

**Renata Costa França<sup>1</sup>, Aloisio Freitas Chagas-Junior<sup>2\*</sup>, Elisangela Elena Nunes Carvalho<sup>3</sup>, Luiz Gustavo de Lima Guimarães<sup>4</sup>, Eduardo Andrea Lemus Erasmo<sup>2</sup>, Luiz Antonio de Oliveira<sup>5</sup>**

## **Babassu coconut mesocarp (*Orbignya* sp.) as carbon source for production of culture media for *Trichoderma***

### **ABSTRACT**

*Biological control has been studied as an alternative replacement of chemicals in agriculture . One of the microorganisms used in this system is the fungal species Trichoderma sp. In this work, media formulations were tested by replacing glucose babassu mesocarp (Orbignya sp.) Which has 69.46% starch in the composition. These culture media were used to cultivate three strains of the fungus Trichoderma . It was observed that the composition of the medium did not affect the growth of which statistically tested concentrations did not differ . For the time of 72h was no significant difference (p < 0.05) in diameter growth of strain 63 for the other however to the total time of the experiment the standard species proved stronger for longer, staying in log phase to the time 96 hours. The concentrations of immediate substituted carbon source (dextrose) at babassu mesocarp did not affect the growth of the fungus suggests that the mesocarp babassu is a good carbon source for the production of growth medium.*

**Key-words:** *Phaseolus vulgaris* L., abiotic stress, germination, vigor.

## **Mesocarpo de coco babaçu (*Orbignya* sp.) como fonte de carbono para produção de meios de cultura para *Trichoderma***

### **RESUMO**

O controle biológico vem sendo estudado como alternativa substitutiva de agentes químicos na agricultura. Um dos microrganismos utilizados neste sistema é a espécie fúngica *Trichoderma sp.* Neste trabalho foram testadas formulações de meios substituindo-se glicose por mesocarpo de babaçu (*Orbignya sp.*), o qual possui 69,46% de amido em sua composição. Estes meios de cultura foram utilizados para cultivar três linhagens do fungo *Trichoderma*. Observou-se que a composição do meio não afetou o crescimento sendo que estatisticamente as concentrações testadas não diferiram entre si. Para o tempo de 72h houve diferença significativa (p < 0,05) no diâmetro de crescimento da linhagem 63 para as demais entretanto para o tempo total do experimento a espécie padrão mostrou-se mais vigorosa por mais tempo, permanecendo na fase log até o tempo de 96h. As concentrações substituídas da fonte imediata de carbono (dextrose) pelo mesocarpo babaçu não interferiram no crescimento do fungo sugerindo que o mesocarpo de babaçu é uma boa fonte de carbono para produção de meio de crescimento.

**Palavras-chaves:** Amido, controle biológico, crescimento microbiano.

\*Autor para correspondência.

<sup>1</sup>Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Brasil, email. renatacarinhosa@hotmail.com.

<sup>2</sup>Professor, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Brasil, email. chagasjraf@uft.edu.br

<sup>3</sup>Professora, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil, email: elisanunescarvalho@hotmail.com

<sup>4</sup>Professor, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei-MG, Brasil, email. lgguimaraes@uft.edu.br

<sup>5</sup>Pesquisar, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM, Brasil, email luizoli@inpa.gov.br.

## INTRODUÇÃO

O controle biológico vem sendo estudado como alternativa substitutiva de agentes químicos na agricultura. É uma técnica ecologicamente correta, mas susceptível às variações de solo, condições climáticas entre outras, o que vem aumentando os esforços dos pesquisadores na tentativa de criar metodologias que aumentem a permanência e eficiência no solo dos agentes de controle biológico (Tortora et al., 2012). A descoberta de muitos biopesticidas é advinda de programas de investigação apoiadas pela esfera política, laboratórios de universidades e por programas de iniciação próprios de algumas pequenas empresas (Coutinho et al., 2010). Sendo assim a disponibilidade destes no mercado trás grandes vantagens ao equilíbrio do meio ambiente em face aos pesticidas convencionais, evitando assim a destruição de organismos benéficos à planta, já que possuem ação específica ao contrário dos pesticidas sintéticos. O *Trichoderma harzianum* é um potencial gerador de celulases, biopesticidas, antibióticos, compostos flavorizantes e proteína microbiana (Bianchi et al., 2001). A produção de celulases é importante para a indústria de papel, biopesticidas no controle biológico na agricultura, produção de antibióticos de grande interesse na indústria farmacêutica e compostos flavorizantes como o odor de coco produzido por uma das espécies de *Trichoderma*. O *Trichoderma* é um fungo de crescimento rápido, daí a grande vantagem de utilização como agente de biocontrole em larga escala (Peres e Melo, 1995). O carbono participa, junto com o nitrogênio, o hidrogênio, o oxigênio e em menor proporção o fósforo e o enxofre, na composição elementar da biomassa de todo ser vivo. Sua participação em uma alta percentagem na composição da biomassa faz do carbono o macroelemento mais quantitativamente importante em um meio de cultivo. Os hidratos de carbono são a fonte de carbono por excelência, utilizada pelos fungos para o seu crescimento (Galvagno e Forchianssin, 2010).

Os meios de cultivo variam de acordo com sua complexidade e podem ser classificados quanto a procedência dos constituintes em naturais ou complexos, quando usa ingredientes com composição química não definida, tais como extratos de vegetais (Galvagno e Forchianssin, 2010). O mesocarpo de babaçu, um extrato vegetal, subproduto do coco babaçu (*Orbignya* sp.) representa 20% do corpo do fruto (Barros,

2011). Vem sendo estudado como biossorvente alternativo para remoção do corante têxtil ftalocianina de cobre de soluções aquosas em trabalho conduzido por Vieira et al. (2009) e para remoção de cobre de aguardente para enquadrar nos requisitos máximos da legislação brasileira (Vieira et al, 2010). O mesocarpo de coco babaçu de acordo com Nascimento (2004), possui cerca de 68,30% de amido e possui propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Souza et al., 2011) . É também um alimento rico em vitaminas e sais minerais. De acordo com Teixeira (2008), o Brasil produz cerca de 372,6 ton.ano-1 de mesocarpo babaçu com destaque para o estado do Maranhão, onde essa fonte gerada é maior. O mesocarpo babaçu é encontrado na forma de pó inerte e é solúvel em água, característica que lhe proporciona possível possibilidade na produção de biopesticidas já que estes são encontrados comercialmente segundo Machado et al. (2012) na forma de pó molhável. Este trabalho teve como objetivo verificar a eficiência de crescimento de linhagens de fungo *Trichoderma*, em diferentes concentrações de meio modificado utilizando mesocarpo de coco babaçu.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foi determinada a composição centesimal do mesocarpo de coco babaçu utilizado na preparação dos meios de cultura para crescimento dos fungos *Trichoderma* no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. A umidade foi determinada segundo a técnica gravimétrica, extrato etéreo por extração com solvente orgânico (éter etílico) com o auxílio de um aparelho extrator do tipo Soxhlet; teor de nitrogênio por destilação em Microkjedahl (semi-micro), procedido do cálculo do teor de proteína bruta e determinação da fração de cinzas gravimetricamente segundo AOAC (1998) e determinação de fibra bruta feita por hidrólise ácida, pelo método gravimétrico descrito por Von de Kamer e Van Ginkel (1952).

As linhagens de *Trichoderma* (Linhagem 63 e Linhagem 92 foram obtidas da micoteca do Laboratório de Microbiologia, Incubadora de Empresas, Campus de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, consistindo de duas espécies nativas isoladas da região de Lagoa da Confusão, Tocantins, e como padrão a cepa de *Trichoderma harzianum* fornecido pela empresa de inoculantes JCO.

Foram comparados três meios de cultura contendo dextrose, peptona e ágar alterados do padrão com redução de 50%, 25% e 10% de dextrose em

substituição pelo mesocarpo babaçu como fonte de carbono. As formulações encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Formulação dos meios de cultura, utilizados para o cultivo das linhagens de *Trichoderma sp.*

Meios*	Dextrose (%)	Peptona (%)	Ágar (%)	Babaçu (%)
Meio Padrão (MP)	61,54	15,38	23,08	0,00
Meio 50% (M1)	30,77	15,38	23,08	30,77
Meio 25% (M2)	46,15	15,38	23,08	15,39
Meio 10% (M3)	55,38	15,38	23,08	6,16

\* o pH dos meios foram ajustados em 5,6.

Os ensaios foram realizados em placas de Petri de 9 cm, um disco de 5,8 mm de diâmetro contendo micélios das culturas fúngicas de *Trichoderma* foram retirados das culturas puras, com 8 dias de cultivo em meio BDA (batata, dextrose e ágar) e colocados no centro das placas de petri de acordo a Tabela 1, mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 horas, sendo realizadas avaliações de crescimento micelial em 24, 48, 72 e 120 horas após a inoculação. Para tal, foram traçadas duas retas perpendiculares no fundo das placas de petri passando pelo centro do disco de 5,8 mm; as leituras foram realizadas pelas medidas do diâmetro de crescimento hifal. O tamanho da colônia foi dada pelo diâmetro médio da colônia feita em paquímetro digital 6" marca Zaas Precision. Segundo Esposito e Azevedo (2010) o crescimento hifal pode ser avaliado pelo incremento, no tempo do raio de uma colônia circular, entretanto esse método tem como desvantagem não levar em conta a produção de micélio aéreo.

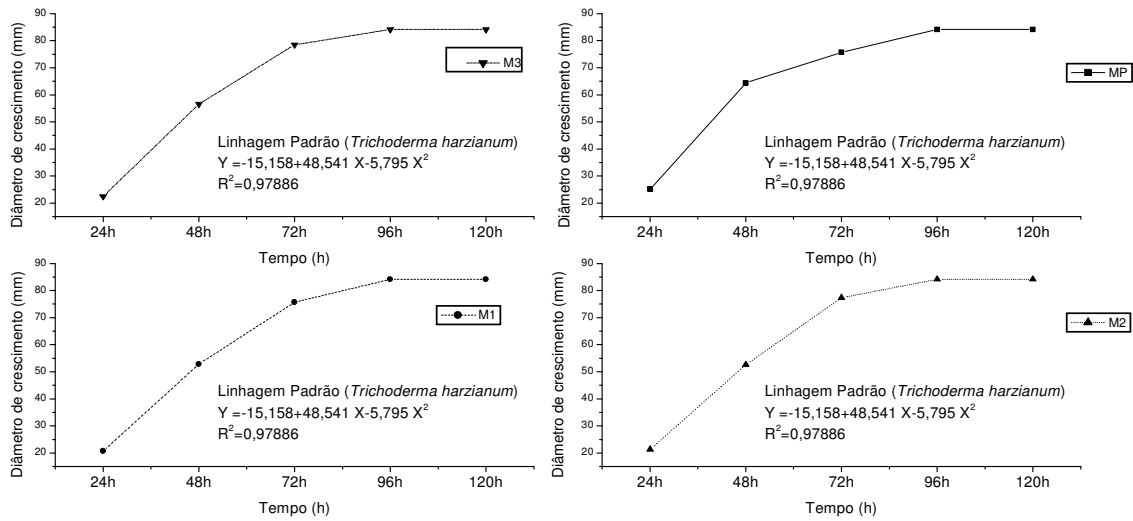
Os tratamentos foram dispostos de forma inteiramente casualizada, com três repetições e em esquema fatorial 4 x 3 x 4, sendo quatro formulações de meio, três fitopatógenos e quatro tempos de avaliação. Foi feita a análise de variância para verificação dos efeitos de tratamentos, utilizando a análise de regressão para avaliar a porcentagem de crescimento micelial do microrganismo, em relação ao tempo e a formulação do meio, utilizando o programa Assisat versão 7.6 beta 2012.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na composição centesimal do mesocarpo de babaçu, constatou-se um conteúdo de 14,05% de

umidade, 1,97% de lipídeos, 3,85% de cinzas, 3,77% de proteína, 6,90% de fibra bruta e 69,46% de amido em porcentagem. Silva (2011) encontrou porcentagens de amido variando de 61,41 a 66,05% em quatro marcas comerciais do mesocarpo babaçu. Em comparação a outras fontes de carbono como amido de milho, batata e mandioca descritos por Alexandrino (2006) a proporção de amido descrita foram de 77,60; 70,81 e 78,67% respectivamente. O mesocarpo de babaçu apresenta-se um pouco abaixo da média com diferença de conteúdo de amido de aproximadamente 6,23% em contrapartida com quantidades significativas de proteína em que nas fontes de carbono citadas podem ser consideradas desprezíveis variando de 0,01 a 0,26%. Os carboidratos são, a principal fonte de carbono-energia de que se utilizam os fungos. Assim, por um lado, como fonte de C, usam metabólitos precursores com fins biossintéticos (anabolismo) e, por outro, também o usam como fonte de energia (formação de AcCoA ou ATP) quando são catabolizados em moléculas simples tais como o CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O ou etanol (Galvagno e Forchianssin, 2010).

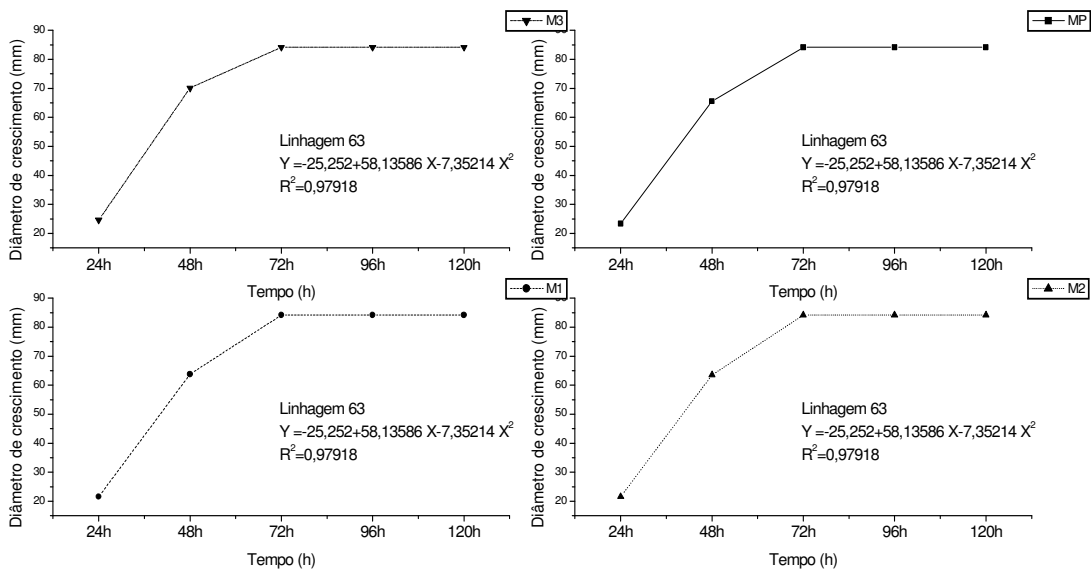
As Figuras 1, 2 e 3 apresentam o comportamento de crescimento nos diferentes meios para cada linhagem testada no experimento. Os gráficos mostram um crescimento polinomial de ordem 2 em um tempo total de crescimento de 120 h. Pode-se observar no período entre 24 e 72 h crescimento na fase log e após 96 h o crescimento entra na fase estacionária para o *Trichoderma harziano* enquanto que para a linhagem 63 a partir de 72 h, pelo ajuste da curva é possível observar o início da fase estacionária, o mesmo ocorrendo para a linhagem 92.



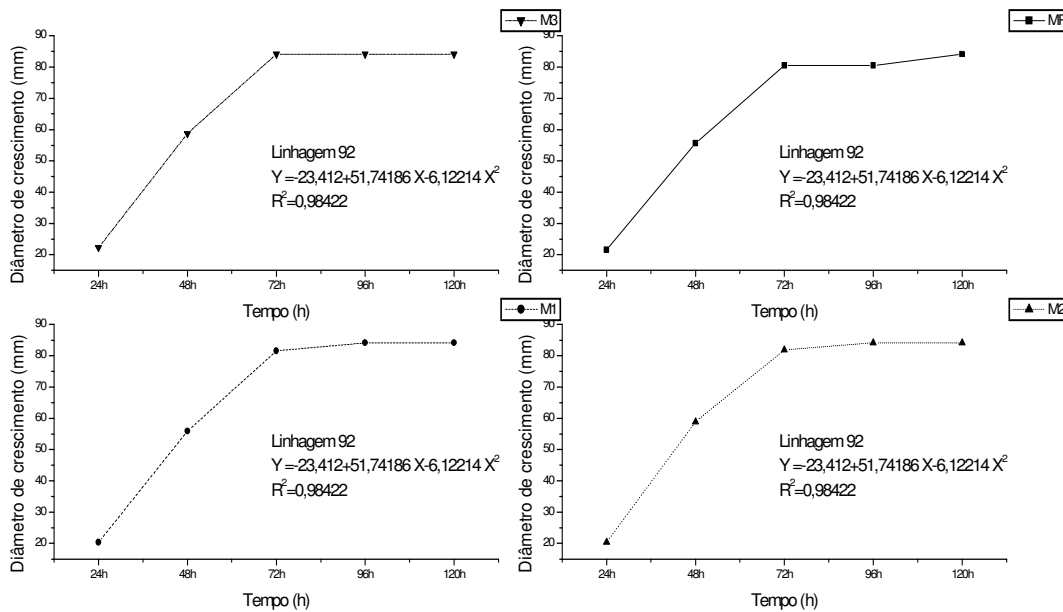
**Figura 1** - Crescimento para linhagem padrão *Trichoderma harzianum* em função do tempo em diferentes concentrações de meio a base de mesocarpo de coco babaçu.

Lopéz-Isunza, Larralde-Corona e Viniegra-González (1997) propuseram um modelo de transferência de massa e cinética de crescimento para fungos filamentosos onde testaram quatro concentrações de glicose sendo 10, 40, 70 e 120 g.L<sup>-1</sup> onde a cinética de crescimento observou-se

melhor em menores concentrações do substrato, o que não foi observado neste trabalho, onde a substituição da fonte imediata de carbono (dextrose) por mesocarpo de coco babaçu não influenciou na diferença estatística dos meios elaborados.



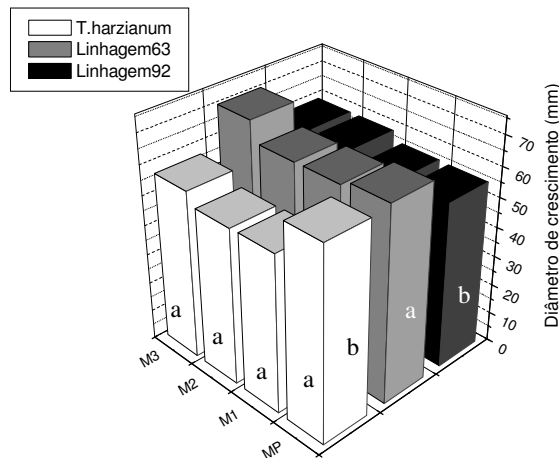
**Figura 2** - Crescimento para *Trichoderma sp.* linhagem 63 em função do tempo em diferentes concentrações de meio a base de mesocarpo de coco babaçu.



**Figura 3** - Crescimento para *Trichoderma sp.*, linhagem 92, em função do tempo em diferentes concentrações de meio a base de mesocarpo babaçu.

A Figura 4 apresenta a cinética de crescimento depois de 72h, onde os conjuntos seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Os meios não diferiram entre si, entretanto a

linhagem 63 diferiu das demais apresentando crescimento superior ao *Trichoderma harzianum* e à linhagem 92.



**Figura 4** - Cinética de crescimento para as linhagens de *Trichoderma* nos diferentes meios em 72h.

Pelo observado, podemos perceber que a espécie padrão se mostrou mais vigorosa que as espécies nativas, pois o tempo em que permaneceu na fase log foi maior que nas demais sendo de 96 h para a espécie padrão enquanto que para as demais foi até 72 h, entretanto estatisticamente ao nível de significância de ( $p < 0.05$ ) a espécie 63 diferiu em

crescimento dentre as demais. Quanto às concentrações de meio, estatisticamente não houve diferença significativa sugerindo que o mesocarpo babaçu não interferiu nas propriedades e condições de crescimento em relação ao meio padrão, subtendendo-se que este é uma boa fonte de carbono. No entanto, é necessário verificar outras

combinações de formulação no que se refere a fonte de nitrogênio, já que este em relação a outras fontes de carbono, apresenta quantidade significativa de proteína.

O trabalho sugere estudos posteriores em meio líquido e sólido e estudo de campo para formulações de biopesticida tendo como base o mesocarpo de babaçu o que traria benefícios não só a agricultura bem como ao desenvolvimento social sustentável já que este subproduto é advindo de uma cultura auto sustentável.

## CONCLUSÃO

O crescimento das linhagens 63 e 92 do fungo *Trichoderma* nas diferentes concentrações do meio de cultura, utilizando como fonte de carbono o mesocarpo do coco babaçu, foi eficiente quando comparado com o meio de cultura padrão não diferindo estatisticamente.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, C. D. **Utilização dos amidos de milho e de batata na elaboração de tapioca.** 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

AOAC, Official Methods of Analyses, Association of Official Analytical Chemists 16th Edn., AOAC, Washington, DC, USA, 1998.

BARROS, I. de C. **Avaliação Biofarmacotécnica de potencial excipiente farmacêutico: pó de mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.).** 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. de O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell et al. **Biotechnologia Industrial.** São Paulo, Edgard Blucher, v. 2, p.247-276, 2001.

COUTINHO, A.; SOUSA, A.; COSTA, M.; CORDEIRO, P.; FERREIRA, T.; OLIVEIRA, T. **Produção de biopesticidas.** 19p. Universidade do Porto, 2010.

GALVAGNO, M. A. e FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In:

**Fungos: uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia.** Caxias do Sul, p.125-170, 2010.

LÓPEZ-ISUNZA, F.; LARRALDE-CORONA, C. P. e VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 15, p. 2629- 2639, 1997.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: O fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

NASCIMENTO, U. S. **Carvão de Babaçu como Fonte Térmica para Sistema de Refrigeração por absorção no Estado do Maranhão,** Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, p. 82, 2004.

PERES, E. e MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*: I - Aspectos citológicos. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 56-59, 1995.

SILVA, A. P. dos S. **Caracterização físico química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.): subsídio para o desenvolvimento de produtos.** 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

SOUZA, M. H.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M.; NASCIMENTO, F. R.; GUERRA, R. N. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 1-5, 2011.

TEIXEIRA, M. A. Babassu - A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 9, p. 857-864, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 Ed. Porto Alegre: Artmed, 934p. 2012.

Vieira, A. P.; Santana, S. A. A.; Bezerra, C. W. B.; Silva, H. A. S.; de Melo, J. C. P.; da

Silva Filho, E. C.; Airoidi, C. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. **Chemical Engineering Journal**, v.161, n. 1-2, p. 99-105, 2010.

VIEIRA, A. P.; Santana, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; Chaves, J. A. P.; de MELO, J. C. P.; FILHO, E. C. S.; Airoidi, C. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, n. 2-3, p.1272–1278, 2009.

VON de KAMER, S. B. e VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, v.19, n.4, p.239-251, 1952.

Recebido: 08/08/2013  
*Received:*08/08/2013

Aprovado: 03/11/2013  
*Approved:* 11/03/2013