocolo de ensaio de verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> em diferentes pHs e temperaturas.....	28
Tabela 6: Protocolo do ensaio experimental de quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN em diferentes pHs inoculado com <i>L. mesenteroides</i> acrescido de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®	29
Tabela 7: Diluições da biomassa ressuspensa e respectivos valores de absorbância encontrados em comprimento de onda 440 nm.....	31
Tabela 8: Valores de absorbância final encontrados para as diferentes diluições da biomassa ressuspensa e valores de UFC/mL correspondentes.....	32
Tabela 9: Protocolo do ensaio experimental de verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre cultura mista, em meio de cultura CSN a pH 6,0.....	33
Tabela 10: Protocolo do ensaio experimental de verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre parede celular de microrganismos.....	36
Tabela 11: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0% medidas a 21±1°C.....	38
Tabela 12: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	39
Tabela 13: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 2,0 e 3,0% acrescidas de 3,3% de Poliquilgerm® e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	41

Tabela 14: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 2,0 e 3,0% acrescidas de 13,3% de Poliquilgerm [®] e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	42
Tabela 15: Quantificação da glicose (mg/mL) em soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% na ausência e presença de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm [®] , nos tempos 0; 24; 48 e 72 horas.....	46
Tabela 16: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% acrescidas de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm [®] e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	47
Tabela 17: Quantificação da glicose (mg/mL) em soluções de dextrana (60-90.000 Da) a 2,0% na ausência e presença de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm [®] , nos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	50
Tabela 18: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm [®] (experimento I).....	52
Tabela 19: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm [®]	53
Tabela 20: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] (experimento II).....	54
Tabela 21: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm [®]	55
Tabela 22: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] (experimento III).....	56
Tabela 23: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de <i>L. mesenteroides</i> acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm [®]	57
Tabela 24: Quantificação da absorbância das culturas de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] nos tempos 0; 6; 20 e 26 horas.....	59
Tabela 25: Verificação de crescimento das culturas por turbidez.....	61

Tabela 26: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs a 33°C.....	62
Tabela 27: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN e das culturas de <i>L. mesenteroides</i> no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs a 28°C.....	64
Tabela 28: Quantificação comparativa da biomassa de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs a 33°C.....	68
Tabela 29: Quantificação comparativa da biomassa de <i>L. mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs a 28°C.....	69
Tabela 30: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm [®] , medida através do método de Cannon-Fenske.....	73
Tabela 31: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm [®] , medida através de viscosímetro Brookfield.....	73
Tabela 32: Viabilidade das células de levedura (em porcentagem), na ausência e presença de Poliquilgerm [®] nos tempos 0 e 24 horas.....	76
Tabela 33: Porcentagem de brotamento das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm [®] nos tempos 0 e 24 horas.....	76
Tabela 34: Viabilidade dos brotos (em porcentagem) das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm [®] nos tempos 0 e 24 horas.....	76
Tabela 35: Quantificação comparativa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL 10 ⁶) encontradas no plaqueamento de <i>L. mesenteroides</i> na ausência e presença de Poliquilgerm [®] nos tempos 0 e 24 horas.....	81
Tabela 36: Quantificação comparativa dos valores médios de glicose (mg/mL) encontrados para bactérias submetidas a dois tratamentos e a diferentes concentrações de Poliquilgerm [®] ao longo do tempo.....	84
Tabela 37: Quantificação comparativa dos valores médios de glicose (mg/mL) encontrados para leveduras submetidas a dois tratamentos e a diferentes concentrações de Poliquilgerm [®] ao longo do tempo.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

mL – mililitro(s)

mg – miligrama(s)

cm³ – centímetro(s) cúbico(s)

kDa – Kilo Dalton

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

ART – Açúcares Redutores Totais

ADNS – Ácido dinitroacetilsalicílico

CSN – Caldo-de-cana Suplementado com Nutrientes

MRS - Meio para Lactobacillus segundo Man, Rogosa e Sharpe

PCA – Plate Count Agar

MW - molecular weight (massa molecular)

λ - comprimento de onda

POL - Poliquilgerm[®]

RESUMO

Das sementes da mamona extrai-se o óleo de rícino, aplicado *in natura* ou em sua forma modificada nas áreas médica, farmacêutica e industrial. Um de seus derivados químicos - o Poliquilgerm[®] - evidencia propriedades antifúngicas sobre *Candida albicans* e bacteriostática/bactericida sobre *Escherichia coli* ao nível de 99,9%. Considerando-se estas propriedades aplicou-se o Poliquilgerm[®] em culturas de *Leuconostoc mesenteroides*, uma bactéria contaminante freqüente dos mostos em indústrias sucro-alcooleiras. Esta bactéria quando contaminante de mostos produz além do ácido láctico a dextrana, um polímero de glicose de consistência gelatinosa que aumenta a viscosidade dos fluidos dos processos. Devido a estas características, no presente trabalho avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do Poliquilgerm[®] sobre a viscosidade de soluções de dextrana, bem como em culturas de *L. mesenteroides*. Analisando-se as soluções de dextrana em contato com o produto conclui-se que o Poliquilgerm[®] não induziu hidrólise nas ligações glicosídicas da dextrana. O produto nas concentrações de 1,0 e 0,2% inibiu o crescimento de *L. mesenteroides* alcançando até 100% em ambas as concentrações, evidenciado por quantificação da biomassa e confirmado mediante plaqueamento por técnica Pour Plate, onde a inibição foi de 98% na diminuição das UFC/mL após 24 horas em contato com 1,0% do produto. Em relação à viscosidade da cultura, verificou-se até 20,56% de diminuição quando utilizados 1,0% do produto. Em cultura mista (*L. mesenteroides* e *S. cerevisiae*), registrou-se até 6,8% de diminuição da viscosidade. Verificou-se que *S. cerevisiae* apresenta sensibilidade ao Poliquilgerm[®] nas concentrações 1,0 e 0,2% apenas no tempo inicial, pois após 24 horas a cultura atinge o mesmo nível de crescimento do controle, adaptando-se à presença do produto. Estudou-se a atividade hidrolítica do Poliquilgerm[®] na liberação de ART de células vivas e mortas de *L. fermentum*, *E. coli*, *S. cerevisiae* e *C. albicans*, submetidas a centrifugação e lavagem das células. Os resultados foram insignificantes quanto ao ART liberado. Somando-se a isto a não hidrólise da dextrana, pode-se inferir que a ação do Poliquilgerm[®] possa estar interferindo em outro sítio celular para induzir a morte das células.

Palavras-chaves: Poliquilgerm[®], dextrana, *Leuconostoc mesenteroides*

ABSTRACT

Castor-oil, extracted from seeds of *Ricinus communis* L., is normally applied *in natura* or in its modified form in medical, pharmaceutical and industrial areas. One of its chemical derivatives – the Poliquilgerm[®] - showed antifungal properties on *Candida albicans*, and bacteriostatic/bactericide ones on *Escherichia coli* reaching 99.9%. Considering these features, Poliquilgerm[®] was applied in cultures of *Leuconostoc mesenteroides*, a frequent contaminant bacterium of musts on sugar and alcohol industries. This bacterium when contaminant of must produce beyond lactic acid the dextran, a polymer of glucose, with gelatinous consistency which may increase the operation fluids viscosity. Due to these characteristics, in the present study, the effect of different concentrations of Poliquilgerm[®] on viscosity of dextran's solutions and on cultures of *L. mesenteroides* was evaluated. Analyzing the solutions of dextran in contact with the product, it was concluded that it did not induce hydrolysis on glycosidic links. The product in concentrations of 1.0 and 0.2% inhibited the growth of *L. mesenteroides* reaching up to 100% in both concentrations, as evidenced by biomass quantification and confirmed by plating by Pour Plate technique, which inhibition was 98% of decrease in the CFU / mL after 24 hours in contact with 1.0% of the product. In relation to the culture viscosity, it was observed 20.56% of reduction when it was used 1.0% of the product. In mixed culture (*L. mesenteroides* and *S. cerevisiae*), it was registered up to 6.8% of decrease in viscosity. It was observed that *S. Cerevisiae* shows sensitivity to 1.0 and 0.2% concentrations of Poliquilgerm only at the initial time, because after 24 hours the culture reaches the same level of growth control, getting adapted to the presence of the product. It was studied the Poliquilgerm hydrolytic activity on release of ART from live and dead cells of *L. fermentum*, *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. albicans*, submitted to centrifugation and washing of cells. The results were insignificant to ART released. This, allied with the no hydrolysis of dextran, can suppose that the action of Poliquilgerm[®] could be interfering in another cell site to induce the death of cells.

Key-words: Poliquilgerm[®], dextran, *Leuconostoc mesenteroides*

1. INTRODUÇÃO

A fermentação etanólica industrial no Brasil processa-se em condições não assépticas, facilitando a contaminação bacteriana. Os contaminantes bacterianos constituem um dos maiores problemas operacionais e econômicos da indústria. Com a reutilização de células de levedura para aumentar a produtividade, quando os contaminantes estão presentes a situação tende a se agravar, pois ocorre concentração de células tanto de leveduras como de bactérias. As bactérias frente à riqueza do mosto podem realizar fermentações secundárias, concorrendo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo açúcar disponível produzindo metabólitos indesejáveis.

Dentre os metabólitos que mais comprometem a fermentação etanólica encontram-se aqueles provenientes da fermentação láctica. Durante o processo de fermentação as bactérias lácticas produzem consideráveis quantidades de ácido láctico, propiciando a morte das células de levedura, além de sintetizarem polímeros de glicose. As células mortas de levedura liberam compostos que promovem o crescimento das bactérias lácticas. Quanto aos polímeros o mais freqüente é a dextrana, que causa prejuízos físicos (aumento da viscosidade, com conseqüente entupimento dos trocadores de calor, tubulações e centrífugas), e danos para a levedura. Algumas bactérias lácticas como *Lactobacillus fermentum* induzem a floculação de *S. cerevisiae*, diminuindo o número de células ativas no mosto. As células floculadas têm em geral a sua viabilidade comprometida, uma vez que a conversão máxima do açúcar em etanol e gás carbônico

depende do número de células dispostas no meio e não floculadas. Todos estes fatores conduzem a prejuízos econômicos, pois o rendimento fermentativo diminui.

Dentre as bactérias lácticas, *Leuconostoc mesenteroides* destaca-se como um dos contaminantes mais freqüentes no processo de fermentação industrial, produzindo além do ácido láctico a dextrana. A dextrana é um polímero de glicose e consiste em uma massa gelatinosa transparente conhecida na indústria como “goma” ou “canjica”.

Para controlar a contaminação bacteriana, muitas técnicas vêm sendo utilizadas, como aplicação de ácido sulfúrico para baixar o pH e favorecer a desfloculação, antibióticos, biocidas, entre outras.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do derivado químico do óleo de mamona (Poliquilgerm[®]) diretamente sobre soluções padrão de dextrana, a fim de verificar sua capacidade de hidrólise através da liberação de glicose e conseqüente diminuição da viscosidade;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Poliquilgerm[®] sobre *L. mesenteroides*, com relação às mudanças de viscosidade dos meios de cultura e a verificação do crescimento da bactéria através de diferentes metodologias.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Poliquilgerm[®] sobre cultura mista de *L. mesenteroides* e *S. cerevisiae*, simulando as condições de fermentação; avaliando-se a viscosidade do meio de cultura, a viabilidade da levedura e o crescimento de *L. mesenteroides*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Poliquilgerm[®] diretamente sobre parede celular de bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras, a fim de verificar sua possível ação hidrolítica na parede celular de microrganismos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Contaminantes da fermentação etanólica

A contaminação bacteriana na indústria de fermentação etanólica 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). *Leuconostoc* e outros microrganismos estão presentes no interior de pedaços de cana e nos glóbulos de caldo exsudado após a queima, fendas, perfurações causadas por insetos e a área abaixo da bainha, que são considerados os principais sítios do desenvolvimento microbiano. Pode-se verificar que a produção de dextrana, com conseqüente consumo do açúcar tem início logo após o corte da cana. A carga microbiana presente na cana-de-açúcar, juntamente com as bactérias originárias do solo aderido aos colmos, folhas e raízes vão para as moendas, constituindo a flora bacteriana dos caldos (RODINI, 1985). A água de lavagem da cana utilizada na indústria também constitui outro foco de entrada dos contaminantes no processo.

Como a fermentação alcoólica é realizada sem esterilização do mosto, diferentes microrganismos podem ser selecionados durante cada etapa do processo de produção de álcool, devido às diferentes condições (ROSALES, 1989). De acordo com Gallo (1989) o caldo de cana é considerado um ótimo substrato para os microrganismos, devido aos nutrientes orgânicos e inorgânicos que apresenta, além de água, temperatura e pH favoráveis. O pH relativamente baixo dos caldos das moendas durante o processo de

fermentação industrial favorece o crescimento de microrganismos acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (BEVAN e BOND, 1971; SHARPE et alii, 1972; TILBURY, 1975 apud RODINI, 1985). Algumas bactérias produzem metabólitos alterando as características químicas (pH, acidez), físicas (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). Sendo assim, a contaminação bacteriana durante o processo fermentativo pode ocasionar perdas no rendimento alcoólico, devido à floculação e perda do fermento, consumo de sacarose e produção de metabólitos indesejáveis, além de outros inconvenientes (GALLO, 1989).

O grupo das bactérias Gram-positivas é o que propicia mais problemas durante o processo fermentativo. Este fato pode estar associado à constituição da parede celular das bactérias Gram-negativas ser rica em lipídeos, os quais são facilmente solubilizados em álcool, presente nas dornas de fermentação. Isto foi constatado em diversos trabalhos, nos quais predominam microbiota Gram-positiva (STUPIELLO, 1993; ROSALES, 1989). Gallo (1989), em levantamento da microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica, verificou que a flora bacteriana predominante mostrou-se Gram-positiva (98,52%), de bastonetes Gram-positivos (85,28%) e de bactérias não esporuladas (73,95%). Os gêneros bacterianos mais frequentes foram *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%). Rosales (1989) verificou em seu trabalho que das 222 culturas isoladas 75,63% apresentaram-se como Gram-positivas, 92,13% utilizaram a sacarose e 49,55% produziram biopolímeros (gomas). De todas as bactérias identificadas, os gêneros predominantes do processo de fermentação foram *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

Guerra (1995) isolou quatro linhagens de microrganismos contaminantes da fermentação etanólica responsáveis pela floculação do fermento. O autor verificou, mediante a separação da biomassa do líquido sobrenadante, que o agente indutor da floculação são as próprias células bacterianas e não possíveis compostos originados do metabolismo. Verificou ainda que as bactérias na fermentação, além de induzirem a floculação do fermento, também promoviam diminuição do pH, teor alcoólico, porcentagem do fermento, quando as quatro linhagens de bactérias estavam associadas, após 39 horas de fermentação.

As bactérias contaminantes podem concorrer com a levedura *S. cerevisiae* pelo açúcar disponível, realizando fermentações secundárias que resultam na produção de outros sub-produtos que não o álcool. A fermentação láctica é realizada por várias bactérias, sendo a maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Podem ocasionar a produção de ácidos (lático, butírico, fórmico e acético), etanol e dióxido de carbono, além da síntese de polímeros de glicose.

3.2 – *Leuconostoc mesenteroides* e a produção de dextrana

De acordo com Holt et al. (1986), o gênero *Leuconostoc* é formado por bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, imóveis, que não formam esporos. As células geralmente ocorrem em pares ou em cadeias, podendo ser esféricas, mas são geralmente lenticulares quando estão crescendo em ágar. Suas colônias são pequenas e circulares, lisas, branco acinzentadas. Estas bactérias possuem temperatura ótima entre 20 e 30°C e o crescimento ocorre entre 5°C e 30°C. Quimioorganotróficas, requerem um meio rico geralmente com fatores de crescimento e aminoácidos. Seu crescimento é dependente da presença de um carboidrato fermentescível. A glicose e a frutose são utilizadas por todas as espécies de *Leuconostoc*, mas frutose é metabolizada preferencialmente, com exceção de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Não é patogênica para plantas e animais (incluindo o homem). Linhagens que possuem dextrana na parede celular contêm dextrana-sacarase e a estrutura da parede celular é afetada por crescimento em caldo de sacarose, no que as linhagens diferem em seu metabolismo. Apesar do material capsular ser aparente em algumas linhagens, uma cápsula bacteriana verdadeira não é formada. O crescimento não é rápido. As linhagens ativas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* tem o menor tempo de geração e bom crescimento, podendo ser obtidas em 24 horas de incubação a 30°C. Estas bactérias são encontradas em plantas e em menor extensão no leite e produtos do leite. Espécies formadoras de dextrana ocorrem em cana-de-açúcar e beterraba açucareira onde podem causar muitas perdas. A sensibilidade a antibióticos e a drogas não constitui preocupação, visto que nenhuma espécie é patogênica.

L. mesenteroides produz a dextrana, que é um homopolissacarídeo da glicose formado predominantemente por ligações glicosídicas α -(1,6) (Figura 1). Este polímero

é produzido por bactérias crescendo em meio de sacarose. Muitos microrganismos produzem dextrana, mas somente aquela sintetizada por *L. mesenteroides* e *L. dextranicum* tem sido empregada comercialmente. A dextrana natural geralmente possui alta massa molecular, cerca de 40 a 50 milhões de Daltons. A dextrana bruta pode ser isolada da cultura mediante precipitação com metanol/etanol. A dextrana de massa molecular 40 kDa pode ser produzida a partir de *L. mesenteroides* em sacarose. A síntese de dextrana ocorre a partir de uma enzima extracelular, uma glicosiltransferase (dextrana-sacarase) (WINDHOLZ et al., 1976). A dextrana-sacarase é uma enzima extracelular, 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. Existem muitos estudos que visam a otimização da produção de dextrana industrialmente, e suas novas aplicações. Possui aplicações em diversas áreas, como por exemplo nas indústrias farmacêutica, de cosmética, de alimentos, química e na recuperação e purificação de bioprodutos. Na área médica, é utilizada como expansor volumétrico do plasma sanguíneo, e como dextrana-ferro no tratamento de anemia; enquanto é empregada como agente umectante em preparações cosméticas, e estabilizante e espessante na indústria de alimentos. Na indústria de petróleo, é utilizada como componente da lama de perfuração e na recuperação secundária de petróleo (VIEIRA, 2003).

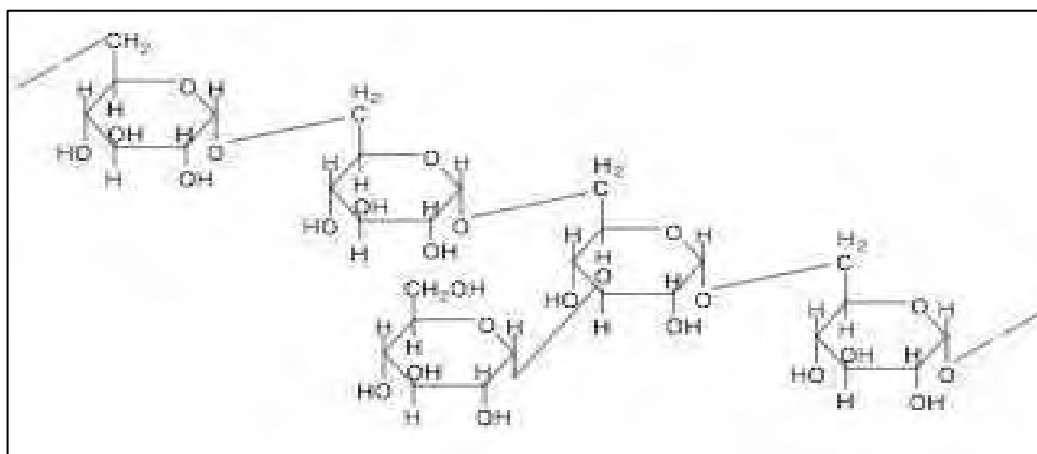


Figura 1: Estrutura de um segmento de molécula de dextrana contendo cinco glicoses

Souza (1994) isolou doze microrganismos produtores de dextranase extracelular proveniente de solos onde se havia depositado despejos de usinas açucareiras e de zona rural canavieira. Duas linhagens do fungo *Penicillium herquei* exibiram atividade de

degradação de dextrana de forma destacável, o que denota potencial aplicabilidade para uso industrial. A autora concluiu que existe grande potencial de utilização da dextranase de *P. herquei* em usinas produtoras de açúcar, para remoção da goma dextrana de caldos contaminados. Seu poder de hidrólise, na forma bruta, é comparável ao de certas dextranases comerciais. Entretanto, dentre os fatores limitantes da sua utilização está seu alto custo, necessitando de outros estudos.

3.3 – Antissépticos empregados na fermentação industrial

Para evitar o acúmulo de goma dextrana na indústria de fermentação etanólica, é necessário efetuar a limpeza física dos equipamentos, porém isto não impede o crescimento de microrganismos no caldo circulante. Desta maneira, muitos antissépticos são utilizados para o controle de microrganismos contaminantes.

Rotineiramente utiliza-se o ácido sulfúrico para o controle das infecções na fermentação. Geralmente aplica-se o ácido sulfúrico após a centrifugação do fermento e antes do mesmo ser submetido a uma nova etapa fermentativa (SILVA FILHO, 1993).

A acidez do meio torna-se 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). De acordo com Silva Filho (1993), a aplicação do ácido deve ser de 2 a 3 horas o tempo de retenção na dorna de tratamento, o suficiente para provocar a eliminação de grande parte das bactérias sem grandes problemas para a viabilidade celular da levedura de processo. O autor avaliou a influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura e contaminantes no processo fermentativo. Seu trabalho mostrou que os grupos de bactérias produtoras de gomas e produtoras de ácido são mais persistentes no processo, mas também apresentaram sensibilidade ao tratamento ácido. O autor conclui que o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção é uma das práticas mais eficientes e econômicas para a fermentação etanólica; porém não deve ser utilizado indiscriminadamente. Gallo (1989) em seu trabalho não encontrou *Leuconostoc mesenteroides* em nenhuma das amostragens, apesar de ser constantemente mencionada na literatura como sendo um dos mais freqüentes contaminantes da fermentação. O

autor argumenta que esta ausência pode ser devido ao tratamento térmico de aproximadamente 100°C à que foi submetido o mosto utilizado. Foi observado ainda que o tratamento ácido realizado com ácido sulfúrico no pé-de-cuba, por aproximadamente 2 horas a pH igual a 2,5, provocou diminuição média de 44,55% na microflora bacteriana presente, igualando ou mesmo superando as porcentagens de redução alcançadas na prática com o uso de produtos comerciais. Para Rosales (1989), o tratamento do fermento com ácido sulfúrico mostrou diminuição do número de bactérias, principalmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Outros fatores além da utilização do ácido sulfúrico ajudam a manter a contaminação bacteriana sob controle, tais como CO₂, temperatura e o próprio teor alcoólico, que quando elevado acaba inibindo o desenvolvimento das bactérias (SILVA FILHO, 1993).

Segundo Guerra (1995), a utilização freqüente de ácido sulfúrico pelas destilarias no intuito de combater as infecções bacterianas pode gerar alguns problemas, como aqueles associados à qualidade do álcool, morte das leveduras, corrosão nos equipamentos, segurança pessoal e instabilidade do sistema. Geralmente, com a retirada do ácido ocorre a reversão da floculação. Entretanto, as medidas estabelecidas para prevenir as infecções no processo fermentativo tais como limpeza das moendas, tubulações, instalações da fermentação e outros procedimentos como descarte do fundo de dorna, returbinação do fermento, tratamento ácido, etc, geralmente não são suficientes para que haja um equilíbrio entre bactérias contaminantes e levedura. Desta maneira, em algumas situações onde as bactérias tornam-se dominantes no processo, deve-se considerar o uso de antibióticos e ou biocidas (GUERRA, 1995).

Segundo Gaylarde e Latorre (1990 apud STUPIELLO, 1993), devem ser utilizados microbiocidas de largo espectro para tratar as infecções durante o processo fermentativo. As leveduras devem ser afetadas o menos possível, e estes devem ser altamente efetivos contra os contaminantes bacterianos sem, no entanto, oferecer riscos ao ambiente e aos operadores do processo. Os antibióticos mais utilizados nos processos fermentativos são tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina (STUPIELLO, 1993). Rosales (1989), ao avaliar a atividade antimicrobiana dos desinfetantes mostrou que penicilina V-potássica, composto orgânico triclorado e composto organo sulfuroso afetaram a viabilidade de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *msenteroides* e suas associações com a levedura. Ocorre diminuição da população de *Leuconostoc* de 98,7%,

quando suas células são colocadas em contato com a penicilina por 180 minutos, na concentração de 30 ppm. Os produtos avaliados não afetaram a viabilidade da levedura nas culturas puras. Oliva-Neto e Yokoya (2001) estudando a susceptibilidade de *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e *L. mesenteroides* a vários compostos antimicrobianos verificaram que Penicilina V-Ácida e clindamicina foram os mais efetivos contra o crescimento bacteriano em 24 horas. Dentre os produtos químicos, sulfito, nitrito e sulfato de cobre foram os mais efetivos. Tiocianato, bromofenato e n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio afetaram também o crescimento de *S. cerevisiae*. Como vários biocidas avaliados afetaram o crescimento de *S. cerevisiae*, em dosagens similares àquelas que inibiram as bactérias, o autor recomenda que estes produtos sejam evitados ou usados somente em condições especiais para o controle bacteriano do processo de fermentação. Assim, os antibióticos devem ser combinados com métodos usuais de controle dos contaminantes, como a lavagem ácida das leveduras do processo de reciclo. Os mesmos autores (1998) também avaliaram um antisséptico utilizado em sabonetes e outros cosméticos, o 3,4,4' triclorocarbanilida (TCC), para o controle do crescimento bacteriano durante a fermentação alcoólica de levedura contaminada com *Lactobacillus fermentum*. O produto mostrou inibição bacteriana em dosagens que não afetaram *Saccharomyces cerevisiae*.

Stupiello (1993), avaliando os antimicrobianos cloranfenicol, fermacol, penicilina, quaternário de amônio e virginiamicina, verificou que *Lactobacillus plantarum* foi o microrganismo mais resistente a todos os produtos utilizados, sugerindo que este seja adotado como microrganismo-teste. O autor mostrou que a utilização de antimicrobianos em doses letais (Concentração Bactericida Máxima) é discutível, uma vez que estas são, de um modo geral, muito maiores que a Concentração Inibitória Mínima mostrada em seus resultados. Para a inibição de *L. mesenteroides*, foram necessários 1-2 ppm de fermacol, 0,5 ppm de penicilina, 10 ppm de quaternário de amônio e 0,25 ppm de virginiamicina. Para o produto cloranfenicol 16 ppm não inibiu este microrganismo. Cereda et al. (1981 apud STUPIELLO, 1993) sugerem *Leuconostoc mesenteroides* como microorganismo-teste, utilizando métodos turbidimétricos para avaliar o desempenho de antimicrobianos.

Pulz (2002) verificou a eficiência dos biocidas Kamoran WP[®] e Corstan[®] no controle da população de *Lactobacillus fermentum* e seu efeito como agente

desfloculante do fermento. Os resultados de seu trabalho mostraram que apenas o biocida Kamoran WP[®] impediu a floculação das leveduras, além de controlar as bactérias contaminantes. O biocida Corstan[®] mostrou induzir a floculação na linhagem de levedura estudada. Quanto ao rendimento alcoólico, verificou que as leveduras floculadas e associadas com a bactéria apresentam um menor rendimento quando comparadas com a fermentação realizada por cultura pura de leveduras. A aplicação de ultra-som resultou na desfloculação da levedura; entretanto este processo foi reversível, além de interferir na viabilidade celular da levedura, dependendo do tempo de irradiação.

3.4 – Derivados do óleo de mamona (*Ricinus communis*).

De acordo com Chierice e Claro-Neto (2001) o óleo de mamona é extraído das sementes de uma planta herbácea da família das Euforbiáceas, do qual o gênero *Ricinus* possui apenas a espécie *communis*. A origem da mamona é bastante discutida, pois existem relatos muito antigos de seu cultivo na Ásia e na África. Sementes foram encontrada nos túmulos egípcios, comprovando que a mamona já era utilizada por esta civilização há pelo menos 4.000 anos. Na antiga Grécia alguns filósofos mencionaram em seus escritos que a mamona era utilizada pelos egípcios para iluminação e produção de ungüentos. A facilidade de propagação e cultivo da mamona faz com que a planta se adapte a diferentes regiões do planeta. A mamona chegou ao Brasil trazida pelos portugueses, com a finalidade de utilizar seu óleo para iluminação e lubrificação de eixos de carroças, além de ser utilizada como parte da argamassa na construção civil. Atualmente podemos encontrar a mamona em quase todo o Brasil, devido à sua facilidade em se adaptar a diferentes condições climáticas.

Ainda segundo os autores, o óleo de mamona é um triglicerídeo rico em ácidos graxos, especialmente o ácido ricinoléico, presente em 89,5% de sua composição. A presença acentuada de um único tipo de ácido graxo hidroxilado pouco freqüente nos óleos vegetais, faz com que este óleo possua características atípicas. Assim, devido à presença de três grupos funcionais altamente reativos no ácido ricinoléico, o óleo de mamona pode ser submetido a diversos processos químicos para a obtenção de subprodutos. Sua grande importância econômica se dá por esta versatilidade química

dentro do ramo industrial. O óleo pode ser utilizado em diferentes rotas de síntese para uma grande quantidade de produtos. Possui aplicação na área de cosméticos, lubrificantes, polímeros, etc. A partir do óleo de mamona pode-se também obter o diesel vegetal ou biodiesel, substituindo óleo diesel derivado do petróleo no uso como combustível. Outra aplicação do óleo é a fabricação de polímeros que são utilizados na elaboração de próteses e implantes, substituindo o silicone e outros materiais em cirurgias ósseas e de próstata.

Este óleo tem sido aplicado *in natura*, como também na forma modificada quimicamente. Em 1984, o grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros (QATP) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em São Carlos, iniciou o desenvolvimento de novos polióis derivados do óleo da mamona (IGNÁCIO, 1995 apud REZENDE et al., 2001). Alguns destes produtos estão em fase de comercialização (Endoquil[®] e Poli quilgerm[®]) em Araraquara Polímeros Químicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil.

Nesta condição, o produto Endoquil[®] tem sido aplicado como bactericida na área odontológica, sendo utilizado em substituição ao hipoclorito de sódio para irrigação de canais. Soluções irrigantes alternativas com propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade com o tecido estão sendo estudadas e aplicadas clinicamente. Ferreira et al. (1996) comparando a atividade antimicrobiana *in vivo* de 0,5% de solução NaOCl e o detergente derivado do óleo de mamona como soluções irrigantes em canais radiculares necróticos e lesões periapicais, observaram diminuição significativa no número de unidades formadoras de colônia para microrganismos anaeróbios, *S. mutans* e *Streptococci*, sem diferenças estatísticas entre estas duas soluções. Leonardo et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de Endoquil[®], que foi efetivo contra bactérias Gram-positivas. Ferreira et al. (2002) verificaram a atividade de agentes antibacterianos utilizados em Endodontia contra bactérias anaeróbias estritas. Foi avaliada ainda *in vitro* a capacidade antimicrobiana das substâncias: solução de hidróxido de cálcio 10%, paramonoclorofenol canforado (PMCC), digluconato de clorexidina 2% e detergente de mamona 10%. As bactérias utilizadas foram *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 e *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, utilizando-

se a técnica da diluição em caldo. O digluconato de clorexidina foi mais eficiente, seguido pelo detergente de mamona, PMCC e hidróxido de cálcio.

O grupo QATP vem estudando outros produtos derivados do óleo de mamona com aplicações na área médica. Neste sentido, Bolson et al. (2005) estudaram o efeito clínico, radiológico, macroscópico e histológico da poliuretana derivada do polímero de mamona implantada no úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*). Os autores concluíram que a poliuretana é biocompatível em aves, podendo ser utilizada na cirurgia ortopédica, ocorrendo osteointegração. Rezende et al. (2001) avaliando o poliuretano do óleo de mamona como substituto parcial do tendão calcâneo comum em coelhos concluíram que este pode ser indicado como substituto temporário de tendão, uma vez que clinicamente o poliuretano de mamona não induziu reação desfavorável que compromettesse a cicatrização tendínea.

Outras pesquisas foram realizadas utilizando-se o produto Poliquilgerm[®]. Assim, Bertoletti et al. (2004) verificaram efeito microbiostático de Poliquilgerm[®] sobre a levedura *Candida albicans*, cuja parede celular é constituída principalmente dos polissacarídeos manana e glucana, mediante inibição do crescimento da cultura. A inibição de células e brotos vivos atingiu 90%. A atividade microbiológica do derivado do óleo de mamona sobre a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 foi avaliada por Frei et al. (2004), que verificaram efeito bacteriostático evidenciado pela inibição do crescimento do microrganismo de 53,9; 52,3 e 68,8% nos tempos 24; 48 e 72 h de cultivo, respectivamente. A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* possui parede celular formada por uma fina camada de peptidoglicano e uma camada de lipopolissacarídeo e proteína. Messetti et al. (2005) avaliaram a viabilidade de *Escherichia coli* CCT 1457 *in vitro* sob atividade antimicrobiana do Poliquilgerm[®], verificando efeito microbiostático. Assim, as culturas mantidas durante 24 horas a 36°C em presença do produto apresentaram, mediante plaqueamento, diminuição média das UFC/mL de 87,02% e 80,29% na presença de 2,0 e 1,0% de Poliquilgerm[®], e ainda 73,29% na presença de 0,5%. O percentual de diminuição caiu para 62,10 e 59,73% na presença de 2,0 e 1,0% de Poliquilgerm[®] em 48 horas; e 33,27 e 31,96% após 72 horas.

Messetti et al. (2007a) estudando a influência do Poliquilgerm[®] sobre a viscosidade dos meios de cultivo contendo *Leuconostoc mesenteroides* (B512F) em comparação com soluções padrão de dextrana, verificaram que o produto não alterou a

viscosidade das soluções de dextrana ao longo do tempo. No entanto, as culturas de *L. mesenteroides* mostraram, após 24 horas, decaimento da viscosidade em ambas as concentrações utilizadas (1,0 e 0,2%), e a presença de 0,2% do produto induziu uma diminuição de mais de 50% nas primeiras 6 horas de cultivo e de até 67,58% em 20 horas, quando avaliou-se o crescimento por espectrofotometria na região do visível ($\lambda = 540$ nm). Messetti et al. (2007b) avaliaram ainda o efeito de diferentes concentrações do Poliquilgerm[®] sobre a diminuição da viscosidade bem como a capacidade de hidrólise sobre as ligações glicosídicas de soluções de dextrana. Foram registrados baixos índices de glicose liberada quando dosados pelos métodos enzimático e ADNS, e as diferenças em viscosidade da dextrana com e sem o produto foram insignificantes. Por outro lado, verificou-se nas condições de trabalho decaimento de até 20,0% na viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* quando acrescidas de 1,0% de Poliquilgerm[®].

Oliveira (2005) estudando a decomposição de sacarose por hidrólise utilizou uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona. Neste estudo, a autora observou a capacidade hidrolítica dos ésteres frente à sacarose, formando glicose e frutose. Foram realizados testes preliminares de determinação de açúcares redutores (glicose e frutose) e sacarose, desenvolvimento da metodologia para análise qualitativa e quantitativa desses açúcares, comparação de resultados entre os diferentes tipos de hidrólise, concentração da mistura de ésteres e a cinética da reação de hidrólise. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se a mistura de ésteres em sua forma diluída (1:100). Assim, acredita-se que os ésteres atuem como “transferidores” de água para a molécula de sacarose, catalisando a reação, ajudando na transferência da água para a molécula de sacarose e assim rompendo a ligação glicosídica. As paredes celulares de bactérias são constituídas de N-acetil-D-glicosamina e ácido N-acetilmurâmico, e a dos fungos de glicana, manana e quitina. Uma vez que estes são constituintes estruturais e considerando-se os recentes estudos da utilização desta mistura de ésteres como agente antimicrobiano na área odontológica, este estudo fornece subsídios visando esclarecer se a reação antimicrobiana ocorre por ocasião da quebra das ligações glicosídicas encontradas nos carboidratos da parede celular dos microrganismos. A autora propõe trabalhos futuros que visam o estudo da decomposição dos polímeros em moléculas não monoméricas, além da ação antimicrobiana, cuja forma de ação na célula ainda permanece desconhecida. Desta forma, este estudo possui importância relevante na

medida em que se pretende estudar a ação desta mistura de ésteres frente ao polímero dextrana formado por *L. mesenteroides* durante o processo de fermentação etanólica, visando impedir a perda de carboidratos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp, Rio Claro.

4.1 – Material

4.1.1 – Microrganismos

Utilizou-se a linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, obtida junto ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA (Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jonas Contiero. Foram utilizadas ainda linhagens de *Lactobacillus fermentum* (292B), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae*, isolada da safra 2000 da Usina Santa Fé.

4.1.2 – Meios de Cultura

Meio de Mayeux e Colmer (1961) para produção de goma

sacarose	100,0 g
extrato de levedura	5,0 g
triptona	10,0 g
água destilada	1000 mL

Material para clarificação de caldo de cana-de-açúcar (FALCÃO DE MORAIS et al., 1983)

ovos	2
caldo de cana-de-açúcar	1000 mL

Meio de caldo de cana suplementado com nutrientes (CSN)

extrato de levedura	0,3 g
peptona	0,6 g
caldo de cana-de-açúcar clarificado	100 mL

Meio para Lactobacillus segundo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, 1984)

Meio MRS	55 g
agar	15 g
água destilada	1000 mL

Meio “Plate Count Agar” (PCA), Standard Methods Agar

Meio PCA	23,5 g
água destilada	1000 mL

Caldo Nutriente

extrato de carne	3,0 g
peptona	5,0 g
água destilada	1000 mL

Meio Sabouraud

peptona	10 g
glicose	40 g
agar	1,6%
água destilada	1000 mL

4.1.3 – Derivado do óleo de mamona - Poliquilgerm®

O produto avaliado quanto ao seu potencial biocida, bacteriostático e hidrolítico foi o Poliquilgerm®, desenvolvido pelo grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Química da USP (São Carlos), coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice.

4.1.4 – Reagentes:

▪ Corantes Gram

Cristal Violeta

Solução A:	cristal violeta P.A.	2,0 g
	álcool etílico 95° P.A.	20 mL
Solução B:	oxalato de amônio P.A.	0,8 g
	água destilada	80 mL

Solução de Iôdo (Lugol)

iôdo metálico P.A.	1,0 g
iodeto de potássio P.A.	2,0 g
água destilada	300 mL

Safranina

safranina P.A.	2,5 g
álcool etílico 95° P.A.	100 mL

▪ Dextrana

Dextran T-70 (MW. 70.000)

Procedência: Pharmacia nº 17-0280 cat. 30 g

Dextran (MW; 60-90.000)

Procedência: Sigma nº D-4751 cat. 100 g

- **Corante Eritrosina (SHARF, 1972)**
- **Solução tampão Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4**

4.1.5 – Vidraria e equipamentos:

Vidraria e equipamentos usuais em laboratório de Microbiologia, além de:

- Viscosímetro de Cannon-Fenske;
- Viscosímetro Brookfield LV DV II +
- Cronômetro;
- Termômetro;
- Espectrofotômetro Micronal B-382 UV/Visível;
- Espectrofotômetro Metrolab 1700 UV/Visível;
- Shaker;
- Centrífuga;
- Microscópio óptico;
- Contador de colônias.

4.1.6 - Kit enzimático LABORLAB para ensaios de glicose oxidase.

4.1.7 - Ácido dinitroacetilsalicílico (ADNS) (Miller, 1959), para determinação de açúcares redutores totais (ART).

4.2 – Métodos

4.2.1 – Método de preparo dos meios de cultura

- *Mayeux e Colmer:*

Dissolveu-se o extrato de levedura e a triptona em 500 mL de água destilada. A sacarose foi dissolvida separadamente nos 500 mL restantes. As soluções foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm. Após a esterilização, juntou-se a sacarose ao restante do meio para sua utilização.

- *Caldo de Cana Clarificado:*

O caldo de cana-de-açúcar recém extraído foi obtido de garapeiros e clarificado para a precipitação de matéria coloidal. Para a obtenção do caldo clarificado, acrescentou-se 2 claras de ovos batidas em neve a 1000 mL de caldo de cana-de-açúcar. Agitou-se fortemente e a seguir a mistura foi submetida a vapor fluente em autoclave durante cerca de 40 minutos. Filtrou-se com auxílio de algodão e gaze. Em seguida, ajustou-se até 10° Brix, que foi a concentração de açúcar no caldo utilizada para realização dos experimentos.

- *CSN:*

A 100 mL do caldo de cana-de-açúcar clarificado e ajustado nos graus Brix desejados acrescentou-se o extrato de levedura e a peptona. Para o preparo de meio sólido, acrescentou-se 15 g/L de agar. Quando necessário, ajustou-se o pH utilizando-se HCl 2,0 N. Os frascos foram tamponados e autoclavados a 1 atm de pressão, por 20 minutos, a 121°C.

- *MRS:*

Dissolveu-se 55 g de meio pronto MRS a 1000 mL de água destilada. Para o preparo de meio sólido, acrescentou-se 15 g de agar. Esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm .

- *PCA:*

Dissolveu-se 23,5 g de meio pronto PCA a 1000 mL de água destilada. Esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm .

- *Caldo Nutriente:*

Dissolveu-se o extrato de carne e a peptona em 1000 mL de água destilada. Esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

- *Meio Sabouraud:*

Dissolveu-se a peptona e a glicose em 1000 mL de água destilada. Para o preparo de meio sólido, acrescentou-se 16 g de agar. Esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

4.2.2 – Método de preparo dos reagentes

- **Corantes Gram**

- Cristal Violeta:*

- Prepararam-se as soluções A e B, utilizando-as após 24 horas.

- Solução de Iodo (Lugol):*

- Triturou-se no almofariz o iodo e o iodeto. Dissolveu-se lentamente em água destilada o iodeto e a seguir foi adicionado o iodo (iodo é insolúvel em água, mas solúvel em solução de iodeto de potássio).

- Safranina:*

- Preparou-se a solução dissolvendo a safranina em etanol 95%. No momento do uso, diluiu-se 10 mL da solução estoque em 90 mL de água destilada.

Observação: todas as soluções foram mantidas em frascos âmbar.

- **Dextrana**

As soluções de dextrana foram preparadas utilizando Dextran T-70 Da nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0%; e Dextran 60-90.000 Da na concentração 2,0%; diluídas em água destilada.

- **Eritrosina**

1,0 g de eritrosina em 100 mL de água destilada.

- **Solução tampão Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4**

Partes iguais de 0,2 M de Na_2HPO_4 e 0,2M de NaH_2PO_4 .

4.2.3 – Manutenção das linhagens de microrganismos

L. mesenteroides foi inoculado em meio Mayeux e Colmer, CSN e MRS. A cultura foi incubada em estufa a 30°C por 48 h. Inoculou-se *Lactobacillus fermentum*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios MRS, Caldo Nutriente e Sabouraud, respectivamente, em estufa a 33±1°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação, todas as culturas foram mantidas sob refrigeração a 8±2°C até o próximo repique. A cultura de *L. mesenteroides* também foi mantida sob congelamento a -20°C em meio líquido MRS contendo glicerol a 10%, na proporção 1:1.

4.2.3.1 – Preparo das culturas para os ensaios

As culturas foram ativadas por meio de repiques em meio de cultura Mayeux e Colmer e meio CSN, sendo mantidas a 33±1°C durante 24 horas, antes da realização dos experimentos.

4.2.4 - Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm[®] sobre dextrana:

Avaliou-se a atividade hidrolítica mediante análise de viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* comparada com a viscosidade padrão das soluções de dextrana. Verificou-se ainda se o Poliquilgerm[®] teria ação hidrolítica sobre a dextrana quantificando-se a glicose liberada por meio de ensaios enzimáticos com glicose oxidase e o método de ácido dinitroacetilsalicílico (ADNS).

4.2.4.1 – Quantificação da viscosidade segundo o método de Cannon-Fenske

As medidas de viscosidade foram realizadas em Viscosímetro de Cannon-Fenske, por comparação entre o tempo de vazão de um fluido de viscosidade conhecida, tomando-se como referência água destilada, e o tempo de vazão de um fluido de viscosidade desconhecida, no caso as soluções em estudo. Todas as medidas foram realizadas a 21±1°C. Após determinado o tempo de vazão, obteve-se valores de viscosidade mediante a equação:

$$\eta_1 = \eta_2 \times \frac{d_1 t_1}{d_2 t_2}$$

onde:

d_1 = densidade do líquido desconhecido (soluções de dextrana/cultura) (g/cm^3)

d_2 = densidade da água destilada (g/cm^3)

t_1 = tempo de vazão do líquido desconhecido (s)

t_2 = tempo de vazão da água destilada (s)

η = viscosidade em centipoise

1 Poise = 1 g/cm.s

1 centipoise = $\text{g/cm.s} \times 10^2$ Poise

As medidas de densidade foram tomadas através da relação:

$$d = \frac{m}{V}$$

onde:

d = densidade (g/cm^3)

m = massa (g)

V = volume conhecido (mL)

4.2.4.1.1 – Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana.

Quantificou-se a viscosidade das soluções de dextrana medindo-se o tempo de vazão em viscosímetro de Cannon-Fenske. Mediu-se a viscosidade das soluções nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0% no tempo zero e nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas. Todas as medidas foram realizadas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, em triplicata.

4.2.4.1.2 – Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm®.

No primeiro experimento, foram preparadas soluções de dextrana nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0%. A seguir, adicionou-se 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm®, conforme o protocolo abaixo (Tabela 1). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, e medidas de viscosidade foram obtidas no intervalo de 0; 24; 48 e 72 horas. No segundo experimento, preparou-se uma solução de dextrana a 2,0% onde foi adicionado 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm®. As amostras foram mantidas em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para potencializar a provável ação hidrolítica do produto. Medidas de viscosidade foram obtidas no intervalo de 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias. Todas as amostras foram preparadas em triplicada, bem como seus respectivos controles.

Tabela 1: Protocolo do ensaio experimental de quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de diferentes concentrações de Poliquilgerm®

Volume (mL)	Concentração de Poliquilgerm® (%)	
	$\pm 3,0$	$\pm 13,0$
Solução de dextrana	50,0	50,0
Poliquilgerm®	2,0	8,0
Água	8,0	2,0
Volume final	60,0	60,0

4.2.4.2 – Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm®.

4.2.4.2.1 – Mediante ensaio de glicose oxidase

Após permanecerem em temperatura ambiente, determinou-se enzimaticamente a glicose liberada das soluções de dextrana do primeiro experimento acrescidas de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm® nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas, através de espectrofotometria ($\lambda = 505 \text{ nm}$).

O kit de quantificação de glicose LABORLAB consiste em um método enzimático, contendo:

- Reativo padrão
- Reativo enzimático
- Reativo de cor 1
- Reativo de cor 2

Após o preparo do reativo de trabalho, colocaram-se as quantidades dos reativos de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2: Quantidades de reativos para ensaio de glicose oxidase

	<i>Reativo de trabalho (mL)</i>	<i>Padrão (μL)</i>	<i>Desconhecido (μL)</i>
<i>Branco (B)</i>	2,0	-	-
<i>Padrão (P)</i>	2,0	20,0	-
<i>Desconhecido (D)</i>	2,0	-	20,0

B = branco, P = padrão, D = amostra

Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 10 minutos.

A leitura foi feita em espectrofotômetro $\lambda = 505 \text{ nm}$, calibrando-se o aparelho com o Branco. O cálculo da glicose liberada foi realizado segundo a equação abaixo:

$$\text{Glicose mg/mL} = D \times f$$

$$f = \frac{100\text{mg}/100\text{mL}}{P}$$

4.2.4.2.2 – Mediante o método ADNS para determinação de ART

Após permanecerem em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, determinou-se a glicose liberada das soluções de dextrana do segundo experimento acrescidas de 3,0 e 13,0% de Poli quilgerm[®] nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias. Para esta quantificação utilizou-se o método ADNS, onde primeiramente preparou-se uma solução padrão de glicose 1mg/mL em diferentes concentrações, segundo o protocolo abaixo (Tabela 3):

Tabela 3: Protocolo para elaboração da reta padrão de glicose

Tubos	Padrão glicose (μL)	Água destilada (μL)	Concentração Final (mg/mL)
0	0,0	250	0,0
1	25	225	0,1
2	50	200	0,2
3	100	150	0,4
4	150	100	0,6
5	200	50	0,8
6	250	0,0	1,0

Em seguida, adicionou-se 250 μL de ADNS em cada tubo. Os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos; a seguir foram resfriados, aos quais adicionou-se 2,5 mL de água destilada. A absorbância foi lida em comprimento de onda $\lambda = 540$ nm. A partir deste resultado, construiu-se a reta padrão de quantificação da glicose em mg/mL (Figura 2):

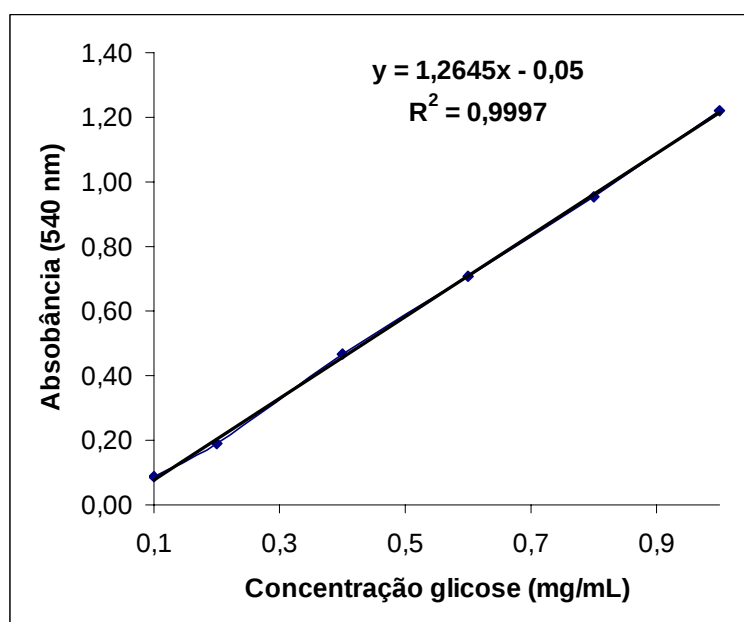


Figura 2: Reta padrão de glicose : Absorbância (540 nm) x Concentração de glicose (mg/mL)

Para a dosagem de glicose retirou-se 250 μL das amostras e adicionou-se 250 μL de ADNS. Os tubos foram aquecidos a 100°C por 5 minutos e em seguida resfriados. Adicionou-se 2,5 mL de água destilada. O branco foi preparado do mesmo modo,

utilizando-se água destilada. A leitura foi feita em $\lambda = 540$ nm. Os cálculos foram realizados a partir da equação obtida na reta padrão de glicose, para os valores de absorbância de cada amostra e os valores finais foram dados em concentração de glicose (mg/mL).

4.2.5 – Verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre as culturas de *Leuconostoc mesenteroides*.

4.2.5.1 – Em meio de cultura Mayeux e Colmer.

4.2.5.1.1 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm®.

Adicionou-se 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm® em meio de cultura Mayeux e Colmer, na presença e ausência da cultura de *L. mesenteroides*, segundo o protocolo abaixo (Tabela 4):

Tabela 4: Protocolo do ensaio experimental de quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura inoculado com *L. mesenteroides* acrescido de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm®

Volume (mL)	Concentração aproximada de Poliquilgerm® (%)							
	0,0	0,0	0,2	0,2	1,0	1,0	2,0	2,0
meio de cultura Mayeux e Colmer	50	50	50	50	50	50	50	50
inóculo	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0
Poliquilgerm®	-	-	0,1	0,1	0,5	0,5	1,0	1,0
água	6,0	1,0	5,9	0,9	5,5	0,5	5,0	0,0
volume final	56	56	56	56	56	56	56	56

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. As culturas e os controles foram incubados em shaker a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e 100 rpm por 24 horas. Em seguida, mediu-se a viscosidade utilizando-se viscosímetro de Cannon-Fenske, a $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.5.1.2 – Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* por espectrofotometria.

Através da absorbância $\lambda = 540$ nm, verificou-se o crescimento de *L. mesenteroides* na ausência e presença de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm[®]. As medidas foram obtidas nos tempos 0; 6; 20 e 26 horas.

4.2.5.2 – Em meio de cultura CSN.

4.2.5.2.1 – Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em diferentes pHs e temperaturas.

Preparou-se meio de cultura líquido CSN, onde os diferentes pHs foram ajustados em pHmetro utilizando-se HCl 2,0 M. Em tubos de cultura, adicionou-se 5,0 mL dos respectivos meios, em triplicata, segundo o protocolo abaixo (Tabela 5).

Tabela 5: Protocolo de ensaio de verificação do crescimento de *L. mesenteroides* em diferentes pHs e temperaturas

	pH			
	3,0	4,0	5,0	6,0
	20	20	20	20
Temperatura (°C)	33	33	33	33

Após esterilização em autoclave, os meios de cultura foram inoculados com 0,1 mL da cultura de *L. mesenteroides*. Os tubos a 33°C foram mantidos em estufa e os tubos a 20°C foram mantidos em incubadora BOD, por 24 horas. A avaliação do crescimento foi efetuada mediante visualização da turbidez dos tubos de cultura.

4.2.5.2.2 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs e temperaturas.

Após o preparo do meio de cultura CSN nos pHs 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 adicionou-se 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, na presença e ausência da cultura de *L. mesenteroides*, segundo o protocolo abaixo (Tabela 6):

Tabela 6: Protocolo do ensaio experimental de quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN em diferentes pHs inoculado com *L. mesenteroides* acrescido de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®

Volume (mL)	Concentração aproximada de Poliquilgerm®					
	0,0	0,0	0,2	0,2	1,0	1,0
meio de cultura CSN	50	50	50	50	50	50
inóculo	-	3	-	3	-	3
Poliquilgerm®	-	-	0,1	0,1	0,5	0,5
água	6	3	5,9	2,9	5,5	2,5
volume final	56	56	56	56	56	56

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas. As culturas e os controles foram incubados em shaker a $33\pm1^{\circ}\text{C}$ e $28\pm1^{\circ}\text{C}$ a 100 rpm por 24 horas. Em seguida, mediu-se a viscosidade utilizando-se viscosímetro de Cannon-Fenske, a $21\pm1^{\circ}\text{C}$.

4.2.5.2.3 - Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* por espectrofotometria, mediante análise da biomassa.

Juntamente com o experimento anterior (item 4.2.5.2.2), efetuou-se a verificação do crescimento da cultura mediante análise da biomassa. Inicialmente, para que fosse possível construir uma reta padrão da Biomassa x Densidade Óptica da bactéria *L. mesenteroides*, foram realizados os procedimentos descritos abaixo:

- Inoculou-se 5,0 mL da cultura de *L. mesenteroides* em 100 mL de meio de cultura CSN, em erlenmeyer de 250 mL. Cultivou-se por 24 horas à $33\pm1^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 100 rpm;

- Após as 24 horas de cultivo retirou-se 1,0 mL para que fossem feitas diluições decimais da cultura. Em seguida efetuou-se o plaqueamento pela técnica de Pour Plate em meio PCA;
- O volume da cultura restante foi uniformemente distribuído nos tubos da centrífuga de bancada Sorvall;
- Centrifugou-se por 10 à 12 minutos em 8.000 rpm,
- Dispensou-se o sobrenadante e lavou-se a biomassa com água destilada;
- Centrifugou-se novamente por 10 à 12 minutos em 8.000 rpm;
- Dispensou-se o sobrenadante e a biomassa foi ressuspensa em proveta, onde após completar o volume para 100 mL, foi devidamente homogeneizada;
- A biomassa ressuspensa foi separada em duas partes: com 50 mL foram realizadas diluições para leitura de absorbância em espectrofotômetro, e com os 50 mL restantes quantificou-se a biomassa seca, em mg/mL.

Com a suspensão celular foram realizadas diluições decimais e a absorbância foi lida em comprimento de onda $\lambda = 440$ nm (Tabela 7), que foi o comprimento de onda de maior absorbância encontrado na varredura espectral da cultura de *L. mesenteroides* (Figura 3).

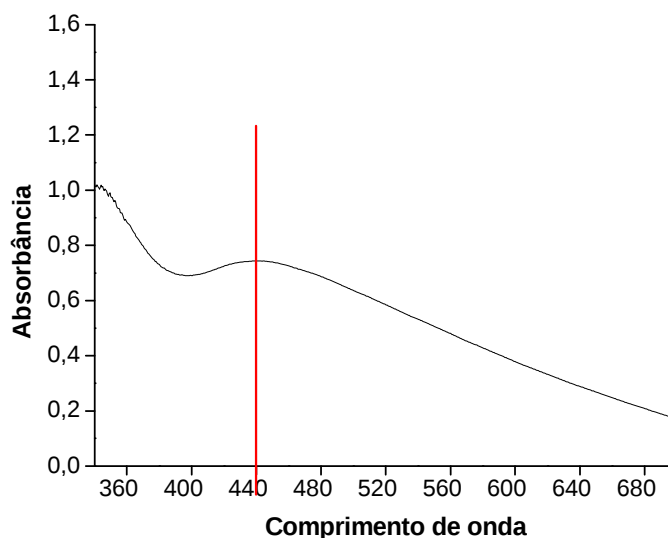


Figura 3: Varredura espectral da cultura de *L. mesenteroides* em meio CSN.

Tabela 7: Diluições da biomassa ressuspensa e respectivos valores de absorbância encontrados em comprimento de onda 440 nm

Diluições	Absorbância repetições			Melhor Média da absorbância
	1	2	3	
2x	1,915	1,887	1,860	1,887
3x	1,434	1,415	1,424	1,424
4x	1,139	1,130	1,119	1,134
5x	0,942	0,928	0,920	0,930
6x	0,810	0,789	0,789	0,789
7x	0,695	0,697	0,695	0,695
10x	0,503	0,504	0,502	0,503
15x	0,407	0,385	0,389	0,387
20x	0,316	0,310	0,310	0,310
30x	0,258	0,230	0,218	0,235
40x	0,152	0,172	0,193	0,162
50x	0,137	0,141	0,158	0,139
sem diluição	3,557	3,644		3,600

Para a quantificação da biomassa seca, um cadinho foi tarado em estufa a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Depois de resfriado em dessecador, este foi pesado em balança analítica até que seu peso permanecesse constante. A suspensão (50 mL de biomassa ressuspensa) foi transferida para o cadinho, que foi levado em estufa a $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ até que toda a água evaporasse. Depois de seco, foi colocado em dessecador para resfriar. Pesou-se novamente em balança analítica, até peso constante. O valor da massa seca foi calculado com sendo a diferença do cadinho com e sem a biomassa, obtendo-se 30,6 mg em 50 mL. Deste modo, em 100 mL da cultura inicial havia 61,2 mg de biomassa. Os dados do plaqueamento após as 24 horas de cultivo foram $14,3 \times 10^8$ UFC/mL.

A reta padrão (Figura 4) da biomassa de *L. mesenteroides* foi construída a partir dos dados da Tabela 8:

Tabela 8: Valores de absorbância final encontrados para as diferentes diluições da biomassa ressuspensa e valores de UFC/mL correspondentes.

Absorbância da biomassa ressuspensa	Diluição	Absorbância final	UFC/mL (10^8)
1,887	2x	3,774	7,15
1,424	3x	4,272	4,77
1,134	4x	4,536	3,57
0,930	5x	4,650	2,86
0,789	6x	4,734	2,38
0,695	7x	4,865	2,04
0,503	10x	5,030	1,43
0,387	15x	5,805	0,95
0,310	20x	6,200	0,71
0,235	30x	7,050	0,48
0,162	40x	6,480	0,36
0,139	50x	6,950	0,29
sem diluição		3,600	14,30

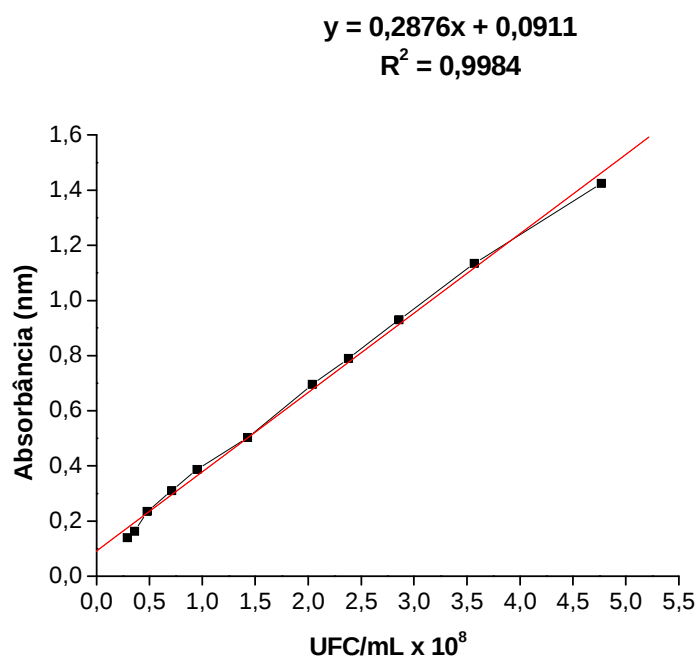


Figura 4: Absorbância (nm) x Unidades formadoras de colônia (UFC/mL x 10^8) da bactéria *L. mesenteroides* (Reta padrão).

Mediante a equação da reta encontrada para Absorbância x UFC/mL, pode-se estimar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) encontrada nas

culturas do presente experimento, analisando assim o efeito do Poliquilgerm[®] sobre a biomassa de *L. mesenteroides*.

4.2.6 - Verificação da atividade do Poliquilgerm[®] sobre cultura mista (*Leuconostoc mesenteroides* + *Saccharomyces cerevisiae*), em meio CSN.

A partir dos resultados dos experimentos anteriores, foram efetuados novos experimentos utilizando-se uma cultura mista de *L. mesenteroides* e *S. cerevisiae*. Acrescentou-se 3,0 mL da cultura de *L. mesenteroides* em erlenmeyer contendo 50 mL de meio CSN a pH 6,0, por aproximadamente 40 horas a 33°C. Após este período e depois de confirmado o crescimento da bactéria através da turvação do meio, adicionou-se 2,0 mL da cultura de *S. cerevisiae*. A cultura mista foi então mantida a 33°C por 24 horas.

Optou-se por utilizar o meio de cultura em pH 6,0 e temperatura de incubação de 33°C, por ser a temperatura mais freqüente em usinas de fermentação etanólica. Após esterilização em autoclave, adicionou-se 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®], segundo o protocolo abaixo (Tabela 9):

Tabela 9: Protocolo do ensaio experimental de verificação da atividade do Poliquilgerm[®] sobre cultura mista, em meio de cultura CSN a pH 6,0

Volume (mL)	Concentração aproximada de Poliquilgerm [®]		
	0,0	0,2	1,0
meio de cultura CSN	50	50	50
inóculo	3	3	3
Poliquilgerm	-	0,11	0,56
água	3	2,89	2,44
volume final	56	56	56

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas; e o experimento foi delineado em três repetições em quintuplicata. As culturas e os controles foram incubados em shaker a 33±1°C a 100 rpm por 24 horas. Em seguida, foram realizadas as análises de viscosidade, viabilidade de *S. cerevisiae* e verificação do crescimento de *L. mesenteroides* mediante plaqueamento pela técnica Pour Plate. As

placas foram incubadas em estufa a $33\pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, e a seguir as colônias foram quantificadas.

4.2.6.1 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (*Leuconostoc mesenteroides* + *Saccharomyces cerevisiae*), acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®.

As medidas de viscosidade das culturas mistas foram realizadas em viscosímetro de Cannon-Fenske e em viscosímetro Brookfield LV DV II + (spindle 18, 20 rpm). Todas as medidas foram feitas a $21\pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.6.2 – Quantificação da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* mediante contagem de células em câmara de Neubauer.

Inicialmente, preparou-se a solução de corante eritrosina diluindo 1,0 mL desta em 50 mL de solução tampão (Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 a 0,2M). Em seguida adicionou-se 1,0 mL desta solução corante em 1,0 mL da suspensão de células (amostra) da cultura mista que se desejava contar. Se a suspensão estivesse muito concentrada, impossibilitando a contagem, diluía-se em água destilada e posteriormente adicionava-se o corante na proporção 1:1.

Em câmara de Neubauer, foram contadas cerca de 200 células por quadrado grande. Determinou-se o número de células de um dos quadrados médios que foi multiplicada por 25 para se obter as células por quadrado grande. Este número multiplicado pela diluição da amostra (se for o caso), pela diluição do corante (x 2) e por 10^4 fornece o número de células por cm^3 .

Foram contadas por coloração diferencial as células vivas e mortas, os brotos vivos e mortos e os flocos. Em seguida, foram calculados a porcentagem de viabilidade das células de levedura, como segue abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{células vivas}}{\text{cel. vivas} + \text{mortas}} \times 100$$

$$\% \text{ Brotamento} = \frac{\text{brotos vivos}}{\text{cel. vivas} + \text{mortas}} \times 100$$

$$\% \text{ Viabilidade dos Brotos} = \frac{\text{brotos vivos}}{\text{br. vivos} + \text{br. mortos}} \times 100$$

$$\text{Flocos por campo (mL)} = \frac{\text{Flocos}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrados}}$$

4.2.6.3 – Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* mediante plaqueamento pela técnica Pour Plate.

Para verificar a atividade do Poliquilgerm[®] sobre *L. mesenteroides* foram efetuadas diluições utilizando-se 1,0 mL das amostras de cultura mista na ordem de 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷. Com estas diluições, foi realizado o plaqueamento pela técnica Pour Plate, em meio MRS. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução de actidiona 1mg/mL a cada 100 mL de meio antes do plaqueamento, a fim de que houvesse a inibição das células de levedura.

As amostras utilizadas para plaqueamento eram compostas, formadas por 1,0 mL de cada uma das 5 repetições para cada tratamento. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

4.2.7 - Verificação da atividade do Poliquilgerm[®] diretamente sobre parede celular de bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras.

Para a realização deste experimento foram utilizados os microrganismos *Lactobacillus fermentum* (292B), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem Santa Fé) e *Candida albicans* (ATCC 10231); que foram repicados, respectivamente, em meios de cultura MRS, Nutriente Agar e Sabouraud.

Preparou-se inicialmente 10 mL de inóculo de cada um dos microrganismos. Após 24 horas de incubação a 32±1°C, estes foram inoculados em erlenmeyers contendo 100 mL dos seus respectivos meios de cultura. Em seguida, os erlenmeyers foram

incubados em shaker a 100 rpm e a $32\pm1^{\circ}\text{C}$ por cerca de 30 horas, para que houvesse produção de biomassa por todos os microrganismos.

Completado o período de crescimento, todos os microrganismos foram centrifugados em centrífuga modelo MLW K23 por 10 minutos a 5000 rpm, com exceção da bactéria *E. coli*, a qual foi submetida à centrifugação no modelo MLW K24 por 10 minutos a 8000 rpm, devido à sua menor produção de biomassa. Após o descarte do meio de cultura e lavagem das células com água destilada, todos os microrganismos foram centrifugados novamente. Após o descarte do sobrenadante, a biomassa restante de cada microrganismo foi ressuspensa em aproximadamente 250 mL de água destilada. Nesta etapa, foram separados 100 mL de cada suspensão de microrganismo, que foi levada à geladeira para posterior utilização no presente experimento. O restante (150 mL) das suspensões foram autoclavados a 121°C a 1 atm por 15 minutos, para que ocorresse a lise das células com conseqüente liberação de material intracelular. Em seguida, as suspensões autoclavadas foram submetidas novamente ao mesmo processo de centrifugação e lavagem das células, para que houvesse recuperação apenas da biomassa contendo a parede celular dos microrganismos. Ressuspendeu-se cada microrganismo em 100 mL de água destilada.

Em tubos esterilizados foram adicionados 10 mL da suspensão de biomassa de cada microrganismo, devidamente homogeneizado em agitador. Foram separados deste modo, microrganismos em 2 grupos: os autoclavados e os não autoclavados. Em todos, foram separados os tubos controle contendo apenas a suspensão da biomassa. Os tratamentos foram realizados segundo o protocolo abaixo (Tabela 10), em triplicata:

Tabela 10: Protocolo do ensaio experimental de verificação da atividade do Poliquilgerm[®] sobre parede celular de microrganismos

	Tratamentos					
	Biomassa autoclavada			Biomassa não autoclavada		
	% Poliquilgerm			% Poliquilgerm		
	0,0	0,2	0,1	0,0	0,2	0,1
suspensão da biomassa (mL)	10	10	10	10	10	10
Poliquilgerm (μL)	0	20	10	0	20	10

Os tubos foram mantidos em estufa a $32\pm 1^\circ\text{C}$, e alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e congelados para posterior dosagem de açúcares redutores totais pelo método ADNS.

Durante a realização das dosagens de glicose (mg/mL), houve necessidade de utilizar novo ADNS. Deste modo, foi elaborada uma nova reta padrão de glicose seguindo os passos já descritos no item 4.2.4.2.2, e os resultados calculados seguindo a nova equação da reta obtida (Figura 5).

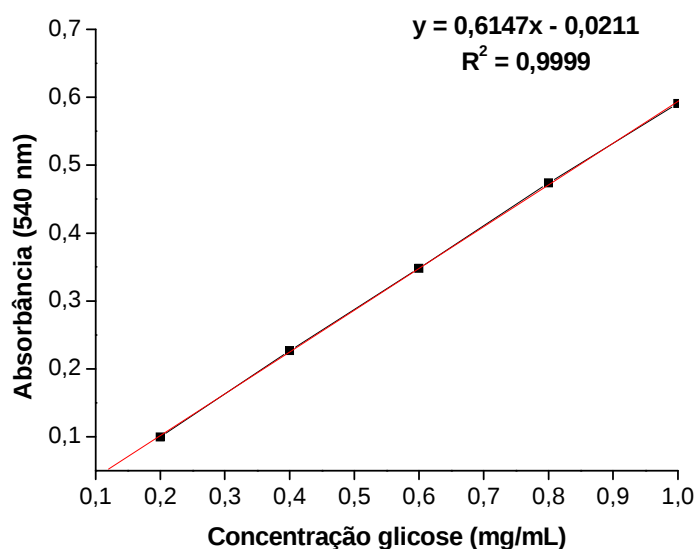


Figura 5: Reta padrão: Absorbância (nm) x Concentração de glicose (mg/mL)

4.2.8 - Delineamento Estatístico

Todas as análises estatísticas foram realizadas 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm[®] sobre dextrana

5.1.1 - Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana.

Nas Tabelas 11 e 12 são apresentados os resultados da quantificação da viscosidade de soluções de dextrana em diferentes concentrações, mediante o método de Cannon-Fenske.

Tabela 11: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0% medidas a $21\pm1^{\circ}\text{C}$

Concentração de dextrana (%)	Viscosidade soluções de dextrana (cp)			
	repetições			média
	1	2	3	
1,0	1,2128	1,2128	1,2431	1,2229
1,5	1,3646	1,3646	1,3342	1,3545
2,0	1,4889	1,4889	1,5192	1,4990

Utilizando-se o software The SAS System 9.1 procedeu-se uma análise de variância fatorial (ANOVA), que indicou diferenças significativas entre as soluções de dextrana de diferentes concentrações, com relação à variável viscosidade. Assim, na primeira quantificação (Tabela 11) a solução de dextrana 2,0% apresentou maior média de viscosidade, seguida da solução 1,5% e da solução 1,0% (Figura 6). O fato de que

soluções mais concentradas de dextrana apresentam maior viscosidade foi comprovada mediante os dados obtidos e nesta análise estatística.

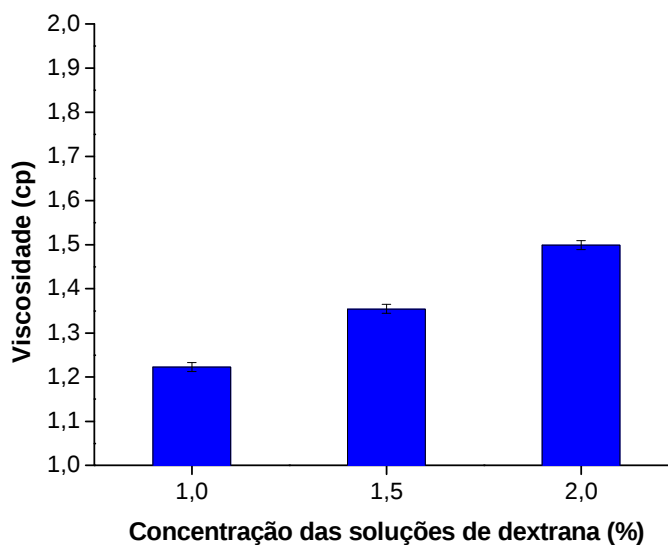


Figura 6: Quantificação comparativa da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5 e 2,0% medidas a $21\pm 1^\circ\text{C}$

Tabela 12: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% medidas a $21\pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

Concentração de dextrana (%)	Tempo (horas)	Viscosidade soluções de dextrana (cp)			
		repetições			média
		1	2	3	
1,0	0	1,1672	1,1972	1,2869	1,2171
	24	1,3169	1,4067	1,4665	1,3967
	48	1,1373	1,1972	1,2570	1,1972
	72	1,3169	1,3169	1,3767	1,3368
1,5	0	1,2302	1,2902	1,3802	1,3002
	24	1,2302	1,4102	1,4102	1,3502
	48	1,2902	1,5603	1,7103	1,5203
	72	1,2602	1,3202	1,3202	1,3002
2,0	0	1,3221	1,4123	1,5325	1,4223
	24	1,3522	1,3522	1,3822	1,3622
	48	1,3822	1,4423	1,6226	1,4824
	72	1,3822	1,4423	1,4724	1,4323
3,0	0	1,5616	1,6817	1,7117	1,6517
	24	1,6817	1,7117	1,8619	1,7518
	48	1,7117	1,8619	1,9519	1,8418
	72	1,6817	1,7117	1,8619	1,7518

Na segunda quantificação (Tabela 12), a solução de dextrana 3,0% apresentou a maior média de viscosidade, seguida das soluções 2,0; 1,0 e 1,5% (Figura 7). A solução 3,0% mostrou-se diferente das demais devido a sua maior viscosidade. As soluções 1,0 e 2,0% não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, assim como as soluções 1,0 e 1,5%. Entretanto, a solução 1,5% diferiu da solução 2,0%.

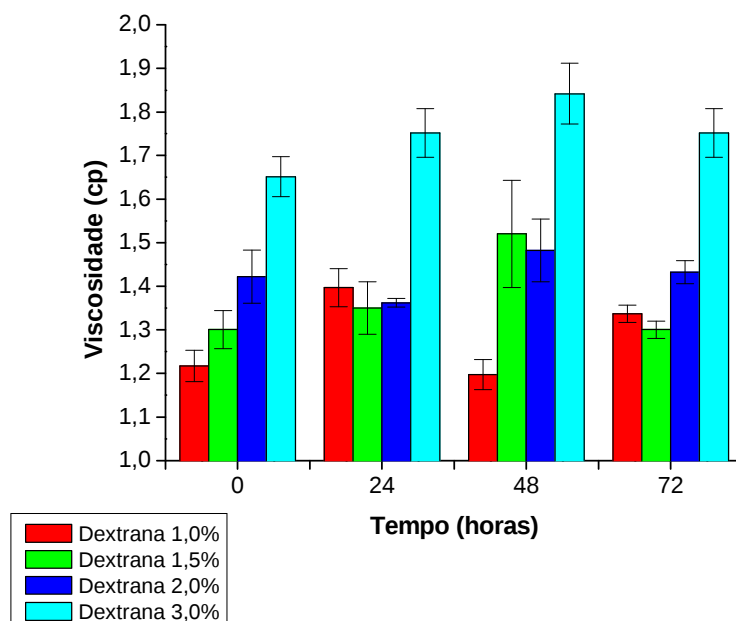


Figura 7: Quantificação comparativa da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% medidas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

5.1.2 - Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm[®], nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.

Nas Tabelas 13 e 14 são apresentados os resultados da quantificação da viscosidade de soluções de dextrana em diferentes concentrações, acrescidas de Poliquilgerm[®], mediante o método de Cannon-Fenske.

Tabela 13: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% acrescidas de 3,3% de Poliquilgerm[®] e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

Concentração de dextrana (%)	Tempo (horas)	Viscosidade soluções de dextrana (cp)			
		repetições			média
		1	2	3	
1,0	0	1,3845	1,3845	1,4748	1,4146
	24	1,3544	1,3544	1,3845	1,3644
	48	1,1738	1,2039	1,3845	1,2541
	72	1,4146	1,4748	1,5049	1,4648
1,5	0	1,1683	1,2582	1,2881	1,2382
	24	1,2582	1,2582	1,3181	1,2782
	48	1,2282	1,2881	1,6476	1,3880
	72	1,2582	1,3181	1,348	1,3081
2,0	0	1,4143	1,4444	1,4444	1,4344
	24	1,3842	1,4444	1,4745	1,4344
	48	1,324	1,3541	1,3842	1,3541
	72	1,3541	1,3842	1,4444	1,3942
3,0	0	1,6054	1,878	1,9083	1,7972
	24	1,8174	1,9991	1,9991	1,9385
	48	1,5751	1,6659	1,7871	1,6760
	72	1,6659	1,8174	1,8174	1,7669

Tabela 14: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% acrescidas de 13,3% de Poliquilgerm® e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

Concentração de dextrana (%)	Tempo (horas)	Viscosidade soluções de dextrana (cp)			
		repetições			média
		1	2	3	
1,0	0	1,2312	1,4715	1,5916	1,4314
	24	1,5616	1,8318	1,8318	1,7417
	48	1,3814	1,4715	1,5916	1,4815
	72	1,1712	1,1712	1,5916	1,3113
1,5	0	1,2351	1,3255	1,4761	1,3456
	24	1,3556	1,4159	1,5966	1,4560
	48	1,2652	1,4761	1,5966	1,4460
	72	1,3556	1,5062	1,5062	1,4560
2,0	0	1,4475	1,5077	1,6585	1,5379
	24	1,3871	1,4475	1,5077	1,4474
	48	1,4173	1,4776	1,4776	1,4575
	72	1,4475	1,4776	1,5077	1,4776
3,0	0	1,6611	1,8423	1,8725	1,7920
	24	1,8121	1,9329	1,9329	1,8926
	48	1,7819	1,9027	1,9933	1,8926
	72	1,6309	1,6309	1,8725	1,7114

A análise de viscosidade das soluções de dextrana acrescidas de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm® indica que há variação nos valores de viscosidade ao longo dos tempos 0; 24; 48 e 72 horas. Inicialmente, pode-se observar nas Figuras 8 e 9 que os valores de viscosidade das soluções controle aumentam de acordo com o aumento da concentração de dextrana utilizada, sendo que os maiores valores são encontrados na solução 3,0%. Verificou-se um aumento geral na viscosidade das soluções de dextrana após o acréscimo de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm® ao longo de 72 horas. Para as soluções acrescidas com 3,3% do produto, a viscosidade aumenta em 24 horas, diminui em 48 horas e volta a subir em 72 horas para a maioria das soluções (Figura 8). Para todas as soluções acrescidas com 13,3% do produto, a viscosidade aumenta. A maioria destas soluções apresentou aumento de viscosidade em 24 horas que foi mantido até 48 horas (Figura 9).

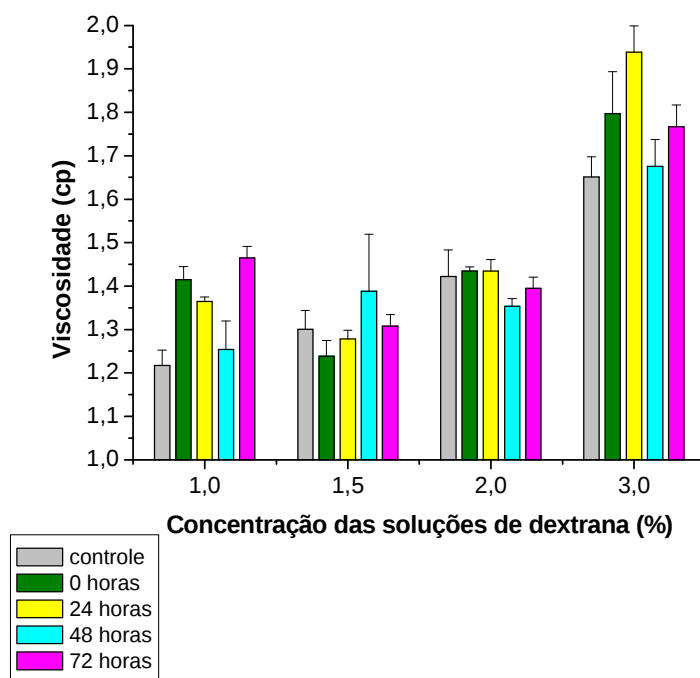


Figura 8: Quantificação comparativa da viscosidade das soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% após o acréscimo de 3,3% de Poliquilgerm®, medidas a $21\pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

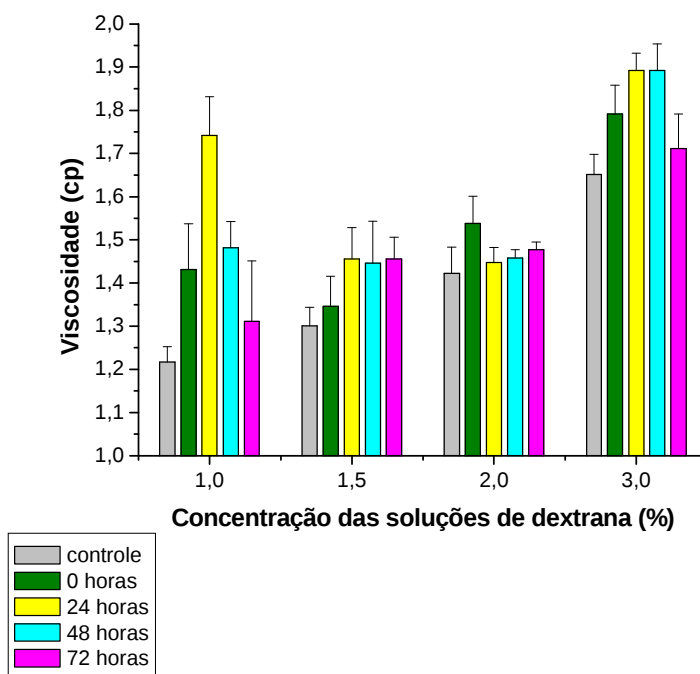


Figura 9: Quantificação comparativa da viscosidade das soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% após o acréscimo de 13,3% de Poliquilgerm®, medidas a $21\pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

Na Figura 10, que reúne as médias de viscosidade encontradas para as soluções de diferentes concentrações de dextrana, verificou-se aumento de viscosidade após a adição de Poliquilgerm[®] em relação às soluções controle. Maior aumento ocorre quando adiciona-se 13,3% do produto. As médias de viscosidade das soluções acrescidas de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm[®] têm seus valores máximos em 24 horas (1,5039 e 1,6345 cp, respectivamente). Registrou-se que a média de viscosidade das soluções controle (1,4652 cp) também aumentou após 24 horas (1,5104 cp), ultrapassando os valores encontrados para as soluções acrescidas com 3,3% do produto, porém diminuindo após as 72 horas (1,4553 cp).

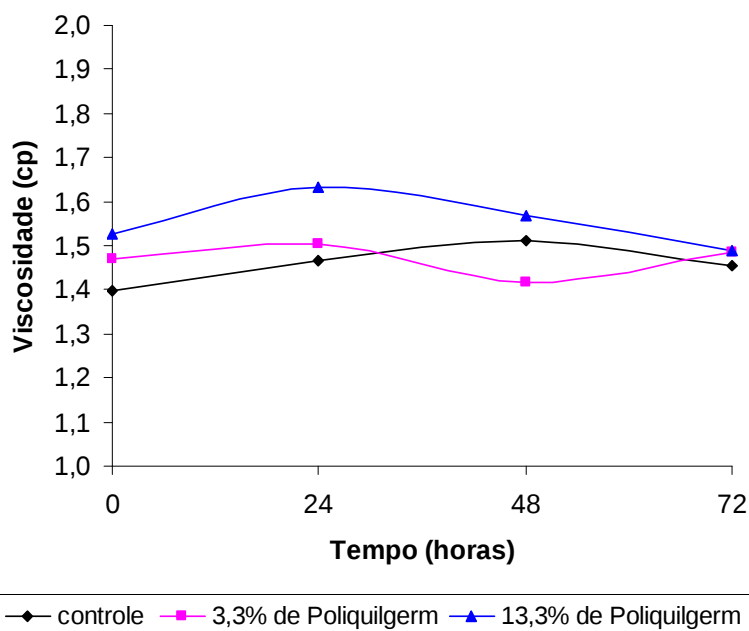


Figura 10: Quantificação comparativa das médias de viscosidade de todas as soluções de dextrana (70.000 Da) após o acréscimo de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm[®], medidas a $21\pm1^{\circ}\text{C}$ nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas

Empregando-se análises de variância, onde ajustou-se um modelo do tipo fatorial $4 \times 3 \times 4$, verifica-se que a viscosidade aumenta com a adição de Poliquilgerm[®] nas soluções de dextrana, uma vez que a maior média de viscosidade foi obtida nas soluções contendo 13,3% do produto, seguida das soluções com 3,3 e 0% (1,5549; 1,4691 e 1,4572 cp, respectivamente). A concentração 13,3% difere das demais, e as concentrações 3,3 e 0% não mostraram diferenças significativas entre si. Os resultados mostram que em 24 horas a viscosidade apresenta a maior média (1,5345 cp) para todas as soluções (incluindo soluções controle), seguido pelos tempos 48; 72 e 0 (Figura 11).

O tempo 24 horas diferiu estatisticamente dos demais tempos. O tempo 0 diferiu do tempo 72 horas. A análise sugere que as soluções atingem viscosidade máxima em 24 horas quando a dextrana, possivelmente polimerizada, estaria totalmente dispersa no solvente (água).

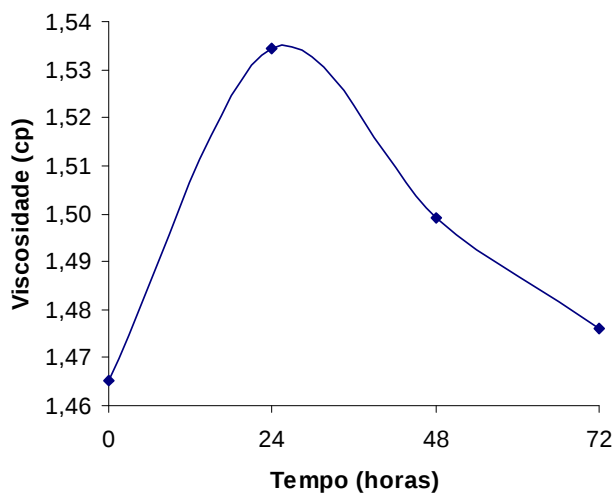


Figura 11: Variação da viscosidade de todas as soluções de dextrana (70.000 Da), na ausência e presença de Poliquilgerm[®], ao longo dos tempos 0; 24; 48 e 72 horas

5.1.2.1 - Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm[®] mediante teste enzimático de glicose oxidase.

A Tabela 15 reúne os dados encontrados para quantificação da glicose liberada, em mg/mL, das soluções de dextrana de diferentes concentrações acrescidas de Poliquilgerm[®], mediante teste enzimático.

Tabela 15: Quantificação da glicose (mg/mL) em soluções de dextrana (70.000 Da) nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% na ausência e presença de 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm[®], nos tempos 0; 24; 48 e 72 horas

Tempo (horas)	Concentração dextrana (%)	Média glicose (mg/mL)		
		Concentração de Poliquilgerm (%)		
		0,0	3,3	13,3
0	1,0	0,0083	0,0093	0,0124
	1,5	0,0103	0,0093	0,0114
	2,0	0,0083	0,0062	0,0103
	3,0	0,0052	0,0073	0,0083
24	1,0	0,0433	0,0114	0,0526
	1,5	0,0134	0,0093	0,0072
	2,0	0,0062	0,0072	0,0083
	3,0	0,0062	0,0052	0,0093
48	1,0	0,0000	0,0000	0,0000
	1,5	0,0000	0,0026	0,0013
	2,0	0,0000	0,0026	0,0013
	3,0	0,0000	0,0076	0,0038
72	1,0	0,0000	0,0026	0,0064
	1,5	0,0000	0,0026	0,0000
	2,0	0,0026	0,0026	0,0051
	3,0	0,0038	0,0038	0,0051

Os resultados das dosagens de glicose utilizando-se o método enzimático no intervalo 0; 24; 48 e 72 horas mostraram que soluções de diferentes concentrações de dextrana não diferiram significativamente quanto aos valores de glicose obtidos (Tabela 15). O parâmetro concentração de Poliquilgerm[®] também não se mostrou estatisticamente significativo para a variável glicose, que apresentou valores muito baixos. Assim, soluções na ausência ou presença de 0; 3,3 e 13,3% de Poliquilgerm[®] não diferiram significativamente quanto aos valores de glicose obtidos. Com este experimento, conclui-se que o método enzimático (ensaio de glicose oxidase) não registrou quantidade significativa de glicose liberada. Diante destes resultados procurou-se verificar se o Poliquilgerm[®] não estaria inibindo a enzima glicose-oxidase, aplicando-se o método de ADNS nos próximos experimentos com a dextrana.

5.1.3 - Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm[®], nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.

Na Tabela 16 encontram-se os dados da quantificação da viscosidade de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm[®], mediando o método de Cannon-Fenske, medidas ao longo de 30 dias.

Tabela 16: Quantificação da viscosidade de soluções de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% acrescidas de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm[®] e medidas a 21±1°C nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

Concentração de Poliquilgerm [®] (%)	Tempo (dias)	Viscosidade soluções de dextrana (cp)			
		repetições			Média
		1	2	3	
0,0	0	1,3033	1,3726	1,2692	1,3150
	5	1,3033	1,4920	1,6529	1,4827
	10	1,3921	1,4323	1,3282	1,3842
	15	1,2440	1,2533	1,2396	1,2456
	20	1,3625	1,2831	1,2396	1,2951
	25	1,3625	1,4920	1,3577	1,4041
	30	1,3921	1,4323	1,3872	1,4039
3,0	0	1,2629	1,3564	1,2936	1,3043
	5	1,3832	1,4469	1,4140	1,4147
	10	1,2930	1,2660	1,2936	1,2842
	15	1,2930	1,2660	1,3839	1,3143
	20	1,3231	1,2660	1,5042	1,3644
	25	1,3531	1,4167	1,6547	1,4748
	30	1,3531	1,3263	1,6246	1,4347
13,0	0	1,6824	1,6013	1,5006	1,5948
	5	1,4721	1,5107	1,4405	1,4744
	10	1,4721	1,6617	1,5606	1,5648
	15	1,4420	1,4502	1,4706	1,4543
	20	1,4120	1,7222	1,4405	1,5249
	25	1,6223	1,6013	1,5606	1,5947
	30	1,5021	1,5409	1,5306	1,5245

Neste experimento, a solução de dextrana a 2,0% foi acrescida de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm[®]. Os valores de viscosidade obtidos indicam variação ao longo do tempo, tanto para as soluções de dextrana (controle) como para as soluções acrescidas de Poliquilgerm[®]. A viscosidade das soluções controle aumenta atingindo o valor máximo em 5 dias (1,4827 cp), valor mínimo em 15 dias (1,2456 cp), e voltando a aumentar até

atingir valores máximos em 25 e 30 dias (1,4041 e 1,4039 cp, respectivamente). O acréscimo de 3,0% de Poliqualgerm[®] diminui a viscosidade das soluções de dextrana, em relação ao controle. Nesta concentração do produto, a viscosidade das soluções aumenta em 5 dias (1,4147 cp), atinge valor mínimo em 10 dias (1,2842 cp), voltando a aumentar atingindo valor máximo em 25 dias (1,4748 cp). Até os 10 primeiros dias estas soluções permanecem com viscosidade menor que o controle. A viscosidade das soluções de dextrana aumenta com o acréscimo de 13,0% de Poliqualgerm[®], em relação ao controle. Nesta concentração, a viscosidade diminui em 5 dias (1,4744 cp), aumenta aos 10 dias (1,5648 cp), volta a diminuir em 15 dias (1,4543 cp), voltando a aumentar e atingindo valor máximo em 25 dias (1,5947) (Figura 12).

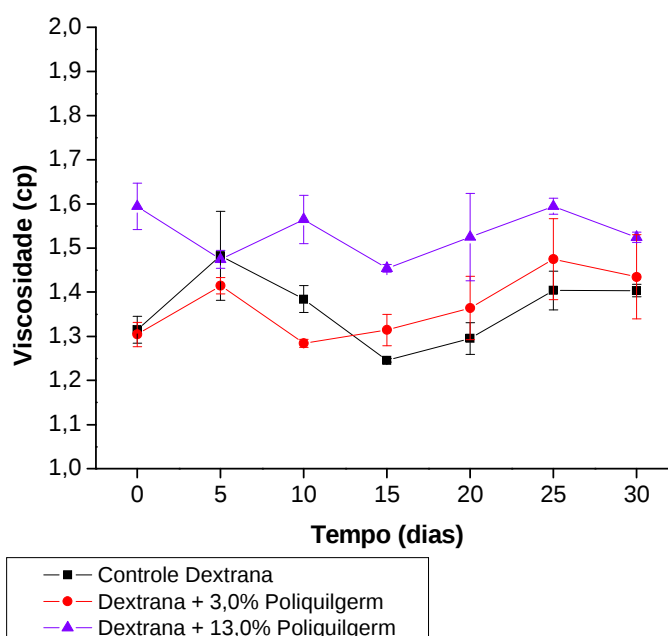


Figura 12: Quantificação comparativa da viscosidade de solução de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% após o acréscimo de 3,0 e 13,0% de Poliqualgerm[®], medidas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

A análise de variância realizada, modelo do tipo fatorial 3x8, indica que houve variação quanto aos valores de viscosidade obtidos, diretamente relacionados à concentração do produto e ao tempo de contato. A concentração 13,0% de Poliqualgerm[®] diferiu das concentrações 0 e 3,0%, tendo o maior valor de viscosidade encontrado. Quanto ao tempo de contato, a viscosidade aumentou em 5 dias, diminuiu

em 15 dias e apresentou valor máximo em 25 dias, para todas as soluções, na ausência e presença de Poli quilgerm[®] (Figura 13).

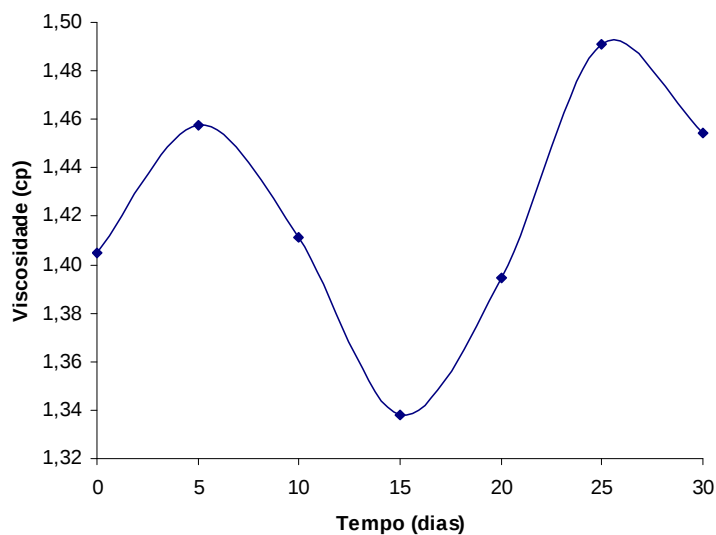


Figura 13: Variação da viscosidade de soluções de dextrana (60-90.000 Da) na ausência e presença de Poli quilgerm[®] ao longo dos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

5.1.3.1 - Quantificação da glicose liberada de soluções de dextrana acrescidas de Poli quilgerm[®] mediante método de ácido dinitroacetilsalicílico (ADNS).

A Tabela 17 reúne os dados encontrados da quantificação da glicose liberada, em mg/mL, das soluções de dextrana de diferentes concentrações acrescidas de Poli quilgerm[®], mediando o método de ADNS.

Tabela 17: Quantificação da glicose (mg/mL) em soluções de dextrana (60-90.000 Da) a 2,0% na ausência e presença de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm[®], nos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

Concentração de Poliquilgerm (%)	Tempo (dias)	Glicose (mg/mL)			
		repetições			média
		1	2	3	
0,0	0	0,0901	0,0965	0,0909	0,0925
	5	0,1012	0,0886	0,0996	0,0965
	10	0,1107	0,1012	0,0941	0,1020
	15	0,1083	0,1083	0,1004	0,1057
	20	0,1218	0,1052	0,1178	0,1149
	25	0,1439	0,1336	0,1431	0,1402
	30	0,1779	0,1218	0,1463	0,1487
3,0	0	0,1012	0,1107	0,0925	0,1015
	5	0,0901	0,1068	0,1028	0,0999
	10	0,1099	0,1241	0,1178	0,1173
	15	0,1241	0,1226	0,1234	0,1234
	20	0,136	0,1226	0,1336	0,1307
	25	0,1328	0,1241	0,1155	0,1241
	30	0,1368	0,1313	0,1297	0,1326
13,0	0	0,0957	0,106	0,1036	0,1018
	5	0,1012	0,0949	0,102	0,0994
	10	0,1249	0,1265	0,1075	0,1196
	15	0,1249	0,1344	0,117	0,1254
	20	0,121	0,1162	0,1178	0,1183
	25	0,1162	0,1273	0,1234	0,1223
	30	0,1313	0,1265	0,1281	0,1286

As dosagens de glicose, utilizando o método para determinação de açúcares redutores totais ADNS, indicaram aumento na quantidade de glicose liberada ao longo do período avaliado. A análise estatística realizada indica que somente o tempo foi significativo para a quantidade de glicose, independente da concentração do produto. No entanto, registrou-se que nos primeiros 20 dias a quantidade de glicose foi maior nas soluções de dextrana em contato com o Poliquilgerm[®] (0,1307 e 0,1183 mg/mL respectivamente para 3,0 e 13,0% do produto). Apenas a partir do 20º dia a solução controle apresentou aumento (0,1402 mg/mL) (Figura 14). De maneira geral, a quantidade de glicose liberada aumentou para todas as soluções ao longo de 40 dias (0,1866 mg/mL, valor médio) (Figura 15).

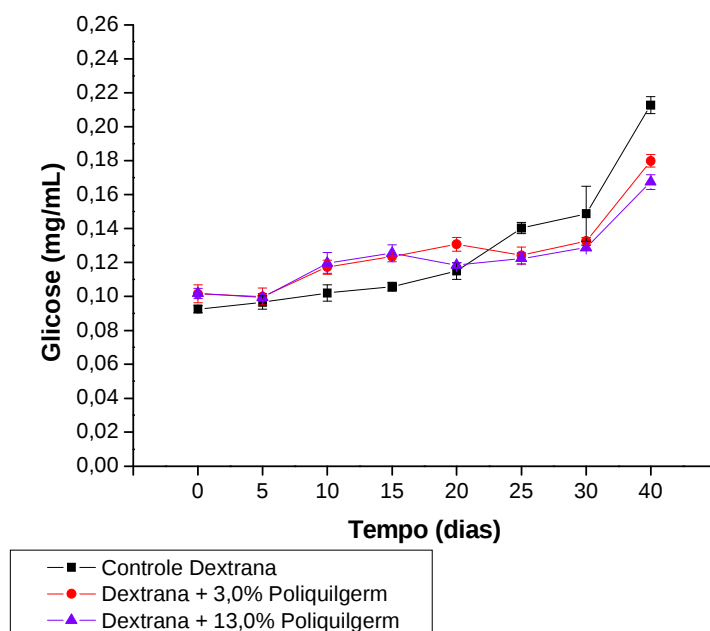


Figura 14: Quantificação comparativa da glicose (mg/mL) pelo método de ADNS, em solução de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0% após o acréscimo de 3,0 e 13,0% de Poliquilgerm[®], nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

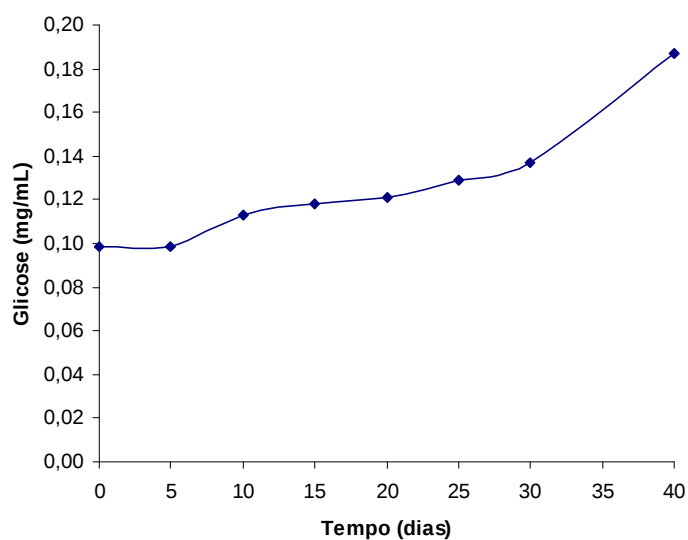


Figura 15: Variação da glicose liberada (mg/mL) em todas as soluções de dextrana (60-90.000 Da) na concentração 2,0%, na ausência e presença de Poliquilgerm[®], ao longo dos tempos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias

5.2 – Verificação da atividade do Poliquilgerm[®] sobre culturas de *Leuconostoc mesenteroides*.

5.2.1 – Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* no mesmo meio acrescido de 0,2; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm[®].

As culturas de *L. mesenteroides* mostraram decaimento nos valores de viscosidade obtidos após 24 horas em contato com o produto (Tabela 18).

Tabela 18: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm[®] (experimento I)

Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Viscosidade (cp)						
		repetições						média
		1	2	3	4	5	6	
0,0	0	1,3504	1,4130	-	-	-	-	1,3818
	1	1,3632	1,4250	1,4561	-	-	-	1,4148
1,0	0	1,1555	1,1870	1,2492	-	-	-	1,1971
	1	1,1229	1,1850	1,1853	1,1210	1,1500	1,1833	1,1584
2,0	0	1,1831	1,2450	1,2765	-	-	-	1,2350
	1	1,2809	1,3430	1,5308	1,1230	1,1500	1,2162	1,2746

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) Fatorial 3x2 (concentrações de Poliquilgerm[®] e presença ou ausência de inóculo), utilizando-se o software The SAS System 9.1. Apenas a variável Concentração de Poliquilgerm[®] foi estatisticamente significativa. As culturas na ausência de Poliquilgerm[®] (concentração 1 = 0%) diferiram das demais, apresentando maior média de viscosidade. As concentrações 1,0 e 2,0% do produto não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, a concentração 1,0% possui a menor média de viscosidade, sendo este o melhor resultado para o experimento. Assim, pode-se concluir através desta análise que a adição de Poliquilgerm[®] nas culturas de *L. mesenteroides* provoca a diminuição da viscosidade do meio (Figura 16). O parâmetro ausência e presença de inóculo não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Houve 18,13% de diminuição da viscosidade da cultura quando

adicionou-se 1,0% de Poliqualgerm[®] e 9,91% quando foi adicionado 2,0% (Tabela 19 e Figura 17).

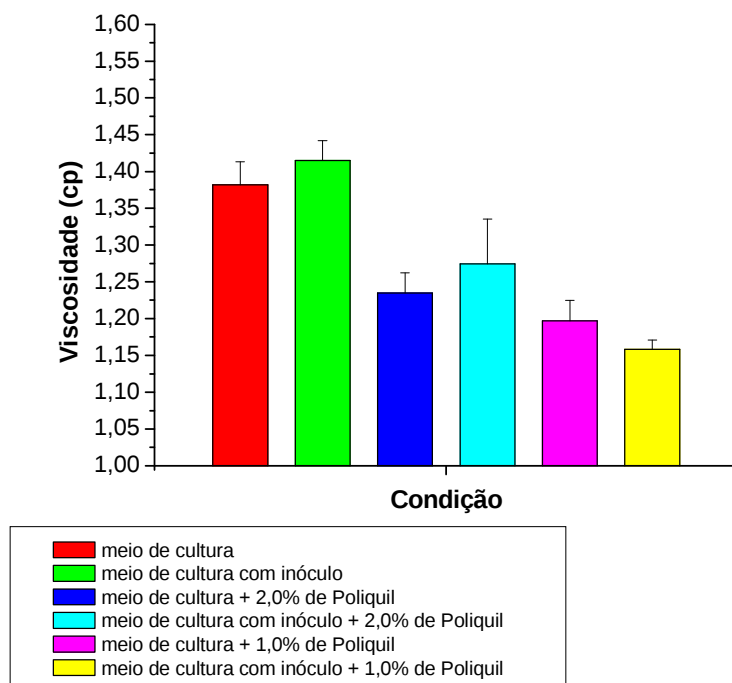


Figura 16: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 2,0 e 1,0% de Poliqualgerm[®] (experimento I)

Tabela 19: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliqualgerm[®]

Concentração de Poliqualgerm [®] (%)	Diminuição da viscosidade (%)
1,0	18,13
2,0	9,91

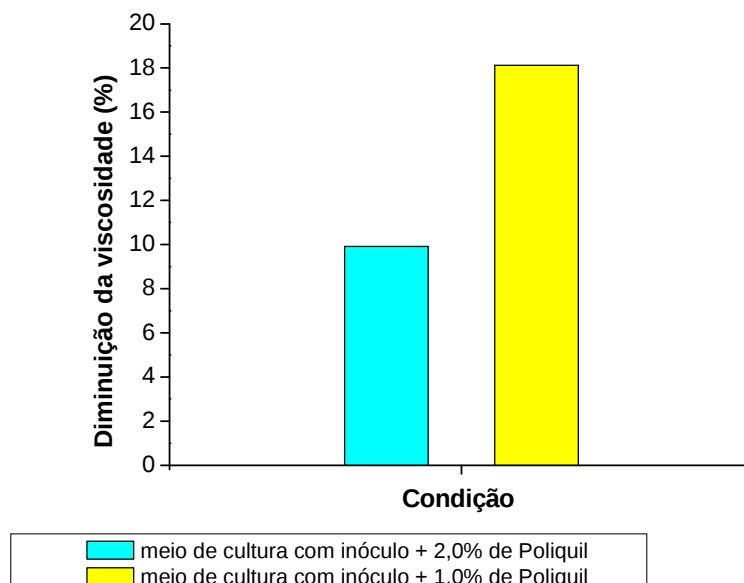


Figura 17: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 1,0 e 2,0% de Poliquilgerm® (experimento I)

No segundo experimento, as culturas de *L. mesenteroides* mostraram diminuição dos valores de viscosidade obtidos após 24 horas em contato com o produto (Tabela 20 e Figura 18).

Tabela 20: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento II)

Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Viscosidade (cp)			
		repetições			média
		1	2	3	
0,0	0	1,2715	1,3025	1,3645	1,3128
	1	1,7918	1,793	1,8508	1,8119
0,2	0	1,3954	1,6417	1,7057	1,5809
	1	1,4658	1,4947	1,5566	1,5057
1,0	0	1,4721	1,4892	-	1,4807
	1	1,4026	1,4597	1,4556	1,4393

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

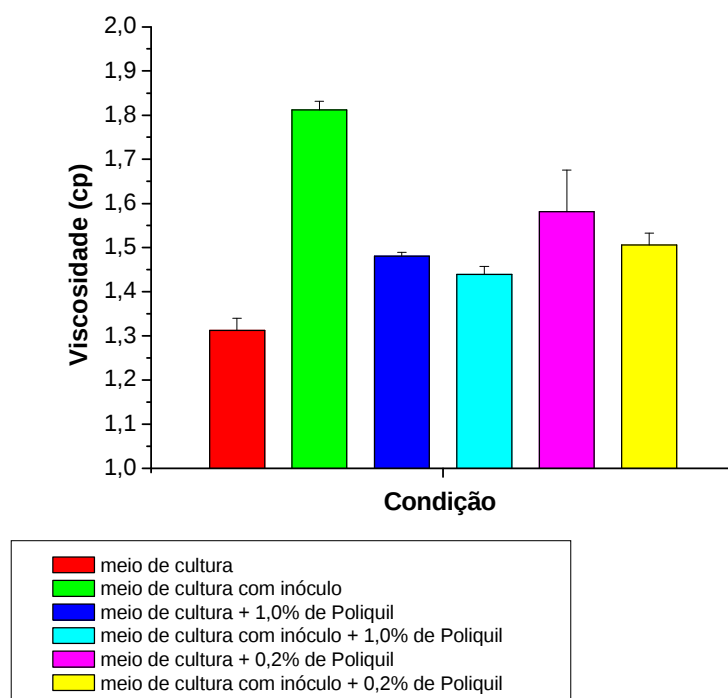


Figura 18: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliqualgerm® (experimento II)

A análise de variância (ANOVA) utilizando fatorial 3x2 realizada mostra que não houve diferenças significativas entre a ausência de Poliqualgerm® e as concentrações utilizadas no experimento (1,0 e 0,2%), com relação à variável viscosidade. A análise indica diferenças significativas entre a ausência e a presença de inóculo nos meios de cultura avaliados quanto à sua viscosidade. Os meios na presença do inóculo de *L. mesenteroides* apresentaram maior média de viscosidade (1,5856 cp). Entretanto, pôde-se verificar que houve 20,56% de diminuição da viscosidade da cultura quando adicionou-se 1,0% de Poliqualgerm® e 16,90% quando foi adicionado 0,2% (Tabela 21 e Figura 19).

Tabela 21: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliqualgerm®

Concentração de Poliqualgerm® (%)	Diminuição da viscosidade (%)
0,2	16,90
1,0	20,56

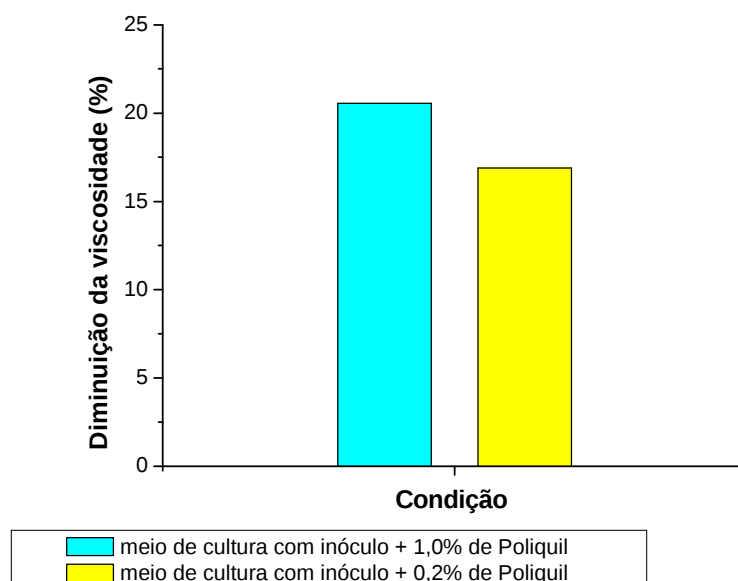


Figura 19: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento II)

Novamente, no terceiro experimento as culturas de *L. mesenteroides* mostraram diminuição dos valores de viscosidade obtidos após 24 horas em contato com o produto (Tabela 22 e Figura 20).

Tabela 22: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento III)

Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Viscosidade (cp)			
		repetições			média
		1	2	3	
0,0	0	1,4332	1,4332	-	1,4332
	1	1,9305	1,5662	-	1,7484
0,2	0	1,8578	1,4855	1,8891	1,7441
	1	1,7218	1,5921	1,4607	1,5915
1,0	0	1,2690	1,4346	1,6584	1,4540
	1	1,4645	1,4083	1,6419	1,5049

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

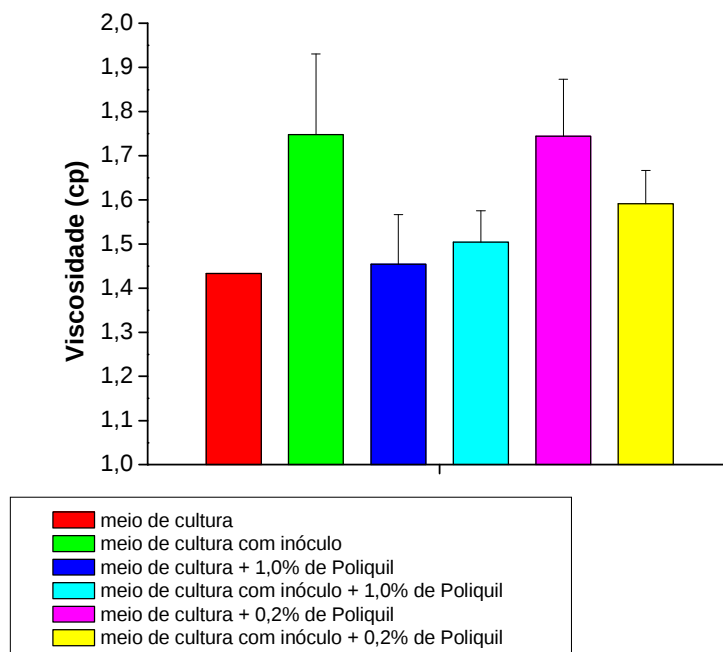


Figura 20: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®] (experimento III)

As culturas de *L. mesenteroides* mostraram decaimento nos valores de viscosidade obtidos após 24 horas em contato com o produto (Figura 20). A análise de Tukey não mostrou diferenças significativas entre as concentrações de Poliquilgerm[®] utilizadas no experimento (0; 0,2 e 1,0%). A maior média de viscosidade foi apresentada pela concentração 0,2%, maior que na ausência do produto. A análise mostra que não há diferenças significativas entre a ausência e presença de inóculo de *L. mesenteroides* com relação à viscosidade dos meios de cultura. A maior média de viscosidade ocorreu na presença do inóculo. Houve 13,92% de diminuição da viscosidade da cultura quando adicionou-se 1,0% de Poliquilgerm[®] e 8,97% quando foi adicionado 0,2% (Tabela 23 e Figura 21).

Tabela 23: Porcentagem de diminuição da viscosidade nas culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®]

Concentração de Poliquilgerm [®] (%)	Diminuição da viscosidade (%)
0,2	8,97
1,0	13,92

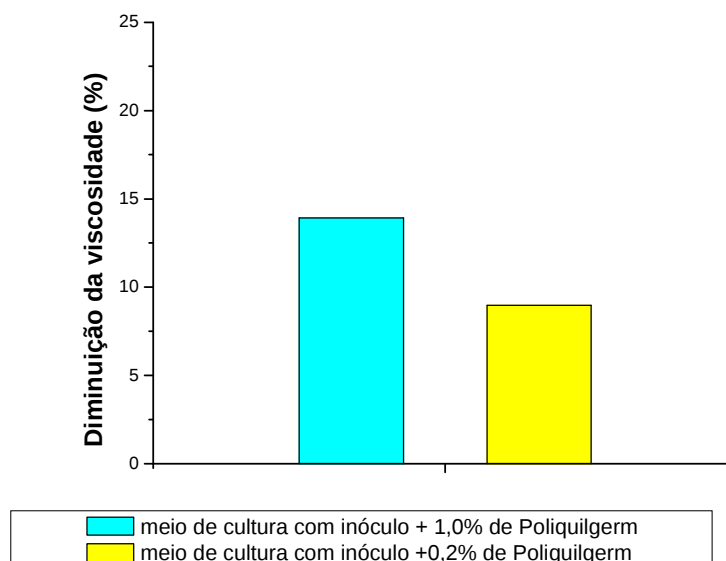


Figura 21: Porcentagem de diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento III)

A viscosidade dos fluidos nos processos industriais assume importância quando devem ser 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.

5.2.2 – Quantificação da absorbância das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* em meio Mayeux e Colmer nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (experimento III).

A tabela 24 apresenta os valores encontrados na quantificação da absorbância das culturas de *L. mesenteroides* na presença de 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, medidas a $\lambda = 540$ nm.

Tabela 24: Quantificação da absorbância das culturas de *L. mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® nos tempos 0; 6; 20 e 26 horas

Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Tempo (horas)	Turbidez ($\lambda = 540$ nm)			
			repetições			média
			1	2	3	
0,0	1	0	0,13	0,118	0,133	0,127
		6	0,469	0,386	-	0,428
		20	0,973	0,983	-	0,978
		26	1,018	1,008	-	1,013
0,2	0	0	0,008	0,001	0,009	0,006
		6	0,011	0,029	0,035	0,025
		20	0,012	0,011	0,003	0,009
		26	0,002	0,012	0,009	0,008
	1	0	0,206	0,221	0,187	0,205
		6	0,221	0,245	0,199	0,222
		20	0,308	0,36	0,311	0,326
		26	0,429	0,483	0,432	0,448
1,0	0	0	0,037	0,023	0,032	0,031
		6	0,148	0,155	0,148	0,150
		20	0,067	0,065	0,073	0,068
		26	0,095	0,122	0,1	0,106
	1	0	0,502	0,523	0,5	0,508
		6	0,575	0,573	0,568	0,572
		20	0,818	0,84	0,822	0,827
		26	0,943	0,948	0,92	0,937

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

L. mesenteroides, nas condições em que foi cultivado, atingiu o crescimento máximo no tempo de 20 horas, na ausência de Poliquilgerm®. Porém, quando o produto estava presente no meio de cultivo, mesmo após as 20 horas houve pequeno aumento da

absorbância, o que reflete no aumento do número de células. Estes dados indicam que o Poliquilgerm[®] interfere no crescimento da bactéria.

A análise por espectrofotometria na região do visível ($\lambda = 540 \text{ nm}$) nos intervalos 0; 6; 20 e 26 horas mostrou diminuição do crescimento do microrganismo de 53,86% nas primeiras 6 horas, 67,59% em 20 horas e 56,56% após 26 horas em contato com 0,2% de Poliquilgerm[®]. Quando em contato com 1,0% de Poliquilgerm[®], verificou-se diminuição do crescimento do microrganismo de 22,39% em 20 horas, e de 17,97% em 26 horas (Figura 22). Verificou-se que a maior diminuição ocorreu em 20 horas para ambas as concentrações do produto, sendo que a menor concentração de Poliquilgerm[®] (0,2%) mostrou-se mais eficiente para promover o controle de *L. mesenteroides*.

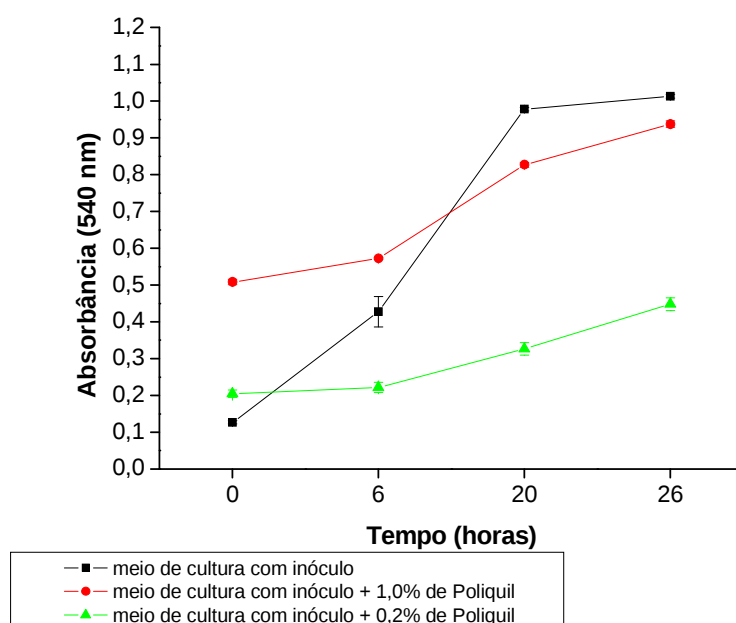


Figura 22: Quantificação da absorbância nas culturas de *L. mesenteroides* nas concentrações 0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm[®].

A análise de variância fatorial 3x2x4 mostrou que todas as variáveis analisadas apresentaram-se estatisticamente significativas. O parâmetro concentração de Poliquilgerm[®] apresentou-se estatisticamente significativo para a variável absorbância. As concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% diferiram entre si. A maior média dos valores de absorbância foram obtidas na ausência do produto (0,5798 nm), e a menor média na presença de 0,2% de Poliquilgerm[®] (0,1560 nm). Como a medida de absorbância por

espectrofotometria é indicativa de crescimento de microrganismos, estes resultados mostram o maior crescimento de *L. mesenteroides* na ausência do produto. Com a adição de 0,2% de Poliquilgerm observou-se o menor crescimento do microrganismo, mostrando ação inibitória do Poliquilgerm®. Todos os tempos diferiram estatisticamente para a variável absorbância. A maior média de absorbância e consequentemente o maior crescimento de *L. mesenteroides* ocorreu no tempo 26 horas. Pode-se observar ainda, que o crescimento da bactéria ocorreu gradativamente ao longo do tempo, condição normal na curva de crescimento dos microrganismos. Com relação ao inóculo, a presença ou ausência foi significativa para os valores de absorbância obtidos, sendo que a maior média foi encontrada na presença do inóculo.

5.2.3 - Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.

Empregando-se o meio de caldo de cana suplementado (CSN) para o cultivo de *L. mesenteroides*, pode-se observar que a cultura mostrou maior turbidez e consequentemente maior crescimento em pHs 5,0 e 6,0, independente da temperatura (Tabela 25).

Tabela 25: Verificação de crescimento das culturas por turbidez

Temperatura (°C)	pH			
	3,0	4,0	5,0	6,0
20	-	+	+++	+++
33	+	++	+++	+++

+ crescimento
– ausência de crescimento

Na temperatura de 33°C, a cultura mostrou decaimento do crescimento em valores de pH mais baixos. Por outro lado, a 20°C houve crescimento mínimo em pH 4,0, e ausência de crescimento em pH 3,0. A partir destes dados, em que se constatou que *L. mesenteroides* cresce em pHs mais baixos a 33°C, prosseguiu-se com os experimentos empregando-se o Poliquilgerm® nesta temperatura.

5.2.4 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.

Este experimento procurou avaliar o efeito do Poliquilgerm® nas culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de 0,2 e 1,0% do produto, em diferentes pHs. A Tabela 26 reúne os dados do experimento realizado à temperatura de 33°C.

Tabela 26: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C

pH	Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Viscosidade (cp)			
			repetições			média
			1	2	3	
6,0	0,0	0	1,284	1,284	1,284	1,284
		1	1,3746	1,4405	1,4695	1,4282
	0,2	0	1,4402	1,28	1,4969	1,4057
		1	1,4079	1,403	1,3735	1,3948
	1,0	0	1,2533	1,2807	1,3137	1,2826
		1	1,2848	1,3484	1,3484	1,3272
5,0	0,0	0	1,3028	1,3028	1,3028	1,3028
		1	1,3316	1,3341	1,3967	1,3541
	0,2	0	1,2428	1,2448	1,2454	1,2443
		1	1,3133	1,3077	1,3113	1,3107
	1,0	0	1,3335	1,3053	1,3047	1,3145
		1	1,376	1,3129	1,3796	1,3562
4,0	0,0	0	1,3801	1,3801	1,3801	1,3801
		1	1,4423	1,4585	1,4862	1,4623
	0,2	0	1,3148	1,3543	1,3573	1,3421
		1	1,4289	1,4558	1,519	1,4679
	1,0	0	1,3819	1,3866	1,4225	1,3970
		1	1,4169	1,4586	1,3933	1,4229
3,0	0,0	0	1,3876	1,3876	1,3876	1,3876
		1	1,4585	1,553	1,5858	1,5324
	0,2	0	1,4573	1,3064	1,4039	1,3892
		1	1,465	1,4088	1,4484	1,4407
	1,0	0	1,3944	1,373	1,3468	1,3714
		1	1,4063	1,3955	1,4039	1,4019

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

Na Figura 23, 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 Poliquilgerm® (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 Poliquilgerm®, 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).

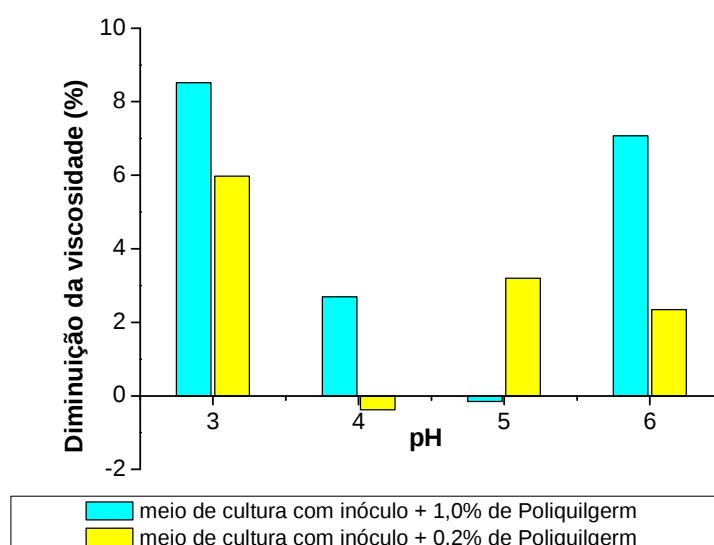


Figura 23: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C

A Tabela 26 e a Figura 23 indicam que *L. mesenteroides* tem sua atividade metabólica ativa nos pHs de 3,0 a 6,0, na temperatura de 33°C. Nestas condições, a bactéria pode prejudicar, quando presente, o processo de produção de etanol.

No mesmo experimento, repetido em temperatura de 28°C, pode-se verificar na Tabela 27 e Figura 24 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 Poliquilgerm®, 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 muito baixos, e houve

aumento na viscosidade quando utilizou-se 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm[®] em pH 5,0 (0,54 e 4,20%, respectivamente).

Tabela 27: Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura CSN e das culturas de *L. mesenteroides* no mesmo meio nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®], em diferentes pHs a 28°C

pH	Concentração de Poliquilgerm (%)	Inóculo	Viscosidade (cp)			
			repetições			Média
			1	2	3	
6,0	0,0	0	1,3048	1,3359	1,3048	1,3152
		1	1,6222	1,556	1,6829	1,6204
	0,2	0	1,2481	1,2524	1,3118	1,2707
		1	1,3527	1,3141	1,3818	1,3495
	1,0	0	1,6516	1,4711	1,4666	1,5298
		1	1,3771	1,3458	1,3197	1,3475
5,0	0,0	0	1,3331	1,3641	1,3331	1,3435
		1	1,371	1,3658	1,4252	1,3873
	0,2	0	1,3736	1,3711	1,3765	1,3737
		1	1,4432	1,5093	1,3842	1,4456
	1,0	0	1,3363	1,338	1,3691	1,3478
		1	1,3991	1,4079	1,3773	1,3948
4,0	0,0	0	1,3488	1,3488	1,4115	1,3697
		1	1,4177	1,5427	1,4767	1,4790
	0,2	0	1,382	1,4075	1,3514	1,3803
		1	1,4776	1,4776	1,4676	1,4743
	1,0	0	1,4082	1,4104	1,4392	1,4193
		1	1,3839	1,5133	1,5147	1,4706
3,0	0,0	0	1,2571	1,2886	1,2571	1,2676
		1	1,2864	1,3819	1,3526	1,3403
	0,2	0	1,2587	1,2302	1,2306	1,2399
		1	1,2626	1,2994	1,3289	1,2970
	1,0	0	1,2224	1,2243	1,2864	1,2444
		1	1,295	1,3566	1,2978	1,3165

0 = ausência de inóculo 1 = presença de inóculo

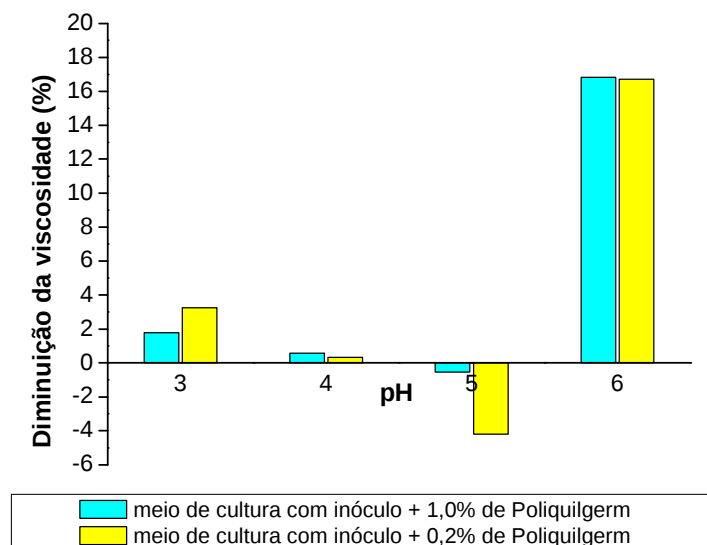


Figura 24: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas de *L. mesenteroides* acrescidas de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 28°C

Através do software The SAS System 9.1 realizou-se uma análise de variância fatorial 4x3x2, onde foram analisados os dados de diferentes pHs e concentrações de Poliquilgerm®. Para ambos os experimentos (33 e 28°C), verificou-se que foram significativos os resultados para os parâmetros pH, concentrações de Poliquilgerm®, presença e ausência de inóculo; além das interações pH x concentrações de Poliquilgerm®, concentrações x inóculo, e pH x concentrações de Poliquilgerm® x inóculo. 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), o que pode ser observado nas tabelas 20 e 21. 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, nem 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 (Figura 25). 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.

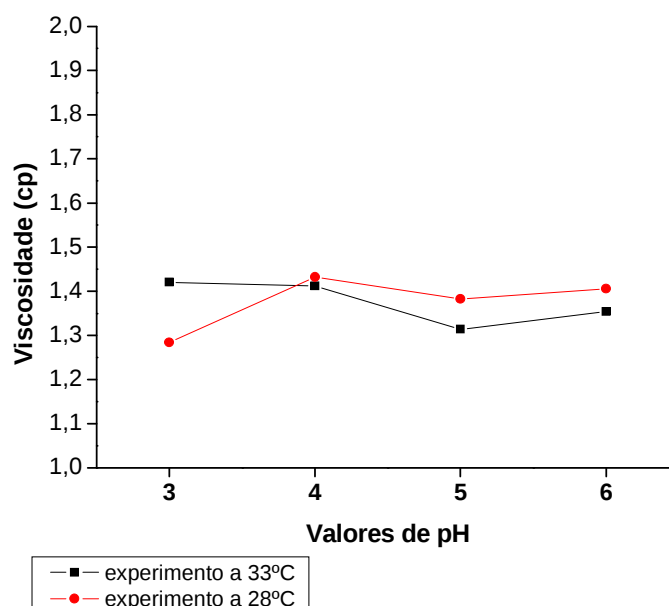


Figura 25: Valores médios de viscosidade encontrados em todas as amostras, em diferentes pHs

O parâmetro concentração de Poliqualgerm® 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 Poliqualgerm® 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 Poliqualgerm® foi significativa para os valores de viscosidade, que foram os menores valores encontrados (1,3539 cp) (Figura 26).

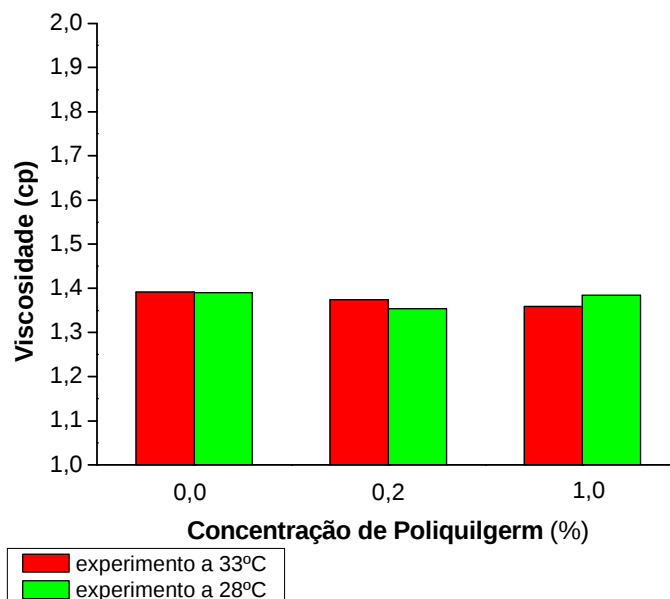


Figura 26: Valores médios de viscosidade encontrados em todas as amostras, em diferentes concentrações de Poliquilgerm®.

Embora a análise estatística indique não significância entre a temperatura e viscosidade, as Figuras 25 e 26 deixam claro que diferentes pHs e temperaturas podem alterar de forma sutil a viscosidade do meio.

5.2.5 - Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* por espectrofotometria, através de análise da biomassa.

Analizando a Tabela 28 e a Figura 27, verifica-se que houve maior crescimento da cultura em pHs 6,0 e 5,0, alcançando $12,95$ e $7,00 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

Tabela 28: Quantificação comparativa da biomassa de *L. mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C

pH	Concentração de Poliquilgerm (%)	UFC/mL (10^8)			
		repetições			média
		1	2	3	
6,0	0,0	13,82	11,48	13,54	12,95
	0,2	0,29	0,20	0,22	0,24
	1,0	0,44	0,44	0,24	0,37
5,0	0,0	6,98	6,99	7,04	7,00
	0,2	0,19	0,00	-	0,09
	1,0	0,00	0,00	0,00	0,00
4,0	0,0	0,31	0,51	0,09	0,30
	0,2	0,36	0,09	0,06	0,17
	1,0	0,72	0,74	0,74	0,73
3,0	0,0	0,46	0,33	0,64	0,47
	0,2	0,43	0,43	-	0,43
	1,0	0,74	0,68	0,92	0,78

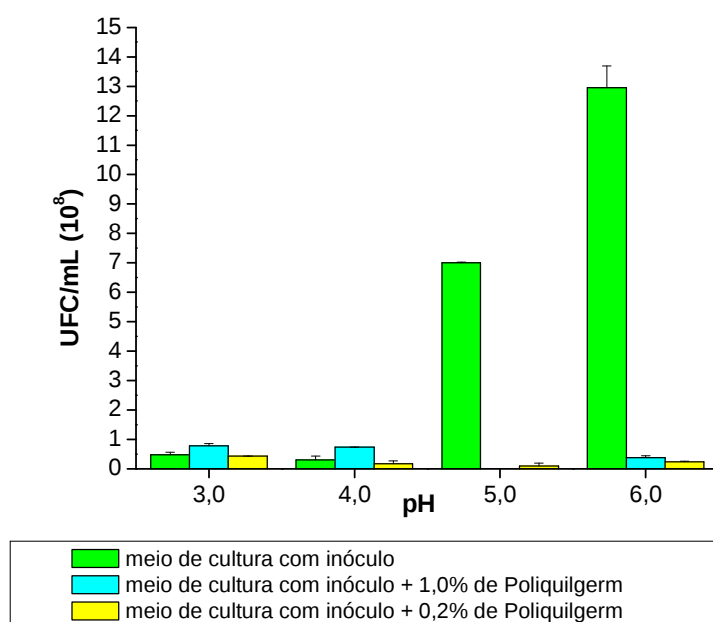


Figura 27: Quantificação comparativa da biomassa de *L. mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 33°C

Houve 97,1 e 100% de diminuição do crescimento de *L. mesenteroides* quando utilizados 1,0% de Poliquilgerm® 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 Poliquilgerm[®]. Em valores de pH 4,0 e 3,0, o crescimento da bactéria foi menor ($0,47$ e $0,30 \times 10^8$ UFC/mL). O pequeno aumento evidenciado na biomassa da cultura quando adicionou-se 1,0% do produto ($0,78$ e $0,73 \times 10^8$ UFC/mL) pode indicar que o Poliquilgerm[®] teria ação menos efetiva em meio ácido, na temperatura de 33°C.

Os resultados para o crescimento da cultura em 28°C (Tabela 29 e Figura 28) mostram, à semelhança da Tabela 28 e Figura 27, que houve maior crescimento em pHs 6,0 e 5,0, alcançando $6,73$ e $6,86 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

Tabela 29: Quantificação comparativa da biomassa de *L. mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®], em diferentes pHs a 28°C

pH	Concentração de Poliquilgerm (%)	UFC/mL (10^8)			
		repetições			média
		1	2	3	
6,0	0,0	6,56	6,87	6,77	6,73
	0,2	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,0	0,00	0,00	0,00	0,00
5,0	0,0	6,88	6,85	6,85	6,86
	0,2	5,43	5,54	5,44	5,47
	1,0	6,02	5,79	6,03	5,95
4,0	0,0	0,70	0,72	0,52	0,65
	0,2	0,58	0,59	0,43	0,54
	1,0	0,15	0,15	0,32	0,21
3,0	0,0	0,72	0,81	0,67	0,73
	0,2	0,92	0,76	0,94	0,87
	1,0	2,43	2,22	2,75	2,47

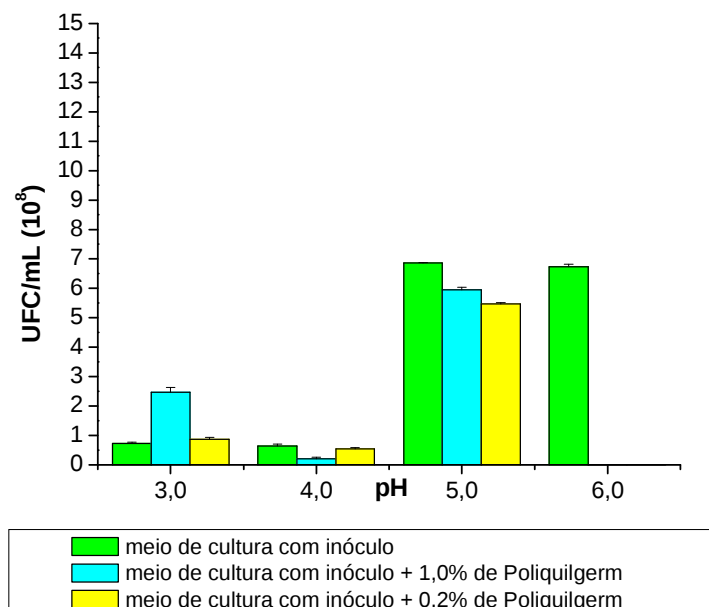


Figura 28: Quantificação comparativa da biomassa de *L. mesenteroides* nas concentrações 0,0; 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs a 28°C

No pH 6,0 houve 100% de diminuição do crescimento de *L. mesenteroides* em ambas as concentrações de Poliquilgerm®. 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 $0,65 \times 10^8$ UFC/mL). Houve aumento na biomassa da cultura quando adicionou-se 1,0% do produto em pH 3,0 ($2,47 \times 10^8$ UFC/mL) e quando adicionou-se 0,2% do produto em pH 4,0 ($0,54 \times 10^8$ UFC/mL). Entretanto, são valores menores de crescimento, uma vez que a cultura encontra-se em condições desfavoráveis de pH.

A Figura 29 indica a turvação da suspensão das culturas de *L. mesenteroides* após crescimento na ausência e presença de Poliquilgerm®.

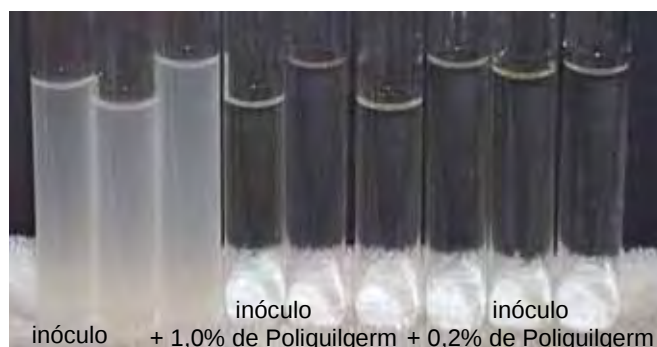


Figura 29: Indicação da turvação da cultura de *L. mesenteroides* ressuspensa em água destilada para demonstrar a efetiva ação inibitória do Poliquilgerm® (amostras em triplicata de experimento em pH 6,0 a 28°C)

Com a aplicação da análise estatística fatorial 4x3 para os experimentos de quantificação da biomassa, verificou-se que foram significativos os resultados para os parâmetros pH, concentração de Poliquilgerm® e a interação entre os dois parâmetros. 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, 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 Poliquilgerm®, 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 Poliquilgerm®). 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 Poliquilgerm®, respectivamente ($2,15$ e $1,72 \times 10^8$ UFC/mL) (Figura 30).

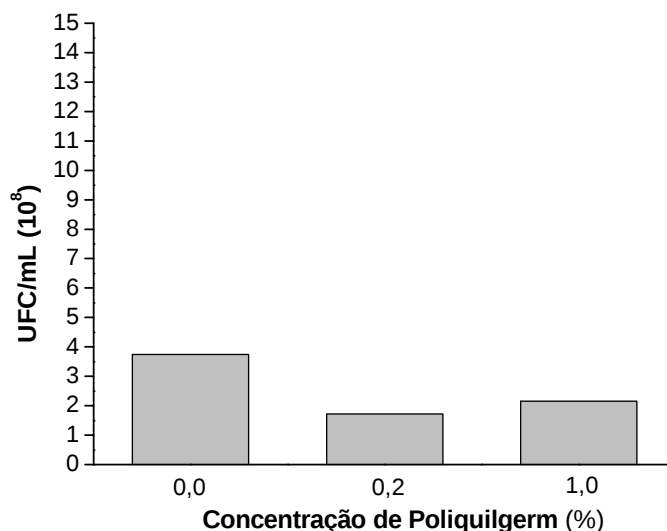


Figura 30: Valores médios de biomassa encontrados em todas as amostras, em diferentes concentrações de Poliquilgerm[®], em experimento realizado a 28°C

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 Poliquilgerm[®] neste pH tem menor eficiência.

Os melhores resultados deste experimento, em temperaturas de 33 e 28°C, deram-se 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 Poliquilgerm[®] (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 (Figura 23), mesmo a bactéria produzindo pouquíssima biomassa (Figura 27). Uma hipótese é a de que o microrganismo, em condições desfavoráveis de pH, seja estimulado para sua defesa em aumentar a produção de goma, e consequentemente a viscosidade do meio de cultura.

5.3 – Verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre cultura mista (*Leuconostoc mesenteroides* + *Saccharomyces cerevisiae*), em meio CSN.

5.3.1 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (*Leuconostoc mesenteroides* + *Saccharomyces cerevisiae*), acrescidas de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm®.

Foram efetuadas análises de viscosidade em dois viscosímetros para fins comparativos, pois considerou-se que o equipamento de Brookfield é mais sensível que o de Cannon-Fenske (disponível no laboratório de trabalho). Os dados são apresentados nas Tabelas 24 e 25.

Tabela 30: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm®, medida através do método de Cannon-Fenske

Concentração de Poliquilgerm (%)	Viscosidade (cp)			Média
	repetições			
	1	2	3	
0,0	1,2659	1,2093	1,1950	1,2234
0,2	1,2401	1,2211	1,3254	1,2622
1,0	1,2602	1,2744	1,2687	1,2678

Tabela 31: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm®, medida através de viscosímetro Brookfield

Concentração de Poliquilgerm (%)	Viscosidade (cp)			Média
	repetições			
	1	2	3	
0,0	1,32	1,40	1,68	1,47
0,2	1,47	1,30	1,38	1,38
1,0	1,41	1,18	1,53	1,37

Mediante os valores de viscosidade encontrados nas Tabelas 30 e 31, verificou-se que as mesmas amostras apresentaram resultados diferentes quando analisadas em viscosímetros distintos. Os valores de viscosidade encontrados no viscosímetro de Cannon-Fenske foram menores, apresentando uma variação entre as amostras que sugere um pequeno aumento de viscosidade com a adição de Poliquilgerm® (Figura 31). No entanto, os valores observados na Tabela 30 não detectaram alteração significativa devido à adição do produto nas duas concentrações. Por outro lado, os valores de

viscosidade encontrados quando utilizou-se o viscosímetro de Brookfield apresentaram maior variação entre as diferentes concentrações de Poliquilgerm[®] (Tabela 31), além de serem valores mais altos (Figura 32).

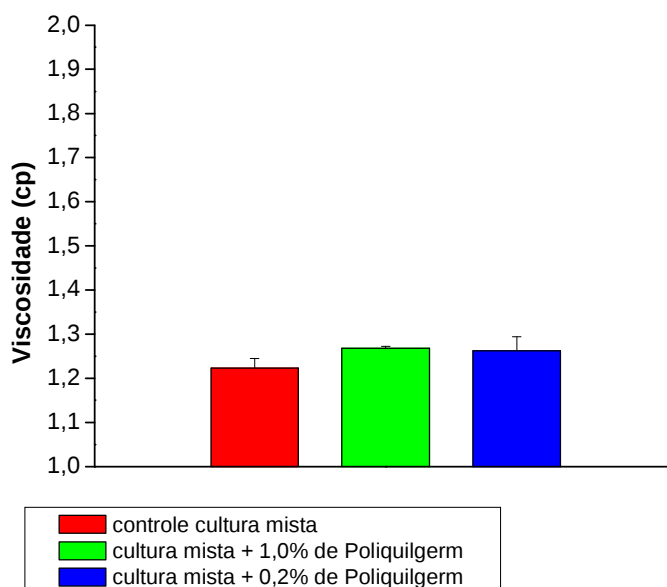


Figura 31: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm[®], medida através do método de Cannon-Fenske

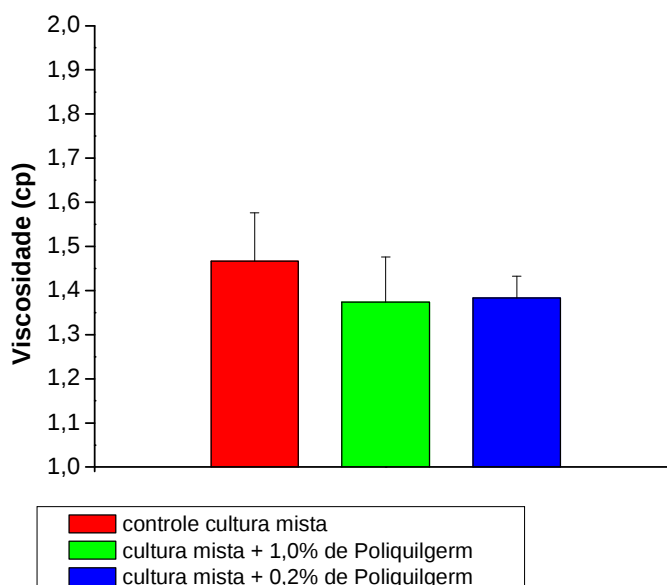


Figura 32: Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas na ausência e presença de Poliquilgerm[®], medida através de viscosímetro Brookfield

Deste modo, diante das análises realizadas neste viscosímetro observou-se uma importante diminuição de viscosidade quando utilizou-se 1,0 e 0,2% do produto (6,80 e 6,12%, respectivamente). Diferentemente, as análises realizadas pelo viscosímetro de Cannon-Fenske mostraram um pequeno aumento na viscosidade quando utilizadas as mesmas concentrações de Poliquilgerm® (3,63 e 3,17%, respectivamente), e que na verdade podem ser superiores quando avaliadas em equipamento de maior sensibilidade (Figura 33).

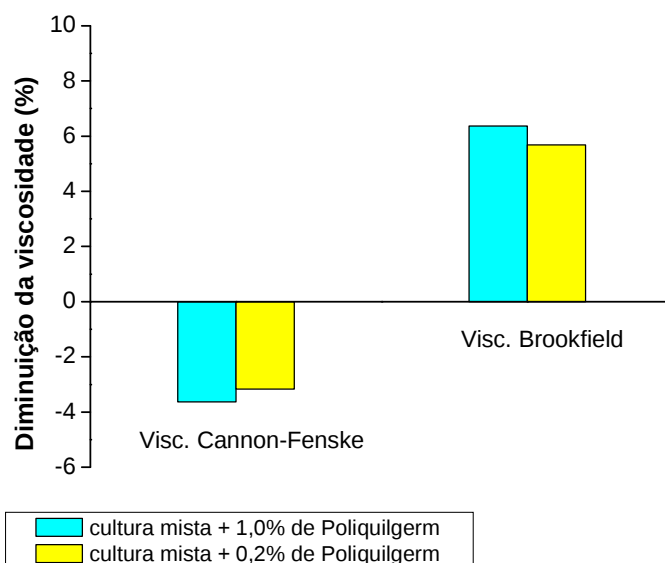


Figura 33: Quantificação comparativa da diminuição da viscosidade das culturas mistas tratadas com Poliquilgerm®, medidas em diferentes viscosímetros

A análise estatística realizada analisou os dados de viscosidade dos dois viscosímetros, e verificou-se que os valores não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$). Deste modo, o teste de Tukey mostrou que as concentrações de Poliquilgerm® utilizadas não diferiram entre si, para ambos os viscosímetros. Para o viscosímetro de Cannon-Fenske, a maior média de viscosidade encontrada ocorreu na presença de 1,0% do produto (1,2678 cp), seguida de 0,2% (1,2622 cp). Quando utilizado o viscosímetro de Brookfield, verificou-se que a maior média dos valores de viscosidade encontrados ocorreu na ausência do produto (1,4667 cp), seguida de 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm® (1,3833 e 1,3733 cp), o que pode ser observado nas tabelas 30 e 31.

5.3.2 – Quantificação da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* através de contagem de células em câmara de Neubauer.

Avaliou-se a atividade do Poliquilgerm[®] sobre a viabilidade celular de *S. cerevisiae* mediante contagem em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 32, 33 e 34.

Tabela 32: Viabilidade das células de levedura (em porcentagem), na ausência e presença de Poliquilgerm[®] nos tempos 0 e 24 horas

% Viabilidade						
repetições	controle inóculo		0,2% POL		1,0% POL	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	98,61	99,29	78,77	99,33	70,01	98,28
2	98,72	99,4	57,64	98,82	57,93	99,22
3	99,23	99,48	65,58	99,26	36,5	99,06
Média	98,85	99,39	67,33	99,14	54,81	98,85

Tabela 33: Porcentagem de brotamento das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm[®] nos tempos 0 e 24 horas

% Brotamento						
repetições	controle inóculo		0,2% POL		1,0% POL	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	23,64	5,59	15,54	6,25	16,2	5,19
2	23,44	1,55	11,76	2,93	18,76	5,02
3	18,8	0,51	10,61	1,07	7,25	1,4
Média	21,96	2,55	12,64	3,42	14,07	3,87

Tabela 34: Viabilidade dos brotos (em porcentagem) das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm[®] nos tempos 0 e 24 horas

% Viabilidade dos Brotos						
repetições	controle inóculo		0,2% POL		1,0% POL	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	98,57	98,66	74,05	98,68	74,05	91,81
2	99,73	100	60,88	95,41	54,15	95,08
3	100	100	55,68	100	26,8	83,45
Média	99,43	99,55	63,54	98,03	51,67	90,11

Mediante os dados da Tabela 32 e da Figura 34 verificou-se que a adição Poli quilgerm[®] à cultura mista de *S. cerevisiae* e *L. mesenteroides* afetou a viabilidade celular das leveduras apenas no tempo inicial (T0). Neste tempo, observou-se que as amostras contendo apenas inóculo apresentaram porcentagens de viabilidade de quase 100%, havendo uma diminuição de 44,5 e 32% quando se adicionou 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm[®], respectivamente. Constatou-se que a maior concentração do produto causou maiores danos às células. Entretanto, após 24 horas em contato com o produto, observou-se maiores taxas de reprodução das células de levedura, o que fez com que praticamente não fosse observada alteração na porcentagem de viabilidade das mesmas quando comparada com o inóculo.

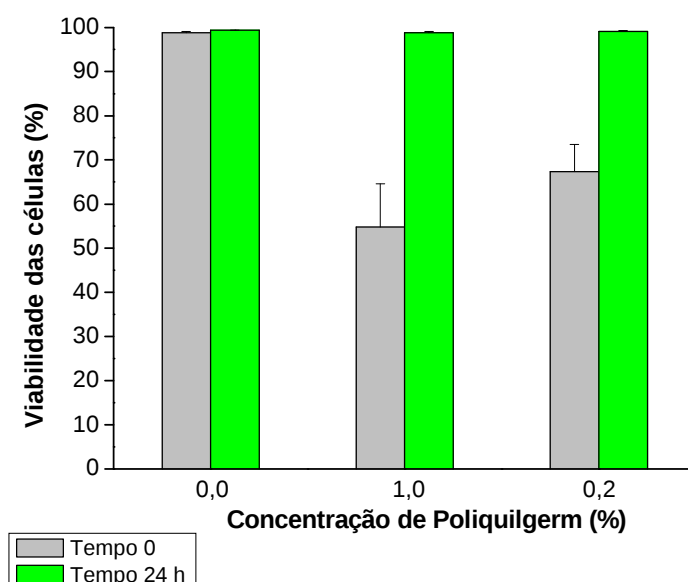


Figura 34: Porcentagem comparativa da viabilidade das células de levedura na ausência e presença de Poli quilgerm[®] nos tempos 0 e 24 horas

Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que a adição de Poli quilgerm[®] afetou o brotamento apenas no tempo inicial (T0), quando houve 36 e 42,4% de redução na porcentagem de brotamento quando utilizou-se 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm[®], respectivamente (Tabela 33). Após 24 horas, a porcentagem das amostras contendo apenas inóculo diminuiu cerca de 88%, e observou-se aumento do brotamento nas amostras acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poli quilgerm[®] (52 e 34%, respectivamente) (Figura 35).

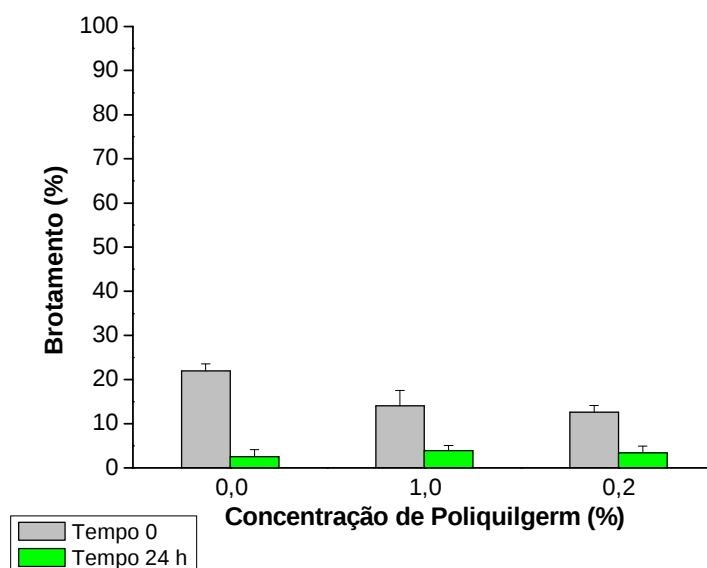


Figura 35: Porcentagem comparativa de brotamento das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas

Em relação à porcentagem de viabilidade dos brotos, a Tabela 34 indica que estes somente foram afetados pelo produto no tempo inicial (T0), quando verificou-se diminuição de 48 e 36% para 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®. Após 24 horas, a porcentagem de viabilidade dos brotos nas amostras contendo apenas inóculo permanece praticamente a mesma. No entanto, há redução de 9,5 e 1,5% quando adicionados 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm® (Figura 36). Resta investigar qual a concentração de aplicação do Poliquilgerm® que não interfere na viabilidade dos brotos.

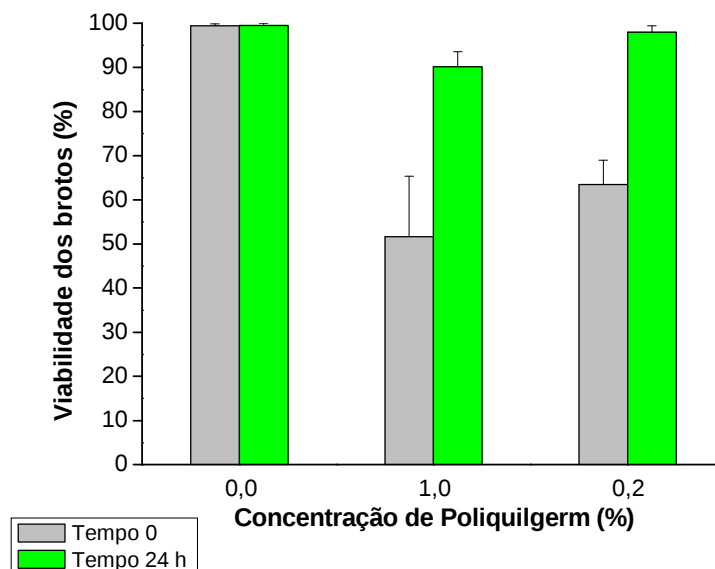


Figura 36: Porcentagem comparativa da viabilidade dos brotos das células de levedura na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas

Não houve formação de flocos nas amostras analisadas.

Bertoletti et al. (2007a), verificou em seu trabalho que o Poliquilgerm® apresentou ação microbiostática em baixa concentração e microbiocida em concentrações mais elevadas sobre *S. cerevisiae*. Verificou-se ação microbiostática no crescimento celular quando utilizados 1,0; 5,0; 10 e 20% de Poliquilgerm®; porém a partir do tempo 48 horas, as células que se adaptaram ao produto voltaram a apresentar crescimento. Ao final de 72 horas, houve efeito microbiocida apenas na concentração de 20% do produto, onde a inibição atingiu cerca de 99% do crescimento da cultura. Os mesmos autores (2007b), utilizando-se culturas puras e mistas de *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, verificaram ação biocida do Poliquilgerm® sobre a bactéria, sendo que a levedura manteve a viabilidade nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0% do produto. Mediante os dados obtidos neste experimento e os dados citados na literatura, concluiu-se que as células de leveduras após permanecerem em contato por 24 horas, adaptam-se ao produto Poliquilgerm®. A concentração de 1,0% foi a que mais afetou as células de leveduras e brotos em sua viabilidade no tempo inicial.

Utilizando-se análise de variância fatorial 3x2, avaliou-se o efeito das concentrações de Poliquilgerm® utilizadas e o tempo, assim como a interação entre os dois. Os resultados mostraram que todos os parâmetros foram estatisticamente

significativos para a variável Porcentagem de Viabilidade e Porcentagem de Viabilidade dos brotos. No caso da variável Porcentagem de Brotamento, apenas o parâmetro tempo e a interação entre concentração do produto x tempo foram significativos.

O teste de Tukey para a variável Porcentagem de Viabilidade mostrou que a ausência do produto diferiu estatisticamente dos demais, apresentando maior média (99,12%), seguida das concentrações 0,2 e 1,0% (83,23 e 76,83 %, respectivamente). Entre estas concentrações não houve diferenças significativas. No caso da Porcentagem de Brotamento, os valores não diferiram entre si, e as maiores médias foram respectivamente para as concentrações 0,0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm® (12,25; 8,97 e 8,03%). Para Porcentagem de Viabilidade dos brotos, novamente a ausência do produto diferiu estatisticamente dos demais, apresentando maior média (99,49%), seguida das concentrações 0,2 e 1,0% (80,78 e 70,89 %, respectivamente).

O parâmetro tempo diferiu estatisticamente para todas as variáveis, sendo que apresentou maior média em 24 horas para Porcentagem de Viabilidade e Porcentagem de Viabilidade dos brotos (99,13 e 95,90%). Para Porcentagem de Brotamento a maior média se deu no tempo inicial (16,22%).

5.3.3 – Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* através de plaqueamento pela técnica Pour Plate.

A tabela 35 mostra os valores de UFC/mL obtidos mediante plaqueamento da bactéria *L. mesenteroides*, e que não há dados na primeira repetição do experimento para o tempo 24 horas. Isto se deve ao fato de que, nos experimentos iniciais não observou-se crescimento do microrganismo após 24 horas, inclusive nas amostras controle contendo apenas inóculo. Diante destes resultados e supondo que as bactérias não estivessem mortas, resolveu-se submeter as amostras após este tempo à irradiação de 30 segundos em desruptor de célula ultra sônico (100 Wattz de Potência e 19 KHz). Em seguida, as amostras foram plaqueadas normalmente, e observou-se crescimento. Deste modo, repetiu-se o mesmo procedimento para as demais repetições do experimento. Pode-se supor para explicar este fato que após 24 horas de cultivo em cultura mista, as células da bactéria ficaram aderidas às células de levedura, não “aparecendo” no plaqueamento.

Tabela 35: Quantificação comparativa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL 10^6) encontradas no plaqueamento de *L. mesenteroides* na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas

repetições	UFC/mL (10^6)					
	controle inóculo		0,2% POL		1,0% POL	
	T0	T24	T0	T24	T0	T24
1	5,9	*	0,5	*	2,15	*
2	1,81	15,92	0,04	1,27	0	0,12
3	6,25	36,85	1,19	4,57	1,01	0,97
Média	4,65	26,39	0,58	2,92	1,05	0,55

* não verificou-se crescimento

A Figura 37 insere dados de que as amostras contendo apenas inóculo apresentaram maior crescimento que as amostras contendo Poliquilgerm®, e também que após 24 horas ocorreu um aumento de 467,5% nas UFC/mL do inóculo. No tempo inicial, já foi possível observar que houve 77,4 e 87,5% de diminuição nas UFC/mL da bactéria contaminante quando utilizados 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®, respectivamente. Após 24 horas a inibição torna-se mais evidente, pois ocorre 98 e 89% quando adicionados 1,0 e 0,2% do produto, respectivamente. No tempo inicial a concentração de 0,2% de Poliquilgerm® mostrou-se mais eficiente na inibição de *L. mesenteroides*, no entanto após 24 horas a concentração de 1,0% apresentou melhores resultados.

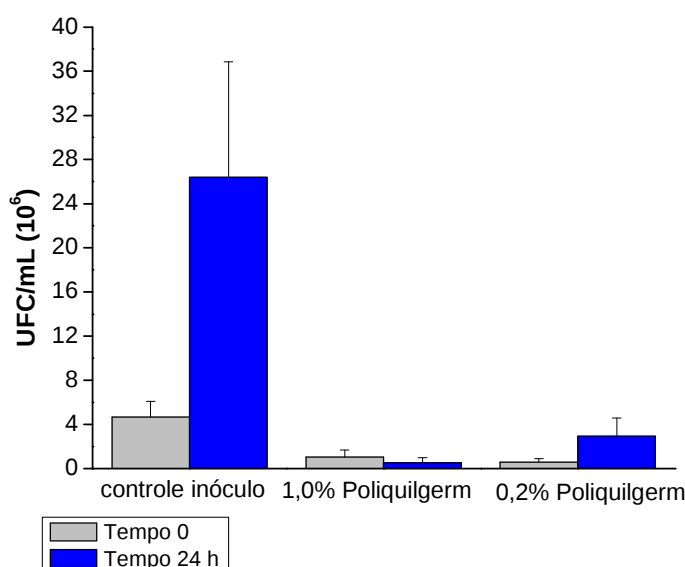


Figura 37: Quantificação comparativa das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL 10^6) encontradas no plaqueamento de *L. mesenteroides* na ausência e presença de Poliquilgerm® nos tempos 0 e 24 horas

A análise de variância utilizada mostrou que todos os parâmetros foram estatisticamente significativos para a variável UFC/mL de *L. mesenteroides*. O teste de Tukey revelou que os resultados não diferiram em relação às concentrações de Poliquilgerm[®] utilizadas, apenas com relação à ausência do produto. Assim, a maior média encontrada foi 13,35 UFC/mL 10⁶ na ausência de Poliquilgerm[®], seguida de 1,51 e 0,85 UFC/mL 10⁶ para 0,2 e 1,0% do produto, respectivamente. O parâmetro tempo apresentou diferenças significativas entre 0 e 24 horas, sendo que nesta última foram encontrados 9,95 UFC/mL 10⁶ contra 2,09 UFC/mL 10⁶ no tempo inicial.

5.4 - Verificação da atividade do Poliquilgerm® diretamente sobre parede celular de bactérias Gram-Positivas, Gram-Negativas e leveduras.

Com o objetivo de esclarecer sobre a atividade microbiocida do Poliquilgerm®, procurou-se averiguar se haveria hidrólise da parede celular das células de bactérias Gram (+) (*L. fermentum* e *L. mesenteroides*), Gram (-) (*E. coli*), bem como de leveduras (*S. cerevisiae* e *C. albicans*). O produto foi aplicado sobre células em duas condições: vivas e mortas. Após 72 horas de contato, a média de glicose liberada foi insignificante para os microrganismos estudados, inferior a 0,1 mg/mL (Tabela 36).

Tabela 36: Quantificação comparativa dos valores médios de glicose (mg/mL) encontrados para bactérias submetidas a dois tratamentos e a diferentes concentrações de Poliquilgerm® ao longo do tempo

Microrganismo	Tratamento	Tempo (horas)	Concentração de Poliquilgerm (%)		
			0,0	0,1	0,2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	autoclavado	0	0,0692	0,1127	0,1054
		24	0,0451	0,0522	0,1033
		48	0,1018	0,088	0,092
		72	0,0368	0,0538	0,0834
		Média	0,063	0,077	0,096
	sem autoclavar	0	0,0503	0,0453	0,0448
		24	0,0606	0,063	0,0617
		48	0,0454	0,0661	0,0614
		72	0,0533	0,0678	0,0679
		Média	0,052	0,061	0,059
<i>Escherichia coli</i>	autoclavado	0	0,0417	0,0417	0,0459
		24	0,0395	0,0411	0,0395
		48	0,0431	0,0431	0,0533
		72	0,0398	0,0366	0,0354
		Média	0,041	0,041	0,044
	sem autoclavar	0	0,069	0,0728	0,0627
		24	0,0529	0,0555	0,0425
		48	0,0627	0,0598	0,0674
		72	0,0657	0,0649	0,0566
		Média	0,063	0,063	0,057

Tabela 37: Quantificação comparativa dos valores médios de glicose (mg/mL) encontrados para leveduras submetidas a dois tratamentos e a diferentes concentrações de Poliquilgerm® ao longo do tempo

Microrganismo	Tratamento	Tempo (horas)	Concentração de Poliquilgerm (%)		
			0,0	0,1	0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	autoclavado	0	0,0403	0,0448	0,0435
		24	0,0403	0,0398	0,0395
		48	0,0458	0,0533	0,0527
		72	0,0733	0,0387	0,0374
		Média	0,050	0,044	0,043
	sem autoclavar	0	0,0617	0,068	0,0685
		24	0,0361	0,0437	0,0452
		48	0,0377	0,0881	0,0604
		72	0,0427	0,1323	0,0669
		Média	0,045	0,083	0,060
<i>Candida albicans</i>	autoclavado	0	0,048	0,0464	0,0506
		24	0,0654	0,0395	0,0417
		48	0,048	0,0484	0,0469
		72	0,039	0,0343	0,0371
		Média	0,050	0,042	0,044
	sem autoclavar	0	0,0485	0,1563	0,164
		24	0,0457	0,0478	0,0614
		48	0,0889	0,0555	0,0886
		72	0,0481	0,0587	0,0533
		Média	0,058	0,080	0,092

Pode-se observar nas Tabelas 36 e 37 e Figura 38 que *L. fermentum* foi o microrganismo que apresentou os maiores valores médios de glicose (mg/mL) ao longo do tempo, aumentando gradativamente a medida em que se aumentou a concentração de Poliquilgerm®. Para *E. coli*, os valores permaneceram muito próximos; enquanto que para *S. cerevisiae* e *C. albicans* os valores de glicose diminuíram em relação ao controle.

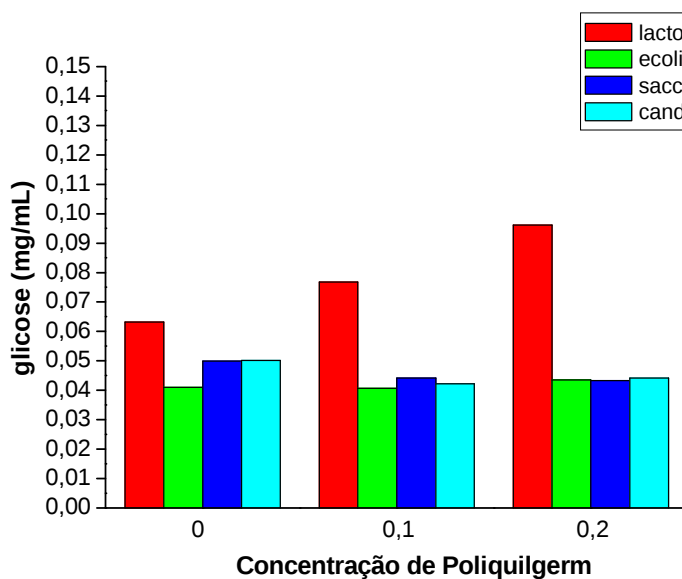


Figura 38: Valores médios de glicose (mg/mL) encontrados ao longo do tempo para os diferentes microrganismos, na ausência e presença de 0,1 e 0,2% de Poliquilgerm®, submetidos ao tratamento em autoclave

Nas Tabelas 36 e 37 e Figura 39, verifica-se que os valores de glicose (mg/mL) permaneceram muito próximos para *L. fermentum*. Para *E. coli*, os valores diminuíram pouco com o acréscimo de 0,2% do produto. Para *S. cerevisiae* a maior média foi encontrada com o acréscimo de 0,1% de Poliquilgerm®, enquanto que para *C. albicans* os valores aumentaram com o acréscimo de 0,2% do produto.

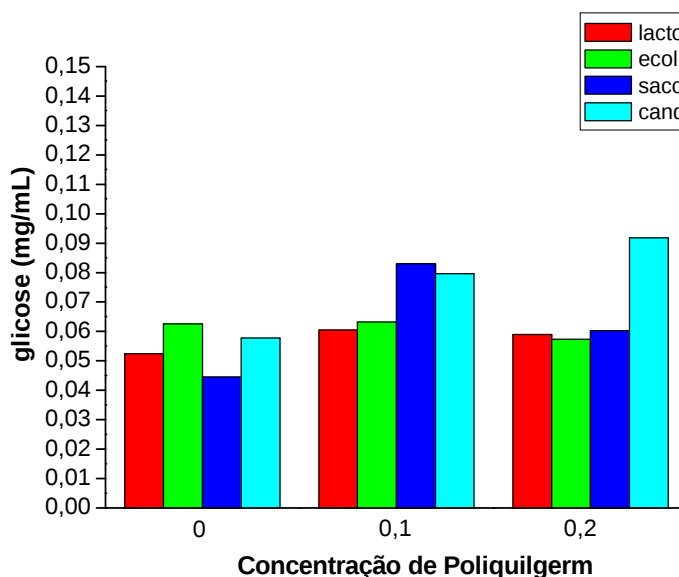


Figura 39: Valores médios de glicose (mg/mL) encontrados ao longo do tempo para os diferentes microrganismos, na ausência e presença de 0,1 e 0,2% de Poliquilgerm®, que não foram submetidos ao tratamento em autoclave

A análise estatística fatorial 4x2x3x4 aplicada, que analisou os valores de glicose obtidos neste experimento, demonstrou que foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) os parâmetros microrganismo, tratamento pela autoclave (ou não), tempo e a interação microrganismo x tratamento. O parâmetro concentração de Poliquilgerm® não foi significativo. O teste de Tukey realizado revelou que *L. fermentum* foi o microrganismo que diferiu dos demais, apresentando a maior média de glicose, embora com valores baixos (0,0680 mg/mL), o que pode ser observado na Figura 38. Em relação ao tratamento por autoclave, houve diferenças significativas entre os valores de glicose obtidos por microrganismos autoclavados e não autoclavados, sendo que a maior média foi obtida junto aos microrganismos que não foram submetidos ao processo de esterilização (0,0643 mg/mL). Não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de Poliquilgerm®, e verificou-se maior média entre os microrganismos que receberam 0,2% do produto (0,0619 mg/mL), seguido dos que receberam 0,1 e 0,0%, respectivamente (0,0612 e 0,0527 mg/mL). Em relação ao tempo, o tempo inicial (0 horas) diferiu dos demais, apresentando a maior média (0,0667mg/mL).

Estes resultados, somados com a não hidrólise da dextrana, podem reforçar a hipótese de que a ação do Poliquilgerm[®] estaria induzindo a morte celular pela alteração da membrana, sendo que uma das hipóteses poderia ser alteração na bomba de prótons.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações do derivado químico do óleo de mamona (Poliquilgerm[®]) sobre a diminuição da viscosidade bem como a capacidade de hidrólise sobre as ligações glicosídicas de soluções de dextrana; bem como seu efeito diretamente sobre a cultura de *L. mesenteroides*. A esse respeito, apresentam-se as seguintes conclusões:

6.1 – Sobre hidrólise da dextrana

- ✓ Concentrações crescentes de dextrana promovem maior viscosidade em soluções aquosas após 24 horas de preparo;
- ✓ Diferenças em viscosidade da dextrana na ausência e presença de Poliquilgerm[®] foram insignificantes;
- ✓ O Poliquilgerm[®] não hidrolisa a dextrana, pois foram encontrados baixos índices de ART liberados utilizando-se os métodos de glicose oxidase e ADNS.

6.2 – Sobre a viscosidade da cultura de *L. mesenteroides*

- ✓ Nas concentrações 0,2; 1,0 e 2,0% o Poliquilgerm[®] diminui a viscosidade das culturas em meio Mayeux e Colmer e CSN após 24 horas; além de inibir o crescimento de *L. mesenteroides* após 6 horas em contato com 0,2% do produto,

e 20 horas em contato com 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm.

- ✓ Em meio de cultivo com pH abaixo de 4,0, *L. mesenteroides* sofre menor inibição do crescimento em 28 e 33°C;
- ✓ Poliquilgerm[®] possui ação menos efetiva em valores de pH 3,0 e 4,0.

6.3 - Sobre cultura mista de *L. mesenteroides* e *S. cerevisiae*

- ✓ O Poliquilgerm[®] em cultura mista diminui a viscosidade quando presente, além de inibir o crescimento de *L. mesenteroides*;
- ✓ Os viscosímetros de Cannon-Fenske e Brookfield apresentam sensibilidade diferente ao medir valores de viscosidade em centipoise (cp);
- ✓ *S. cerevisiae* apresenta sensibilidade ao Poliquilgerm[®] nas concentrações estudadas, afetando a viabilidade celular e dos brotos apenas no tempo inicial (T0), adaptando-se a seguir e atingindo o mesmo nível de crescimento do controle, após 24 horas.

6.4 – Sobre a atividade do Poliquilgerm[®] na parede celular de diferentes microrganismos, vivos e mortos

- ✓ Considerando-se que não se obteve resultados com a liberação de quantidades significativas de ART da parede celular de células vivas e mortas e sobre hidrólise da dextrana, pode-se inferir que a ação do Poliquilgerm[®] esteja afetando outro sítio celular para induzir a morte das células.

Estes dados podem ser de grande interesse para o setor sucroalcooleiro, uma vez que verificou-se neste estudo que o produto Poliquilgerm[®] não afetou a viabilidade de *S. cerevisiae* em baixas concentrações após 24 horas, e no entanto, promoveu importante diminuição da viscosidade produzida por *L. mesenteroides*, bem como inibição do seu crescimento, após este mesmo período de tempo.

7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- ❖ Estudar o efeito do Poliquilgerm[®] diretamente sobre o mosto de usinas sucroalcooleiras, com relação à viscosidade e a inibição de *L. mesenteroides*, bem como seu efeito sobre a viabilidade da levedura, nas seguintes condições:
 - Nas concentrações 0,2 e 1,0% de Poliquilgerm[®] e em concentrações inferiores do produto;
 - Em período de tempo inferior a 24 horas (sugestão: 6 horas)
- ❖ Avaliar o produto Poliquilgerm[®] através de ensaios de Ecotoxicidade, visando sua aplicação comercial em usinas sucroalcooleiras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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 Poliquilgerm[®] 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. pág. 142 ref. 11.28.

BERTOLETTI, A.C.D.; ANGELIS, D. F.; SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. Ação do Poliquilgerm[®] sobre a Microbiota da Fermentação Etanólica no Controle de Contaminantes. **In:** Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. Curitiba: SENAI – CIETEP, 2007a.CD-ROM.

BERTOLETTI, A.C.D.; ANGELIS, D. F.; SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. Uso de Poliquilgerm[®] no controle de *Lactobacillus fermentum*, contaminante da fermentação etanólica. **Holos Environmet.** 2007b. Vol. 7, n.1, supl.1.

BOLSON, J.; SCHOSSLER, 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 (*Ricinnus communis*).** Ciência Rural, Santa Maria, v35, n.5, pág.1123-1130, 2005.

CHIERICE, G. O.; CLARO-NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2001. cap. 5.

DIFCO Manual – **Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology**. 10th edition. Difco Laboratories, Detroit Michigan, 1984.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *et al.* **Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mosto de caldo-de-cana de fermentações alcoólicas industriais**. Separata de: Revista de Microbiologia. São Paulo, v.14, p.6-10, 1983.

FERREIRA, C. M. *et al.* **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**. Ribeirão Preto, 1996. 85p. Monografia (Residência em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, C. M.; ROSA, O. P. S.; TORRES, S. A.; FERREIRA, F. B. A.; BERNARDINELLI, N. **Activity of Endodontic Antibacterial Agents Against Selected Anaerobic Bacteria**. Brazilian Dental Journal, v. 13, n.2, pág. 118-122, 2002.

FREI, L. E.; ROTOLI, M. M.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; DALFRÉ, I. A. B.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S.; OLIVEIRA, V.J.A. Efeito bacteriostático do derivado (Poliquilgerm[®]) óleo de *Ricinus communis* (mamona) sob a *Escherichia coli* ATCC 25922 *in vitro*. In: Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais, 2., 2004, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 71, (supl.), p. 1-749, 2004. Disponível em:

<http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/V71_supl_cicam/index.htm>. Acesso em: 5 jun. 2006.

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.** Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.

KAJI, D. A. **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica.** 1989. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

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. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Vol. 27(12), 2001, pag. 717-719.

MAYEUX, J. V.; COLMER, A. R. **Selective medium for *Leuconostoc* detection.** Journal of Bacteriology – June (1961); 81(6): 1009–1011.

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 Poliquilgerm[®] 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 (Unicamp), 2005. 1 CD-ROM.

MESSETTI, M. A.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S.; DOMINGOS, R. N. Atividade do Poliquilgerm[®] sobre o crescimento e

viscosidade de *Leuconostoc mesenteroides* (B512F). **Holos Environmet.** 2007a. Vol. 7, n.1, supl.1.

MESSETTI, M. A.; ANGELIS, D. F.; SANTOS, A.M.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O. Verificação da atividade do Poliquilgerm[®] sobre Dextrana, Viscosidade e Crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* (B512F). **In:** Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. Curitiba: SENAI – CIETEP, 2007b.CD-ROM.

MILLER, G. H. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, :426-429, 1959.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. **Effect of 3,4,4' - Trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation.** Bioresource Technology 63: 17-21, 1998.

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, 32: 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. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PULZ, P. **Efeito de agentes químicos e físicos sobre a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* contaminada com *Lactobacillus fermentum*.** 2002. 62 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

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, pág.695-700, 2001.

RODINI, M. A. T. **Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol.** 1985. 92 f. 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.

SHARF, J. M. **Métodos recomendados para o Exame Microbiológico de Alimentos.** Ed. Polígono, São Paulo, 1972.

SILVA FILHO, E. A. **Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo e bactérias e leveduras contaminantes.** 1993. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.

SOUZA, A. M. G. F. **Caracterização e aplicabilidade da dextranase (E_C_3_2_1_11) produzida por *Penicillium herquei*.** 1994, 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

STUPIELLO, M. G. **Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente a bactérias Gram (+) isoladas da fermentação alcoólica.** 1993. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

TORTORA, G. F.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed. – Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

VIEIRA, E. D. **Seleção de linhagens produtoras de goma isoladas da cana-de-açúcar**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L. Y.; FERTIG, M.N. **The Merck index – an encyclopedia of chemicals and drugs**. 9ª ed. Ed. Merck & Co. Inc. Rahway, N.J. USA, 1976.

**9. ANEXO A – Análises estatísticas realizadas mediante o software
The SAS System 9.1**

9.1 - Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm [®] sobre dextrana.....	101
9.1.1 - Quantificação da viscosidade e glicose de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm [®] , nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.....	101
9.1.2 - Quantificação da viscosidade e glicose de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm [®] , nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.....	105
9.2 - Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> no mesmo meio acrescido de 2,0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm [®]	108
9.2.1 - Quantificação da absorbância das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> nas concentrações 0,0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm [®]	112
9.3 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm [®] , em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.....	114
9.3.1 - Verificação do crescimento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> por espectrofotometria, através de análise da biomassa.....	118
9.4 - Verificação da atividade do Poliquilgerm [®] sobre cultura mista (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), em meio CSN.....	121
9.4.1 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (<i>L. mesenteroides</i> + <i>S. cerevisiae</i>), acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm [®]	121
9.4.2 - Quantificação da viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> através de contagem de células em câmara de Neubauer.....	123
9.4.3 - Verificação do crescimento de <i>L. mesenteroides</i> através de plaqueamento pela técnica Pour Plate.....	127

9.1 Verificação da atividade hidrolítica do Poliquilgerm[®] sobre dextrana

9.1.1– Quantificação da viscosidade e de glicose de soluções de dextrana acrescidas de Poliquilgerm[®], nos intervalos 0; 24; 48 e 72 horas.

The SAS System
The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Condição	4	1 2 3 4
Concentração	3	0 1 2
Tempo	4	0 24 48 72

Number of Observations Read 144
Number of Observations Used 144
The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: **Viscosidade**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
condição	3	4.27296342	1.42432114	125.05	<.0001 *
concentração	2	0.27287866	0.13643933	11.98	<.0001 *
condição*concentração	6	0.13991431	0.02331905	2.05	0.0667
tempo	3	0.10165137	0.03388379	2.97	0.0355 *
condição*tempo	9	0.28668049	0.03185339	2.80	0.0059 *
concentração*tempo	6	0.16376347	0.02729391	2.40	0.0335 *
cond*conc*tempo	18	0.34027505	0.01890417	1.66	0.0606
Error	96	1.09343142	0.01138991		
Corrected Total	143	6.67155819			
R-Square	Coeff Var	Root MSE	visc Mean		
0.836106	7.144711	0.106724	1.493742		

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Viscosidade

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	96
Error Mean Square	0.01139
Critical Value of Studentized Range	3.69762
Minimum Significant Difference	0.0658

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Condição
A	1,7887	36	4
B	1,4364	36	3
BC	1,3843	36	1
C	1,3656	36	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Viscosidade

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	96
Error Mean Square	0.01139
Critical Value of Studentized Range	3.36671
Minimum Significant Difference	0.0519

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Concentração
A	1,5549	48	2
B	1,4691	48	1
B	1,4572	48	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Viscosidade

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	96
Error Mean Square	0.01139
Critical Value of Studentized Range	3.69762
Minimum Significant Difference	0.0658

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Tempo
A	1,5345	36	24
BA	1,4993	36	48
BA	1,4760	36	72
B	1,4652	36	0

The SAS System
The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
Condição	4	1 2 3 4
Concentração	3	0 1 2
Tempo	4	0 24 48 72

Number of Observations Read	144
Number of Observations Used	96

Dependent Variable: **Glicose**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Condição	3	0.00016904	0.00005635	0.49	0.6916
Concentração	2	0.00009025	0.00004512	0.39	0.6782
Condição*concentração	6	0.00310783	0.00051797	4.49	0.0011*
Tempo	3	0.00083843	0.00027948	2.43	0.0771
Condição*tempo	9	0.00090122	0.00010014	0.87	0.5588
Concentração*tempo	6	0.00021555	0.00003592	0.31	0.9278
cond*conc*tempo	18	0.00311489	0.00017305	1.50	0.1313

Error	48	0.00553191	0.00011525
Corrected Total	95	0.01396912	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	glicose Mean
0.603990	152.1398	0.010735	0.007056

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Glicose**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.000115
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	0.0082

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Condição
A	0.0084	24	1
A	0.0083	24	4
A	0.0059	24	2
A	0.0055	24	3

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Glicose**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.000115
Critical Value of Studentized Range	3.42026
Minimum Significant Difference	0.0065

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Concentração
A	0.0080	32	0
A	0.0074	32	1
A	0.0057	32	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Glicose**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.000115
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	0.0082

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	Tempo
A	0.0122	24	0
A	0.0056	24	24
A	0.0054	24	72
A	0.0050	24	48

9.1.2 - Quantificação da viscosidade e glicose de soluções de dextrana acrescidas de Poli quilgerm[®], nos intervalos 0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 dias.

The SAS System
The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
Concentração	3	0 1 2
Tempo	8	0 5 10 15 20 25 30 40

Data for Analysis of **Viscosidade**

Number of Observations Read	72
Number of Observations Used	63

Data for Analysis of **Glicose**

Number of Observations Read	72
Number of Observations Used	72

NOTE: Variables in each group are consistent with respect to the presence or absence of missing values.

Dependent Variable: **Viscosidade**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	20	0.66046058	0.03302303	4.05	<.0001
Error	42	0.34272607	0.00816014		
Corrected Total	62	1.00318665			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Visc Mean		
0.658363	6.354171	0.090334	1.421641		
Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	0.39285501	0.19642750	24.07	<.0001
tempo	6	0.13756443	0.02292741	2.81	0.0217
Conc*tempo	12	0.13004114	0.01083676	1.33	0.2395

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-------------	-------------	---------	--------

Conc	2	0.39285501	0.19642750	24.07	<.0001
tempo	6	0.13756443	0.02292741	2.81	0.0217
Conc*tempo	12	0.13004114	0.01083676	1.33	0.2395

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Viscosidade**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	42
Error Mean Square	0.00816
Critical Value of Studentized Range	3.43582
Minimum Significant Difference	0.0677

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Concentração
A	1.53320	21	2
B	1.37020	21	1
B	1.36151	21	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Viscosidade**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	42
Error Mean Square	0.00816
Critical Value of Studentized Range	4.37777
Minimum Significant Difference	0.1318

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Tempo
A	1.49121	9	25
B A	1.45729	9	5
B A	1.45436	9	30
B A	1.41107	9	10
B A	1.40470	9	0
B A	1.39480	9	20
B	1.33807	9	15

Dependent Variable: **Glicose**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	0.05635519	0.00245023	31.79	<.0001
Error	48	0.00369966	0.00007708		
Corrected Total	71	0.06005485			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Glico Mean
0.938395	7.011138	0.008779	0.125219

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.00020350	0.00010175	1.32	0.2766
tempo	7	0.04995012	0.00713573	92.58	<.0001
Conc*tempo	14	0.00620157	0.00044297	5.75	<.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.00020350	0.00010175	1.32	0.2766
tempo	7	0.04995012	0.00713573	92.58	<.0001
Conc*tempo	14	0.00620157	0.00044297	5.75	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Glicose**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.000077
Critical Value of Studentized Range	3.42026
Minimum Significant Difference	0.0061

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Concentração
A	0.126642	24	0
A	0.126158	24	1
A	0.122858	24	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for **Glicose**

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.000077
Critical Value of Studentized Range	4.48064
Minimum Significant Difference	0.0131

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	Tempo
A	0.186633	9	40
B	0.136633	9	30
C B	0.128878	9	25
C D	0.121333	9	20
C D	0.118156	9	15
D	0.112967	9	10
E	0.098578	9	0
E	0.098578	9	5

9.2 - Quantificação comparativa da viscosidade de meio de cultura Mayeux e Colmer e das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* no mesmo meio acrescido de 2,0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®.

Class Level Information

Class	Levels	Values
Concentração	3	0 1 2
Inóculo	2	0 1

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.17830630	0.03566126	4.60	0.0078
Error	17	0.13179937	0.00775290		
Corrected Total	22	0.31010567			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	visc Mean
0.574986	7.006952	0.088051	1.256617

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	0.17085225	0.08542612	11.02	.0009*
Inóculo	1	0.00032749	0.00032749	0.04	0.8396
Concentração*inóculo	2	0.00712657	0.00356328	0.46	0.6392

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	0.14609469	0.07304734	9.42	0.0018*
Inóculo	1	0.00062438	0.00062438	0.08	0.7800
Concentração*inóculo	2	0.00712657	0.00356328	0.46	0.6392

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for conc

Concentração de Poliquilgerm

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.007753
Critical Value of Studentized Range	3.62796

Tukey	Média	Concentração de Poliquilgerm (%)
A	1,4016	0,0
B	1,2614	2,0
B	1,1713	1,0

Concentração Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits		
1 - 2	0.14019	0.01420	0.26618	***
1 - 3	0.23032	0.10433	0.35631	***
2 - 1	-0.14019	-0.26618	-0.01420	***
2 - 3	0.09013	-0.01635	0.19661	
3 - 1	-0.23032	-0.35631	-0.10433	***
3 - 2	-0.09013	-0.19661	0.01635	

Inóculo

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	17
Error Mean Square	0.007753
Critical Value of Studentized Range	2.98373
Minimum Significant Difference	0.0813
Harmonic Mean of Cell Sizes	10.43478

Tukey	Mean	N	Inóculo
A	1.2575	8	0
A	1.2561	15	1

Class Level Information

Class	Levels	Values
Concentração	3	0 1 2
Inóculo	2	0 1

Sum of Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.41838374	0.08367675	13.75	0.0002
Error	11	0.06691979	0.00608362		
Corrected Total	16	0.48530353			

Tukey	Média	Inóculo
A	1,58562	1
B	1,45533	0

Class Level Information

Class	Levels	Values
Concentração	3	0 1 2
Inóculo	2	0 1

Source	DF	Squares	Sum of Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.24548137	0.04909627	1.60	0.2469
Error	10	0.30738442	0.03073844		
Corrected Total	15	0.55286579			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	visc Mean
0.444016	11.11104	0.175324	1.577925

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	0.10734549	0.05367275	1.75	0.2237
Inóculo	1	0.00660969	0.00660969	0.22	0.6528
Concentração*inóculo	2	0.13152619	0.06576309	2.14	0.1685

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	0.10734549	0.05367275	1.75	0.2237
Inóculo	1	0.01952610	0.01952610	0.64	0.4440
Concentração*inóculo	2	0.13152619	0.06576309	2.14	0.1685

Concentração de Poliquilgerm

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	0.030738
Critical Value of Studentized Range	3.87676

Tukey	Média	Concentração (%)
A	1,6678	0,2
A	1,5908	0,0
A	1,4795	1,0

Concentração Comparison	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
4 - 1	0.0771	-0.2332 0.3873
4 - 3	0.1884	-0.0891 0.4659
1 - 4	-0.0771	-0.3873 0.2332
1 - 3	0.1113	-0.1989 0.4216
3 - 4	-0.1884	-0.4659 0.0891
3 - 1	-0.1113	-0.4216 0.1989

Inóculo

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	0.030738
Critical Value of Studentized Range	3.15106
Minimum Significant Difference	0.1953

Tukey	Média	Inóculo
A	1,5982	1
A	1,5576	0

9.2.1 - Quantificação da absorbância das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* nas concentrações 0; 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®.

Class Level Information

Class	Levels	Values
Concentração	3	0 1 2
Inóculo	2	0 1
Tempo	4	0; 6; 20 e 26 horas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	6.09243789	0.32065463	1082.52	<.0001
Error	37	0.01095983	0.00029621		
Corrected Total	56	6.10339772			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	abs Mean
0.998204	5.285930	0.017211	0.325596

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Concentração	2	1.40419954	0.70209977	2370.26	<.0001*
Inóculo	1	2.48748602	2.48748602	8397.66	<.0001*

Concentração*inóculo	1	0.33450102	0.33450102	1129.26	<.0001*
Tempo	3	0.82725165	0.27575055	930.92	<.0001*
Concentração*tempo	6	0.79332986	0.13222164	446.38	<.0001*
Inóculo*tempo	3	0.22352023	0.07450674	251.53	<.0001*
conc*inoc*tempo	3	0.02214956	0.00738319	24.93	<.0001*

Análise de Tukey:

Concentração de Poliquilgerm

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	37
Error Mean Square	0.000296
Critical Value of Studentized Range	3.45278

Tukey	Média	Concentração
A	0,5798	0,0
B	0,3999	1,0
C	0,1560	0,2

Concentração Comparison	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
0 - 1	0.179903	0.163479 0.196327 ***
0 - 2	0.423778	0.407354 0.440202 ***
1 - 0	-0.179903	-0.196327 -0.163479 ***
1 - 2	0.243875	0.231745 0.256005 ***
2 - 0	-0.423778	-0.440202 -0.407354 ***
2 - 1	-0.243875	-0.256005 -0.231745 ***

Inóculo

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	37
Error Mean Square	0.000296
Critical Value of Studentized Range	2.86550
Minimum Significant Difference	0.0094
Harmonic Mean of Cell Sizes	27.78947

Tukey	Média	N	Inóculo
A	0.5258	33	1
B	0.0503	24	0

Tempo

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	37
Error Mean Square	0.000296

Critical Value of Studentized Range 3.80389

Tukey	Média	Tempo
A	0,4658	26
B	0,4033	20
C	0,2687	6
D	0,1753	0

tempo	Difference Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits
26 - 20	0.062500	0.045003 0.079997 ***
26 - 6	0.197071	0.179574 0.214568 ***
26 - 0	0.290452	0.273249 0.307655 ***
20 - 26	-0.062500	-0.079997 -0.045003 ***
20 - 6	0.134571	0.117074 0.152068 ***
20 - 0	0.227952	0.210749 0.245155 ***
6 - 26	-0.197071	-0.214568 -0.179574 ***
6 - 20	-0.134571	-0.152068 -0.117074 ***
6 - 0	0.093381	0.076178 0.110584 ***
0 - 26	-0.290452	-0.307655 -0.273249 ***
0 - 20	-0.227952	-0.245155 -0.210749 ***
0 - 6	-0.093381	-0.110584 -0.076178 ***

9.3 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas de *Leuconostoc mesenteroides* crescidas de 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®, em diferentes pHs e temperaturas, em meio CSN.

The SAS System
The GLM Procedure

Concentração POL	Legenda
0,0%	1
1,0%	2
0,2%	3

Class Level Information		
Class	Levels	Values
pH	4	3,0; 4,0; 5,0 e 6,0
Conc. Poliquil	3	1, 2, 3
inoculo	2	0, 1
Number of Observations Read		72
Number of Observations Used		72

Dependent Variable: **Viscosidade 33°C**

	Sum of				
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	0.31345756	0.01362859	8.81	<.0001
Error	48	0.07423119	0.00154648		
Corrected Total	71	0.38768874			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Visc33 Mean
0.808529	2.859953	0.039325	1.375035

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	0.13765515	0.04588505	29.67	<.0001*
Concpol	2	0.01248679	0.00624339	4.04	0.0240*
pH*Concpol	6	0.04405972	0.00734329	4.75	0.0007*
inoculo	1	0.07963375	0.07963375	51.49	<.0001*
pH*inoculo	3	0.00200252	0.00066751	0.43	0.7313
Concpol*inoculo	2	0.01530684	0.00765342	4.95	0.0111*
pH*Concpol*inoculo	6	0.02231279	0.00371880	2.40	0.0411*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	0.13765515	0.04588505	29.67	<.0001
Concpol	2	0.01248679	0.00624339	4.04	0.0240
pH*Concpol	6	0.04405972	0.00734329	4.75	0.0007
inoculo	1	0.07963375	0.07963375	51.49	<.0001
pH*inoculo	3	0.00200252	0.00066751	0.43	0.7313
Concpol*inoculo	2	0.01530684	0.00765342	4.95	0.0111
pH*Concpol*inoculo	6	0.02231279	0.00371880	2.40	0.0411

Dependent Variable: **Viscosidade 28°C**

	Sum of				
Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	23	0.59000411	0.02565235	14.23	<.0001
Error	48	0.08653239	0.00180276		
Corrected Total	71	0.67653650			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Visc28 Mean
0.872095	3.085629	0.042459	1.376021

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	0.22471777	0.07490592	41.55	<.0001*
Concpol	2	0.01817593	0.00908797	5.04	0.0103*
pH*Concpol	6	0.07857548	0.01309591	7.26	<.0001*
inoculo	1	0.08426197	0.08426197	46.74	<.0001*
pH*inoculo	3	0.00213794	0.00071265	0.40	0.7569
Concpol*inoculo	2	0.05571231	0.02785616	15.45	<.0001*
pH*Concpol*inoculo	6	0.12642271	0.02107045	11.69	<.0001*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	0.22471777	0.07490592	41.55	<.0001
Concpol	2	0.01817593	0.00908797	5.04	0.0103
pH*Concpol	6	0.07857548	0.01309591	7.26	<.0001
inoculo	1	0.08426197	0.08426197	46.74	<.0001
pH*inoculo	3	0.00213794	0.00071265	0.40	0.7569
Concpol*inoculo	2	0.05571231	0.02785616	15.45	<.0001
pH*Concpol*inoculo	6	0.12642271	0.02107045	11.69	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Viscosidade 33°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001546
Critical Value of Studentized Range	2.84352
Minimum Significant Difference	0.0186

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Inóculo
A	1.408292	36	1
B	1.341778	36	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Viscosidade 28°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001803
Critical Value of Studentized Range	2.84352
Minimum Significant Difference	0.0201

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Inóculo
A	1.41023	36	1
B	1.34181	36	0

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc33

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001546
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	0.0349

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	pHs
A	1.42054	18	3
A	1.41207	18	4
B	1.35374	18	6
C	1.31378	18	5

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc28

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001803
Critical Value of Studentized Range	3.76375
Minimum Significant Difference	0.0377

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	pHs
A	1.43220	18	4
B A	1.40552	18	6
B	1.38211	18	5
C	1.28426	18	3

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc33

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001546
Critical Value of Studentized Range	3.42026
Minimum Significant Difference	0.0275

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Conc. POL
A	1.39145	24	1 (0%)
B A	1.37445	24	3 (0,2%)
B	1.35921	24	2 (1,0%)

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc28

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	48
Error Mean Square	0.001803
Critical Value of Studentized Range	3.42026
Minimum Significant Difference	0.0296

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Conc. POL
A	1.39037	24	1 (0%)
A	1.38383	24	2 (1,0%)
B	1.35387	24	3 (0,2)

9.3.1 - Verificação do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* por espectrofotometria, através de análise da biomassa.

Class Level Information

Class	Levels	Values
pH	4	3,0; 4,0; 5,0; 6,0
Conc. POL	3	1, 2, 3

Concentração POL	Legenda
0,0%	1
1,0%	2
0,2%	3

Data for Analysis of UFC/mL33

Number of Observations Read	36
Number of Observations Used	34

Data for Analysis of UFC28

Number of Observations Read	36
Number of Observations Used	36

NOTE: Variables in each group are consistent with respect to the presence or absence of missing values.

Dependent Variable: UFC/mL 33°C

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	510.8332951	46.4393905	288.61	<.0001
Error	22	3.5399167	0.1609053		
Corrected Total	33	514.3732118			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC33 Mean
0.993118	19.45012	0.401130	2.062353

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	99.4866798	33.1622266	206.10	<.0001*
Conc. POL	2	184.4565733	92.2282867	573.18	<.0001*
pH*Conc.POL	6	226.8900420	37.8150070	235.01	<.0001*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	97.0602518	32.3534173	201.07	<.0001
Concpol	2	179.2982232	89.6491116	557.15	<.0001
pH*Concpol	6	226.8900420	37.8150070	235.01	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC/mL 33°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	0.160905
Critical Value of Studentized Range	3.92704

Comparisons significant at the **0.05 level** are indicated by *******.

	Difference		
pH	Between	Simultaneous 95%	
Comparison	Means	Confidence Limits	
6 - 5	1.8689	1.3276 2.4101	***
6 - 3	3.9401	3.3989 4.4814	***
6 - 4	4.1167	3.5916 4.6418	***
5 - 6	-1.8689	-2.4101 -1.3276	***
5 - 3	2.0713	1.5143 2.6282	***
5 - 4	2.2478	1.7065 2.7890	***
3 - 6	-3.9401	-4.4814 -3.3989	***
3 - 5	-2.0713	-2.6282 -1.5143	***
3 - 4	0.1765	-0.3647 0.7178	
4 - 6	-4.1167	-4.6418 -3.5916	***
4 - 5	-2.2478	-2.7890 -1.7065	***
4 - 3	-0.1765	-0.7178 0.3647	

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC/mL 33°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	0.160905
Critical Value of Studentized Range	3.55259

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by ***.

ConcPOL Comparison	Difference		
	Between Means	Simultaneous 95% Confidence Limits	
1 - 2	4.7108	4.2995	5.1222 ***
1 - 3	4.9555	4.5240	5.3870 ***
2 - 1	-4.7108	-5.1222	-4.2995 ***
2 - 3	0.2447	-0.1868	0.6761
3 - 1	-4.9555	-5.3870	-4.5240 ***
3 - 2	-0.2447	-0.6761	0.1868

Dependent Variable: UFC/mL 28°C

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	265.3289417	24.1208129	1772.86	<.0001
Error	24	0.3265333	0.0136056		
Corrected Total	35	265.6554750			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC28 Mean
0.998771	4.593746	0.116643	2.539167

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	165.7839861	55.2613287	4061.67	<.0001*
Concpol	2	27.2400167	13.6200083	1001.06	<.0001*
pH*Concpol	6	72.3049389	12.0508231	885.73	<.0001*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
pH	3	165.7839861	55.2613287	4061.67	<.0001
Concpol	2	27.2400167	13.6200083	1001.06	<.0001
pH*Concpol	6	72.3049389	12.0508231	885.73	<.0001

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC/mL 28°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.013606
Critical Value of Studentized Range	3.90126
Minimum Significant Difference	0.1517

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	pH
A	6.09222	9	5
B	2.24444	9	6
C	1.35778	9	3
D	0.46222	9	4

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC/mL 28°C

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha 0.05

Error Degrees of Freedom 24

Error Mean Square 0.013606

Critical Value of Studentized Range 3.53170

Minimum Significant Difference 0.1189

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Conc. POL
A	3.74333	12	1 (0%)
B	2.15500	12	2 (1,0%)
C	1.71917	12	3 (0,2%)

9.4 - Verificação da atividade do Poliquilgerm® sobre cultura mista (*Leuconostoc mesenteroides* + *Saccharomyces cerevisiae*), em meio CSN.

9.4.1 - Quantificação comparativa da viscosidade das culturas mistas (*L. mesenteroides* + *S. cerevisiae*), acrescidas de 1,0 e 0,2% de Poliquilgerm®.

The SAS System
The GLM Procedure

Class	Levels	Values
Conc	3	1, 2, 3

Concentração POL	Legenda
0,0%	1
1,0%	2
0,2%	3

Number of Observations Read	9
Number of Observations Used	9
The SAS System	2

Dependent Variable: Viscosidade Cannon-Fenske

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00350483	0.00175241	1.16	0.3758
Error	6	0.00908561	0.00151427		
Corrected Total	8	0.01259044			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ViscC Mean
0.278372	3.110295	0.038914	1.251122

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.00350483	0.00175241	1.16	0.3758

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.00350483	0.00175241	1.16	0.3758

Dependent Variable: Viscosidade Brookfield

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.01575556	0.00787778	0.32	0.7400
Error	6	0.14920000	0.02486667		
Corrected Total	8	0.16495556			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ViscB Mean
0.095514	11.20146	0.157692	1.407778

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.01575556	0.00787778	0.32	0.7400

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Conc	2	0.01575556	0.00787778	0.32	0.7400

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc Cannon

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.001514
Critical Value of Studentized Range	4.33902
Minimum Significant Difference	0.0975

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Conc POL
A	1.26777	3	2
A	1.26220	3	3
A	1.22340	3	1

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for Visc. Brookfield

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	6
Error Mean Square	0.024867
Critical Value of Studentized Range	4.33902
Minimum Significant Difference	0.395

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	ConcPOL
A	1.4667	3	1
A	1.3833	3	3
A	1.3733	3	2

9.4.2 - Quantificação da viabilidade de *S. cerevisiae* através de contagem de células em câmara de Neubauer.

The SAS System
The GLM Procedure

Class	Levels	Values
Trat POL	3	1, 2, 3
Tempo	2	1(0) - 2 (24h)

Concentração POL	Legenda
0,0%	1
1,0%	2
0,2%	3

Data for Analysis of Viab Brot Viabbrot

Number of Observations Read	18
Number of Observations Used	18

Data for Analysis of UFC

Number of Observations Read	18
Number of Observations Used	15

NOTE: Variables in each group are consistent with respect to the presence or absence of missing values.

Dependent Variable: %Viabilidade

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	6007.548361	1201.509672	17.92	<.0001
Error	12	804.758467	67.063206		
Corrected Total	17	6812.306828			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Viab Mean
0.881867	9.478682	8.189213	86.39611

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TratPOL	2	1580.337878	790.168939	11.78	0.0015*
Tempo	1	2917.206806	2917.206806	43.50	<.0001*
Trat*Tempo	2	1510.003678	755.001839	11.26	0.0018*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trat	2	1580.337878	790.168939	11.78	0.0015
Tempo	1	2917.206806	2917.206806	43.50	<.0001
Trat*Tempo	2	1510.003678	755.001839	11.26	0.0018

Dependent Variable: %Brotamento

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	907.814561	181.562912	15.71	<.0001
Error	12	138.689533	11.557461		
Corrected Total	17	1046.504094			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Brot Mean
0.867473	34.86598	3.399627	9.750556

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TratPOL	2	59.1198111	29.5599056	2.56	0.1188
Tempo	1	753.8844500	753.8844500	65.23	<.0001*
Trat*Tempo	2	94.8103000	47.4051500	4.10	0.0439*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trat	2	59.1198111	29.5599056	2.56	0.1188
Tempo	1	753.8844500	753.8844500	65.23	<.0001
Trat*Tempo	2	94.8103000	47.4051500	4.10	0.0439

Dependent Variable: % Viabilidade dos brotos

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	6534.111578	1306.822316	11.28	0.0003
Error	12	1390.312733	115.859394		
Corrected Total	17	7924.424311			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Viabbrot Mean
0.824553	12.85656	10.76380	83.72222

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trat POL	2	2532.185644	1266.092822	10.93	0.0020*
Tempo	1	2668.881800	2668.881800	23.04	0.0004*
Trat*Tempo	2	1333.044133	666.522067	5.75	0.0177*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trat	2	2532.185644	1266.092822	10.93	0.0020
Tempo	1	2668.881800	2668.881800	23.04	0.0004
Trat*Tempo	2	1333.044133	666.522067	5.75	0.0177

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Viabilidade

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	67.06321
Critical Value of Studentized Range	3.77278
Minimum Significant Difference	12.613

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Trat POL
A	99.122	6	1
B	83.233	6	3
B	76.833	6	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Brotamento

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	11.55746
Critical Value of Studentized Range	3.77278
Minimum Significant Difference	5.2362

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Trat POL
A	12.255	6	1
A	8.970	6	2
A	8.027	6	3

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Viabilidade dos brotos

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	115.8594
Critical Value of Studentized Range	3.77278
Minimum Significant Difference	16.579

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	TratPOL
A	99.493	6	1
B	80.783	6	3
B	70.890	6	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Viabilidade

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	67.06321
Critical Value of Studentized Range	3.08132
Minimum Significant Difference	8.4112

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Tempo
A	99.127	9	2
B	73.666	9	1

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Brotamento

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	11.55746
Critical Value of Studentized Range	3.08132
Minimum Significant Difference	3.4918

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Tempo
A	16.222	9	1
B	3.279	9	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for % Viab. dos brotos

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	115.8594
Critical Value of Studentized Range	3.08132
Minimum Significant Difference	11.056

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Tempo
A	95.899	9	2
B	71.546	9	1

9.4.3 - Verificação do crescimento de *L. mesenteroides* através de plaqueamento pela técnica Pour Plate.

The SAS System
The GLM Procedure

Dependent Variable: UFC/mL Leuconostoc

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	1067.929833	213.585967	8.01	0.0039
Error	9	240.010900	26.667878		
Corrected Total	14	1307.940733			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	UFC Mean
0.816497	98.61416	5.164095	5.236667

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TratPOL	2	494.3118933	247.1559467	9.27	0.0065*
Tempo	1	222.1551111	222.1551111	8.33	0.0180*
Trat*Tempo	2	351.4628289	175.7314144	6.59	0.0173*

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trat	2	651.5442689	325.7721344	12.22	0.0027
Tempo	1	222.1551111	222.1551111	8.33	0.0180
Trat*Tempo	2	351.4628289	175.7314144	6.59	0.0173

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	26.66788
Critical Value of Studentized Range	3.94850

Minimum Significant Difference 9.1189

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	TratPOL
A	13.346	5	1
B	1.514	5	3
B	0.850	5	2

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for UFC

NOTE: This test controls the Type I experiment wise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	9
Error Mean Square	26.66788
Critical Value of Studentized Range	3.19906
Minimum Significant Difference	6.1567
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.2

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

	Mean	N	Tempo
A	9.950	6	2
B	2.094	9	1