

AÇÃO ANTIBACTERIANA DO LICOR PIROLENHOSO SOBRE COLIFORMES

ANTIBACTERIAL ACTION OF PYROLIGNOUS ACID ON COLIFORMS

Lisandra Chiamenti¹

Leila Xavier Sinigaglia Fratta²

Simone Ulrich Picoli³

Olyr Celestino Kreutz⁴

Fernando Dal Pont Morisso⁵

Angela Beatrice Dewes Moura⁶

RESUMO

O licor pirolenhoso é um subproduto líquido obtido através do processo de produção do carvão vegetal, sendo útil desde a agricultura, usado como antifúngico, no controle de pragas, como adubo orgânico entre outros. Desta forma, o estudo buscou avaliar a ação antibacteriana frente a bactérias provenientes da suinocultura, atividade altamente poluente. Padronizou-se a técnica de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do licor pirolenhoso, determinou-se a CIM frente a cepas bacterianas isoladas de fezes suínas e avaliou-se a curva de crescimento das bactérias após aplicação deste licor. Para tanto, realizou-se estudo experimental, onde a técnica de CIM foi padronizada por macrodiluição em caldo. Após, foram isoladas e identificadas bactérias coliformes a partir de fezes de suínos, sendo estas testadas através da técnica de CIM padronizada. Aplicou-se a CIM previamente determinada sobre 1 kg de fezes e realizaram-se amostragens em 24 horas. Como resultados, a CIM frente às bactérias isoladas foi equivalente a 3.125% de licor pirolenhoso e esta concentração reduziu o número de coliformes nas fezes suínas. Especula-se o futuro emprego do licor como adjuvante no controle da carga bacteriana em fezes de suínos de forma eficaz e não agressiva ao meio ambiente.

Palavras-chave: Suinocultura. *Escherichia coli*. Coliformes. Concentração Inibitória Mínima.

ABSTRACT

The pyrolignous is a liquid obtained from the charcoal production process and is useful from agriculture, used as antifungal in pest control, as organic fertilizer among others. Thus, the study sought to evaluate the antibacterial activity against bacteria from swine culture, highly polluting activity. Against

¹ Unipacs. E-mail: lisandrachiamenti@gmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: lfratta@gmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: simonepi@feevale.br

⁴ Universidade Estadual de Campinas. E-mail: ockreutz@feevale.br

⁵ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: morisso@feevale.br

⁶ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: angelab@feevale.br

bacterial strains isolated from swine feces was standardized technique for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of pyrolignous acid and evaluated the growth curve of bacteria after application of acid in swine feces. An experimental study was conducted, where the MIC technique was standardized by macrodilution according to the recommendations of the CLSI (2003). After, we isolated and identified coliform bacteria from feces of pigs, which were tested using the technique of MIC standard. Was applied previously determined MIC in 1 kg of feces followed by collections. The MIC opposite the isolated bacteria was equivalent to 3.125 % of pyrolignous, demonstrating antimicrobial action against coliforms. Is speculated future employment of pyrolignous as an adjuvant to control bacterial load in feces of pigs efficiently and does not harm the environment.

Keywords: Swine culture. *Escherichia coli*. Coliforms. Minimum Inhibitory Concentration.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação cada vez maior pela conservação do meio ambiente vem se destacando e mobilizando pequenos e grandes proprietários rurais. O Brasil vem ganhando destaque no setor rural (CAPOANE, 2008), o que, somado ao crescimento da população e economia, se torna um fator negativo ao meio ambiente, pois diversas alterações ambientais constatadas decorrem das atividades predatórias do homem (BENETTI et al., 2011). Desta forma, é de suma importância a busca por melhorias para que as consequências deste crescimento não acarretem em maiores problemas futuros para o homem e o meio ambiente (CAPOANE, 2008).

No Brasil, a suinocultura é uma atividade presente, predominantemente, em pequenas propriedades rurais, tendo passado, nas últimas décadas, por crescimento do setor (ROESLER & CESCONE, 2003) e por significativas alterações tecnológicas com objetivo de aumentar a produtividade (BENETTI et al., 2011). Contudo, um dos maiores problemas deste segmento é a grande quantidade de dejetos produzidos diariamente numa área reduzida (MERTEN & MINELLA, 2002). Com o confinamento total, superlotação das pocilgas, ambiente mal higienizado, excesso de umidade, entre outros fatores (RISTOW, 2009), a maioria dos animais infectados por *Escherichia coli* elimina o agente patológico por meio da urina, fezes e outros meios.

Dessa forma, a suinocultura é considerada atividade de grande potencial poluidor, uma vez que os dejetos animais não tratados podem alcançar os mananciais de água, acarretando diversas doenças para os animais e o homem. Ainda, há a contaminação do solo, diminuição da qualidade de vida de proprietários e trabalhadores rurais e menor sustentabilidade para atuais e futuras gerações (ROESLER & CESCONE, 2003). Nesse contexto, o principal contaminante é o grupo dos coliformes no qual a enterobactéria *Escherichia coli* constitui o principal representante.

Ações para a redução do poder poluente dos dejetos a níveis aceitáveis requerem investimentos significativos, normalmente acima da capacidade de pagamento dos produtores, muitas vezes, sem garantias de atendimento das exigências da legislação ambiental (PERDOMO et al., 2001).

Em vista disso, uma alternativa factível para melhorias na suinocultura é o uso do licor pirolenhoso, líquido obtido através da condensação da fumaça na produção do carvão vegetal (ZANETTI et al., 2004). Este, atrai cada vez mais a atenção de pesquisadores de diferentes áreas, por ser um produto útil desde

a agricultura, como antifúngico (COSTA et al., 2003; BORTOLETTO et al., 2009), controle de pragas (MAEKAWA, 2002; MIYAKA, 2001), adubo orgânico (MASCARENHAS et al., 2006) até o setor público (CAMPOS, 2007; ENCARNAÇÃO, 2001). Há relato, sem descrição de embasamento teórico e metodologia, de que o uso do licor pirolenhoso nas esterqueiras elimina o mau cheiro e as larvas de moscas e varejeiras, reduz praticamente todos os coliformes fecais e totais que transmitem doenças e, ainda, resulta num fertilizante orgânico de excelente qualidade com pH ideal para o solo (ENCARNAÇÃO, 2001).

Existem mais de 100 compostos químicos presentes no licor pirolenhoso: o ácido acético, metanol e a acetona são alguns dos produtos valiosos que o compõem (STOLZ, 2010), além de ácido fórmico, éter, alcoóis, acetaldeídos, entre outros (MARTINS, 2009). Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos animais e vegetais e já está estabelecido que estes possuem fortes propriedades antimicrobianas, sendo que seus efeitos podem ser explicados por diversos mecanismos, incluindo redução do pH e propriedades bacteriostáticas (BELLAVIER & SCHEUERMANN, 2004).

Mesmo sendo um produto de origem natural, o controle de qualidade para obtenção do licor pirolenhoso deve ser rigoroso, pois a presença de componentes tóxicos, como o alcatrão, inviabiliza o seu uso (CAMPOS, 2007). A cor característica do licor pirolenhoso sem o alcatrão varia desde o amarelo transparente até o vermelho (MARTINS, 2009). Paralelamente, deve ser considerado o tipo de madeira empregado na obtenção do licor, bem como o período de repouso pós-coleta, fundamental para a separação do alcatrão (MARTINS, 2009; CAMPOS, 2007).

Dessa forma, os objetivos deste estudo foram padronizar a técnica para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de licor pirolenhoso capaz de inibir o crescimento do coliforme fecal *Escherichia coli*, determinar a CIM de licor pirolenhoso sobre as bactérias isoladas de fezes suínas e acompanhar a viabilidade dos coliformes após a aplicação do licor sobre fezes suínas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato pirolenhoso utilizado em todas as etapas do presente estudo foi obtido junto a um produtor de carvão vegetal do município de Presidente Lucena (RS). A matéria prima para a obtenção deste extrato foi a Acácia Negra (*Acacia mearnsii* De Wild).

Durante o primeiro mês do estudo foi padronizada a técnica de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de licor pirolenhoso. Considerando-se que em fezes (tanto animal quanto humana) o microrganismo mais prevalente é *Escherichia coli*, padronizou-se a técnica a ser empregada no estudo com a cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922.

2.1 DETERMINAÇÃO DA CIM FRENTE À *E. coli* ATCC 25922

A técnica para determinação da CIM foi realizada através de macrodiluição em caldo Mueller-Hinton (MH) de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Empregou-se inóculo bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 equivalente a 5×10^5 UFC/mL e controles

de esterilidade (CE) e de inóculo (CI). As concentrações de licor pirolenhoso testadas foram 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 e 50% (Figura 1). Para fins de padronização da técnica, o procedimento foi repetido 20 vezes consecutivamente, tolerando-se apenas um desvio (uma concentração diferente).

2.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DAS FEZES SUÍNAS

Utilizaram-se duas amostras de fezes suínas frescas oriundas de uma propriedade localizada no município de Poço das Antas (RS), cuja coleta foi realizada em um dia aleatório no mês de outubro de 2010. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e transportadas ao Laboratório de Biomedicina da Universidade Feevale sob refrigeração em uma caixa isotérmica. Foi realizada a semeadura das fezes em meios seletivos e diferenciais para bactérias Gram negativas (Agar McConkey e Agar *Shigella-Salmonella*) por técnica de esgotamento. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após, realizou-se avaliação macroscópica das colônias e foram utilizados testes bioquímicos compatíveis (Triple Sugar Iron Agar, Simmons Citrate agar, Agar fenilalanina, Meio SIM, Meio MIO, Lisine Iron Agar, Agar ureia, teste de oxidase) para identificação das bactérias cujas colônias se apresentavam fenotipicamente diferentes nos respectivos meios.

2.3 DETERMINAÇÃO DA CIM FRENTE ÀS BACTÉRIAS ISOLADAS DAS FEZES SUÍNAS

No terceiro mês do estudo, realizou-se a determinação da CIM de licor pirolenhoso frente às enterobactérias isoladas das fezes suínas. Foi utilizada a macrodiluição em caldo Mueller-Hinton (MH) de acordo com as recomendações do CLSI (2003).

2.4 APLICAÇÃO DA CIM DE LICOR PIROLENHOSO EM FEZES FRESCAS

Uma vez que a ação do licor pirolenhoso sobre bactérias das fezes foi determinada em condições laboratoriais, aplicou-se o licor pirolenhoso na concentração inibitória previamente determinada sobre fezes frescas de suínos. Foi adicionado o equivalente a 3% de licor pirolenhoso em 1 kg de fezes suínas frescas, colhidas em recipiente estéril, oriundas de uma propriedade em Poço das Antas (RS). O licor pirolenhoso e as fezes foram homogeneizados e o recipiente aberto foi colocado em temperatura ambiente em aposento com teto de concreto e com uma parede com grade metálica (não exposto às intempéries). Foram efetuadas coletas das fezes em recipientes estéreis nos tempos 0, 4, 8, 11 e 24 horas após a aplicação do licor, além de uma amostra sem o licor (tempo zero foi equivalente ao controle negativo). Estas foram submetidas a diluições seriadas e técnica de plaqueamento em superfície (Spread Plate) em Agar McConkey para contagem de *E. coli*. A contagem de bactérias foi expressa em Unidades Formadoras de Colônias por grama de amostra (UFC/g). O teste foi realizado no inverno, com temperatura média de $13,4^{\circ}\text{C}$.

3 RESULTADOS

Padronização da CIM: a concentração inibitória mínima do licor pirolenhoso frente a *E. coli* ATCC 25922 foi de 3.125%, em 19 das 20 repetições do teste.

Isolamento de bactérias das fezes suínas: Foram encontradas *Escherichia coli* e *Proteus sp.* Todas as colônias morfológicamente diferentes observadas nos meios de isolamento (Agar McConkey e Agar *Shigella-Salmonella*) foram fenotipicamente identificadas e resultaram em 19 (90.5%) isolados de *E. coli* e 2 (9.5%) de *Proteus sp.*

CIM de licor pirolenhoso frente a *E. coli* e *Proteus sp.*: Verificou-se que todos os 21 isolados bacterianos foram inibidos na concentração equivalente a 3.125%, tanto com o extrato bruto de licor pirolenhoso, quanto com o respectivo licor purificado.

Aplicação de 3% licor pirolenhoso em fezes suínas: O comportamento de *E. coli* após a aplicação de 3% de licor pirolenhoso sobre 1 kg de fezes suínas frescas pode ser observado no Gráfico 1.

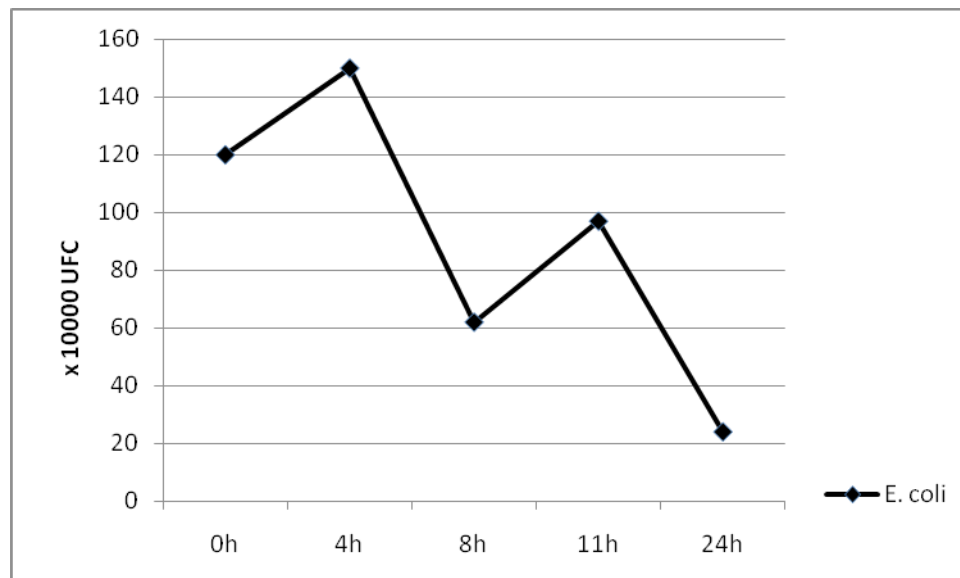


Gráfico 1 - Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *E. coli* após a adição de 3% licor pirolenhoso em fezes frescas, em diferentes intervalos de tempo (horas)

4 DISCUSSÃO

Através deste trabalho foi possível observar que a CIM resultante da padronização com a cepa padrão de *Escherichia coli* e a CIM das bactérias isoladas das fezes de suínos (*E. coli* e *Proteus sp.*) foram equivalentes, sugerindo que as linhagens isoladas do ambiente (fezes) são selvagens e apresentam características semelhantes à cepa padrão *E. coli* ATCC 25922. Mediante condições controladas de trabalho, como pH do caldo MH ajustado em 7.2 a 7.4, uso de cultura bacteriana fresca (*Escherichia coli* com 24 horas de crescimento), controle de inóculo de trabalho entre 1×10^5 a 1×10^6 UFC/mL, temperatura e tempo de incubação recomendados ($35 \pm 2^\circ\text{C}/24$ horas) encontrou-se resultados muito satisfatórios na determinação da menor concentração de pirolenhoso necessária para inibir *Escherichia coli*.

Dentre as 21 bactérias identificadas a partir dos dejetos de suínos, a grande maioria (90.5%) era *Escherichia coli*, considerada o principal indicador de contaminação fecal (coliformes fecais), inviabilizando a água para uso na irrigação e consumo animal e humano (DURINGAN et al., 2009). Os coliformes fecais são responsáveis pela poluição hídrica gerada por dejetos suínos e são considerados indicadores da qualidade microbiológica da água (CAPOANE, 2008). Além disso, este microrganismo presente no ambiente mal higienizado e algumas vezes excretado da própria fêmea (matriz) pode acarretar em doenças entéricas aos leitões, aliado ao estresse da desmama, baixa imunidade, superlotação, entre outros fatores (RISTOW, 2009).

Efetivamente, corroborando com o descrito por ENCARNAÇÃO (2001), a aplicação do licor pirolenhoso em fezes suínas resultou em redução da carga inicial de coliformes presentes (gráfico 1). A redução não linear da população de coliformes possivelmente seja atribuída ao emprego de uma concentração de licor pirolenhoso correspondente àquela com efeito bacteriostático (inibitório) e não bactericida. Serão necessários estudos complementares para avaliar a possibilidade do uso de concentração bactericida em material fecal.

O licor pirolenhoso possui diversos ácidos orgânicos que são facilmente absorvidos pela parede celular das bactérias, podendo danificar a estrutura do DNA das células e, conseqüentemente, causando um efeito bacteriostático (inibição do crescimento) ou um efeito bactericida (morte bacteriana). Além disso, os ácidos reduzem o nível do pH da célula, obrigando-a utilizar sua energia para liberar os prótons, levando a uma exaustão celular (LANGHOUT, 2005). Com isso, acredita-se que algum destes compostos químicos ou até mesmo a combinação destes componentes presentes no licor pirolenhoso atuaram sobre os coliformes dos dejetos suínos, inibindo seu crescimento.

Foi descrito que o licor pirolenhoso possui ação antifúngica sobre alguns filamentosos (*Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp.), que são emboloradores e manchadores de madeira recém abatida (COSTA et al., 2003), além de inibir o crescimento do fungo nematófago *Arthobotrys musiforme* "in vitro" a 64% (BORTOLETTO et al., 2009). De modo semelhante, os resultados promissores do presente trabalho demonstraram que o licor pirolenhoso tem ação, também, frente a coliformes.

A perspectiva futura é testar o desempenho do licor pirolenhoso na concentração de 3% diretamente nas fezes em condições reais, ou seja, diretamente no ambiente onde as fezes são geradas. Este passo será muito importante, pois até o momento conhecemos o potencial do licor pirolenhoso em condições laboratoriais controladas, mas seu comportamento mediante diferentes condições ambientais (temperaturas adversas, radiação solar, umidade, entre outros) é uma incógnita.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego do licor pirolenhoso, na dosagem inibitória (3%), parece ser útil, pois mostra a possibilidade de redução de contaminação fecal em criadouros de suínos. Além disso, a busca por alternativas de baixo custo na redução do impacto ambiental faz com que as pessoas demonstrem um maior interesse em investimentos. Os resultados deste estudo apontam para a possível utilização do licor pirolenhoso como adjuvante na redução da carga bacteriana em fezes de suínos de forma eficaz e não agressiva ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: Feira da Indústria Latino-Americana de Aves e Suínos AveSui, 2004, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Anais...** Itu: Gessulli, 2004. p.1-16.
- BENETTI, J.E. et al. Diagnóstico da gestão ambiental à luz do Tratado de Kyoto: O caso da Unidade Produtora de Leitões. **Revista de Contabilidade e Controladoria**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, v. 3, n.1, p. 96-110, jan./abr. 2011.
- BORTOLETTO, M. et al. Efeito do extrato pirolenhoso de *Eucalyptus* spp. no desenvolvimento de *Arthobotrys musiforme* in vitro. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 17, 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2009. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnline-TrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=4001&numeroEdicao=17>>. Acesso em: 27 jul. 2015.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para produção de extrato pirolenhoso para uso agrícola. **Embrapa Clima Temperado - Circular Técnica**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pelotas, n. 65, p.1-8, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/carvao3_000g7z70fgl02wx5ok00c38ulvwctax5.pdf>. Acesso em 27 jul. 2015.
- CAPOANE, V. **Poluição hídrica por dejetos de suínos**: um estudo de caso na microbacia do Arroio Caldeirão – Palmitinho – RS. 2008. 87 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Geografia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: 15th Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- COSTA, A.F. et al. Estudo Comparativo entre produtos químicos preservantes e licores pirolenhosos na inibição de fungos emboloradores. **Revista Brasil Florestal**, Brasília, n. 75, p. 23-30, jan. 2003.
- DURINGAN, M.R. et al. Potencial de contaminação de dejetos de suínos no Cinturão Verde do município de Ilha Solteira-SP. In: 5º ENCIVI – Encontro de Ciências da Vida, 2009, Ilha Solteira. **Anais...** Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2009. V. único.
- ENCARNAÇÃO, F. Redução do impacto ambiental na produção de carvão vegetal e obtenção do ácido pirolenhoso como alternativa para proteção de plantas. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v. 2, n. 4, p. 20-23, out./dez. 2001.
- LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2005, Santos, SP. **Anais...** Santos: Apinco, 2005. p.21-33.
- MAEKAWA, K. **Curso sobre produção de carvão, extrato pirolenhoso e seu uso na agricultura**. Botucatu: APAN - Associação dos Produtores de Agricultura Natural, 2002. Apostila.
- MARTINS, I.P.D. **Sistema produtivo do carvão vegetal e líquido pirolenhoso**: estudo de caso de fatores tecnológicos e legais que envolvem a atividade na cidade de Presidente Lucena-RS. 2009. 102 f. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Administração - Habilitação em Administração de Empresas. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2009.
- MASCARENHAS, M.H. et al. Efeito da utilização do extrato pirolenhoso na produtividade de alface. **Revista Brasileira de Horticultura**, v. 24, n. 1. p. 3122-3125, 2006a. Disponível em: <http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0773.pdf>. Acesso em:04 set. 2010.

MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.4, p. 33-38, out/dez 2002.

MIYASAKA, S. et al. Técnicas de produção e uso de fino de carvão e licor pirolenhoso. In: Encontro de Processos de Proteção de Plantas: Controle Ecológico de Pragas e Doenças, 1, 2001, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Agro Ecológica, p. 161-176, 2001.

PERDOMO, C.C. et al. Suinocultura e estratégias para a redução de gases e poluentes. In: LIMA, M.A.; CABRAL, O.M.R. et al. **Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 2001. cap. 16, p.325-345.

RISTOW, L.E. **Doenças Entéricas dos Suínos**. In: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos-ABRAVES, Cuiabá, 2009. Disponível em: <<http://abradesmt.com.br/arquivos/arquivo03.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2010.

ROESLER, M.R.; CESCONE TO, E.A. A produção de suínos e as propostas de gestão de ativos ambientais: o caso da região de Toledo no Paraná. Toledo, 2003. **Revista Gepec [on-line]**, 7: 2. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/gepec/article/viewFile/293/211>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

STOLZ, A.S. **Caracterização dos produtos da pirólise controlada da madeira de *Acacia mearnsii* De Wild - acácia negra**. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2010.

ZANETTI, M. et al. Influência do extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em limoeiro 'cravo'. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 529-533, dez. 2004. DOI: 10.1590/S0100-29452004000300037.