

# **HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)**

**Ciências agrárias e ambientais  
Volume 2**

**THIAGO NILTON ALVES PEREIRA  
RUHENA KELBER ABRÃO  
JOSÉ DE OLIVEIRA MELO NETO  
VÂNIA DE PAULA NEVES  
LÚCIA MORAES E SILVA  
ANA JÚLIA CAMPOS VIEIRA  
(ORG)**

**HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT:**  
**REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO**  
**CIENTÍFICA (PIBIC)**  
**Ciências agrárias e ambientais**  
**Volume 2**

**THIAGO NILTON ALVES PEREIRA**  
**RUHENA KELBER ABRÃO**  
**JOSÉ DE OLIVEIRA MELO NETO**  
**VÂNIA DE PAULA NEVES**  
**LÚCIA MORAES E SILVA**  
**ANA JÚLIA CAMPOS VIEIRA**  
**(ORG)**

THIAGO NILTON ALVES PEREIRA  
RUHENA KELBER ABRÃO  
JOSÉ DE OLIVEIRA MELO NETO  
VÂNIA DE PAULA NEVES  
LÚCIA MORAES E SILVA  
ANA JÚLIA CAMPOS VIEIRA

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
VOLUME 2

THIAGO NILTON ALVES PEREIRA  
RUHENA KELBER ABRÃO  
JOSÉ DE OLIVEIRA MELO NETO  
VÂNIA DE PAULA NEVES  
LÚCIA MORAES E SILVA  
ANA JÚLIA CAMPOS VIEIRA

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

1ª Edição  
Volume 2  
PALMAS  
2025



**Universidade Federal do Tocantins**  
Editora da Universidade Federal do Tocantins - EDUFT

Reitor  
Luís Eduardo Bovolato

Vice-reitora  
Marcelo Leineker Costa

Pró-Reitor de Administração e  
Finanças (PROAD)  
Carlos Alberto Moreira de Araújo

Pró-Reitor de Avaliação e  
Planejamento  
(PROAP)  
Eduardo Andrea Lemus Erasmo

Pró-Reitor de Assuntos Estudantis  
(PROEST)  
Kherlley Caxias Batista Barbosa

Pró-Reitora de Extensão, Cultura e  
Assuntos Comunitários (PROEX)  
Maria Santana Ferreira dos Santos

Pró-Reitora de Gestão e  
Desenvolvimento de Pessoas  
(PROGEDEP)  
Michelle Matilde Semiguel Lima  
Trombini Duarte

Pró-Reitor de Graduação (PROGRAD)  
Eduardo José Cezari

Pró-Reitor de Pesquisa e  
Pós-Graduação (PROPESQ)  
Karylleila dos Santos Andrade

Pró-Reitor de Tecnologia e  
Comunicação (PROTIC)  
Werley Teixeira Reinaldo

Conselho Editorial  
Presidente

Ruhena Kelber Abrão Ferreira

Membros do Conselho por Área

*Ciências Biológicas e da Saúde*  
Ruhena Kelber Abrão Ferreira

*Ciências Humanas, Letras e Artes*  
Fernando José Ludwig

*Ciências Sociais Aplicadas*  
Ingrid Pereira de Assis

*Interdisciplinar*  
Wilson Rogério dos Santos

---

O padrão ortográfico e o sistema de citações e referências bibliográficas são prerrogativas de cada autor. Da mesma forma, o conteúdo de cada capítulo é de inteira e exclusiva responsabilidade de seu respectivo autor.



<http://www.abecbrasil.org.br>



<http://www.abeu.org.br>

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Capa: Ruhena Kelber Abrão

Diagramação: Valentina Rodrigues Moreno

Revisão Linguística: os autores

Revisão Técnica: Diego Ebling do Nascimento

DOI 10.20873//\_eduft\_2025\_9

Ficha catalográfica

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins (SISBIB)**

---

I58            Horizontes Científicos da UFT: Reflexões do XX Seminário de Iniciação Científica (PIBIC) - Ciências Agrárias e Ambientais (volume 2). / Thiago Nilton Alves Pereira. Ruhena Kelber Abrão. José de Oliveira Melo Neto. Vânia de Paula Neves. Lúcia Moraes e Silva. Ana Júlia Campos Vieira – Palmas, TO: EdUFT, 2025.  
319p.

▲ ISBN: 978-65-5390-158-2.

1. Iniciação Científica. 2. PIBIC. 3. Universidade. 4. Ciência. 5. Educação. I. Pereira, Thiago Nilton Alves. II Abrão, Ruhena Kelber. III Neto, José de Oliveira Melo. IV Neves, Vânia de Paula Neves. V. Silva, Lúcia Moraes. IV. Vieira, Ana Júlia Campos. Título.

CDD 371.3

---

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte**

## Apresentação

É com imenso entusiasmo que apresentamos esta coletânea comemorativa, criada para celebrar as duas décadas de história, impacto e realizações do Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Estes livros simbolizam muito mais do que uma simples marca temporal; eles representam a consolidação de uma trajetória dedicada ao fortalecimento da pesquisa científica, da formação de talentos e do compromisso inabalável da UFT com a excelência acadêmica e a transformação social por meio do conhecimento.

Desde sua criação, o PIBIC vem desempenhando um papel central no estímulo à pesquisa científica e na formação de novas gerações de pesquisadores em diferentes áreas do conhecimento. Ao longo desses 20 anos, o Programa proporcionou a centenas de estudantes a oportunidade de vivenciar de perto a ciência em sua essência, despertando a curiosidade investigativa, incentivando o pensamento crítico e promovendo o desenvolvimento de competências e habilidades profícuas ao enfrentamento dos desafios acadêmicos e profissionais.

As contribuições do PIBIC para a sociedade vão além das publicações científicas, dos projetos inovadores e das apresentações em eventos acadêmicos. Elas se traduzem em impactos reais na qualidade de vida da população, no fortalecimento das políticas públicas e no desenvolvimento sustentável da região, principalmente em um território como o estado do Tocantins. Por meio de suas pesquisas, os estudantes e orientadores associados ao Programa não apenas geraram conhecimento, mas também construíram elos entre a Universidade e a Sociedade, reafirmando o papel indubitável da ciência como vetor de transformação.

Esta coletânea de livros, é, portanto, uma homenagem a todos aqueles que contribuíram para a construção dessa história de sucesso na Universidade Federal do Tocantins: os professores

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

orientadores, que, com dedicação e expertise, guiaram jovens pesquisadores em seus primeiros passos no universo científico; os estudantes, que, movidos pela curiosidade e determinação, desafiaram os limites do conhecimento; os gestores, que acreditaram na relevância do programa e garantiram seu fortalecimento ao longo dessas duas décadas; e as instituições parceiras, cujo apoio sempre foram fundamentais para a concretização de inúmeras iniciativas.

Ademais, o registro de momentos marcantes, os desafios superados e as conquistas alcançadas, esta obra pretende ser uma fonte de inspiração para as gerações futuras. O PIBIC/UFT não é apenas um Programa Acadêmico; é uma demonstração viva de como a ciência pode mudar vidas e transformar realidades.

Assim, reafirmamos nosso compromisso com a continuidade desse legado e com a ampliação das oportunidades de formação científica para os jovens pesquisadores. Esperamos que as histórias contadas e os resultados registrados sirvam como um convite para a reflexão e o engajamento, mostrando que investir em ciência e educação é, sem dúvidas, investir em um futuro mais justo, sustentável e próspero para todos.

Parabenizamos a Universidade Federal do Tocantins, o Programa Institucional de Iniciação Científica e todas (os) os envolvidos ao longo desses 20 anos. Que esta obra celebre as conquistas do passado, inspire as ações do presente e oriente as ações futuras. Viva a ciência, viva o conhecimento, viva o PIBIC/UFT!

Prof. Dr. Thiago Nilton Alves Pereira

Prof. Dr. José de Oliveira Melo Neto



## Prefácio

É com grande honra e emoção que escrevo este prefácio, celebrando os 20 anos do programa de bolsas de iniciação científica em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Mais do que um marco histórico, esta coletânea reflete um compromisso inabalável com a formação acadêmica, a inovação científica e o desenvolvimento regional.

Minha conexão com a iniciação científica está intrinsecamente relacionada com o surgimento dos programas PIBIC no Brasil. Eu faço parte de uma geração de estudantes que cresceram e desenvolveram-se em sintonia com a ocorrência dessas possibilidades científicas nas instituições federais de ensino superior. Durante quase toda a minha graduação em Agronomia, desde 1998 até 2002, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), fui bolsista de iniciação científica. Essa experiência não apenas moldou minha visão da ciência, mas também abriu portas que definiram minha trajetória profissional. Hoje, como professor e orientador de diversos bolsistas nas áreas de Ciências Agrárias e Biológicas, tenho o privilégio de testemunhar diariamente o impacto transformador dessa oportunidade na vida de jovens estudantes. Minha relação com a UFT também é especial. Como visitante frequente, especialmente do campus de Gurupi, onde disponho de colegas professores que foram meus mentores de iniciação científica e parceiros acadêmicos, acompanho de perto o trabalho dedicado que tem sido realizado ao longo desses anos. Vejo com admiração a maneira como o programa de iniciação científica da UFT tem contribuído não apenas para a formação de profissionais altamente capacitados, mas também para o fortalecimento da ciência em uma região de importância estratégica para o cenário agrário brasileiro.

Assim como aconteceu comigo na UFV, o programa PIBIC da UFT tem desempenhado um papel crucial na formação de jovens cientistas,

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

oferecendo-lhes a oportunidade de mergulhar no universo da pesquisa. Não se trata apenas de um investimento em conhecimento, mas em pessoas: estudantes que, movidos pela curiosidade e guiados por mentores dedicados, ajudaram a responder a perguntas cruciais para o setor agrário e para o meio ambiente. Dito de outra forma, o programa tem sido um verdadeiro alicerce para o avanço da pesquisa e da inovação em Ciências Agrárias. Projetos conduzidos por estudantes e seus orientadores têm gerado soluções para desafios locais e globais, desde a sustentabilidade da produção agrícola até a preservação da biodiversidade.

Por fim, convido os leitores a explorarem as páginas desta coletânea com atenção e entusiasmo. Os relatos aqui apresentados são um testemunho vivo do impacto transformador da iniciação científica e um lembrete do poder da educação para moldar futuros brilhantes. Também parabeno a UFT e todos os envolvidos por esses 20 anos de excelência. Que esta coletânea inspire novas gerações a trilhar caminhos igualmente frutíferos, mantendo vivo o espírito de curiosidade, dedicação e inovação que caracteriza a iniciação científica.

Por Prof. Eugênio Eduardo de Oliveira

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

## SUMÁRIO

Capítulo 1	14
Estudo sobre os fatores de relevância para a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas – TO	
William de Sousa Dias	
Ila Raquel Mello Cardoso	
Camilli Raiane Alves do Amaral	
Angrelha Pereira dos Santos Calixto	
Ionara de Araújo Reis Aires	
Capítulo 2	42
Prospecção da qualidade nutricional e tecnológica da semente de quiabo para produção de bebida	
Maria Eduarda Spagnol	
Caroline Roberta Freitas Pires	
Capítulo 3	57
Suplementação de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) com de <i>Lemna</i> sp. peletizadas	
Peter Gaberz Kirschnik	
Maria Lúcia Feitosa Gomes	
Victória Silva Santos	
Gabriela Benedetti	
Capítulo 4	73
A Desenvolvimento de pães enriquecidos com farinha da Amêndoa de Sapucaia	
Áryson Barbosa Serpa	
Maria Luciana Barbosa Mendes	
Caroline Roberta Freitas Pires	
Emerson Adriano Guarda	
Patrícia Martins Guarda	
Capítulo 5	89
Seleção de leveduras obtidas do fruto Tucumã ( <i>Astrocaryum vulgare</i> ) Como agentes de biocontrole	
José Rafael Farias das Chagas	
Catiele Silva de Oliveira	
Juliana Fonseca Moreira da Silva	

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Raphael Sanzio Pimenta

## Capítulo 6 104

Identificar e avaliar o potencial probiótico das leveduras isoladas do fruto Amazônico Tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

João Guilherme da Silva Araújo

Thais Costa Santos

Juliana Fonseca Moreira da Silva

## Capítulo 7 118

Leveduras obtidas do fruto da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth)

Associadas a substâncias gras no controle da Antracnose em manga (*Mangifera indica*)

Ester Campos da Silva

Catiele Silva de Oliveira

Juliana Fonseca Moreira da Silva

Raphael Sanzio Pimenta

## Capítulo 8 132

Desenvolvimento de um processo contínuo para a produção de açúcar invertido em reator de leito fixo utilizando invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato

Natanael Do Carmo Sousa Gomes

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

## Capítulo 9 154

Estudo da estabilidade de invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato para a produção de açúcar invertido

Gabriel Rocha Matsuura

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

## Capítulo 10 171

Estudo da produção de açúcar invertido em biorreator batelada catalisada por invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato

Joicy Silva e Silva

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

## Capítulo 11 189



# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Produção de lipídio microbiano a partir de vinhaça e melaço visando a produção de alimentos e biocombustíveis

Marciel Brito de Oliveira Silva

Michelle da Cunha Abreu Xavier

Sergio Andres Villalba Morales

Capítulo 12 204

Eficiência de *Bacillus subtilis* no biocontrole e promotor de crescimento vegetal na cultura do arroz

Nathália Santos Hoffmeister

Aloisio Freitas Chagas Junior

Capítulo 13 221

Qualidade de mudas de *Magonia pubescens* em diferentes composições de substratos

Joene de Nazaré Barros de Sousa

Thais Ribeiro Costa

Cristiano Bueno de Moraes

Capítulo 14 236

Produção de enzimas fibrolíticas, açúcares fermentescíveis utilizando cogumelos comestíveis produzidos com resíduos agroindustriais

Pedro Petterson Ferreira Santana

Gessiel Newton Scheidt

Augustus Caesar Franke Portella

Capítulo 15 245

Substratos na produção de cogumelos *Pleurotus ostreatus*.

Ana Luiza Santiago Pereira

Augustus Caesar Franke Portella

Capítulo 16 261

Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* por cruzamento multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor

Enzo de Almeida Sbroglia

Augustus Caesar Franke Portella

Capítulo 17 277

*Bacillus Subtilis* no biocontrole de nematóides na cultura de alface

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Bruna Marques de Souza  
Aloisio Freitas Chagas Junior

Capítulo 18	290
Efeito do tempo de armazenamento da amostra no DNA total do solo	
Milenna Oliveira Santiago	
Elainy Cristina Alves Martins Oliveira	
Sobre os organizadores	314

## Capítulo 1

### Estudo sobre os fatores de relevância para a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas – TO

William de Sousa Dias

Ila Raquel Mello Cardoso

Camilli Raiane Alves do Amaral

Angrelha Pereira dos Santos Calixto

Ionara de Araújo Reis Aires

#### RESUMO:

Um produto para ser reconhecido como orgânico é necessário conter 95% de ingredientes orgânicos e possuir o registro no rótulo, os outros 5% de ingredientes não orgânicos não podem conter os produtos proibidos pelas regras da produção orgânica, como por exemplo: agrotóxicos, hormônios, entre outros. O consumo de alimentos orgânicos contribui para uma alimentação mais saudável, com maior qualidade nutricional. Esta pesquisa tem como objetivo estudar os fatores relevantes que influenciam a decisão de compra de alimentos orgânicos pelos consumidores em Palmas-TO, identificando as principais motivações e barreiras para o consumo desses produtos, além de avaliar como questões econômicas, sociais e ambientais impactam essas escolhas. O levantamento dos estabelecimentos que fornecem alimentos orgânicos em Palmas-TO foi realizado através da identificação de três principais categorias de pontos de venda: restaurantes, supermercados e feiras orgânicas. A pesquisa contabilizou 38 restaurantes que oferecem opções orgânicas, 288 supermercados que disponibilizam produtos da natureza, além de 8 feiras orgânicas regulares na região e 22 hortas comunitárias. Foram utilizados dados de fontes locais, visitas a estabelecimentos e informações disponibilizadas por órgãos públicos e associações de produtores orgânicos. Em relação a produção de alimentos orgânicos observou-se uma escassez de fornecedores de sementes na região, o qual gera uma série de dificuldades para os produtores locais, os quais são obrigados a buscar alternativas em outras áreas geográficas. Entre os 182 entrevistados, 59 % eram do sexo feminino e notou-se que adultos jovens e de meia-idade demonstram maior interesse ou conscientização sobre o consumo de alimentos orgânicos. Entre os estabelecimentos entrevistados percebe-se que este mercado em Palmas-TO ainda está em fase de expansão, especialmente em termos de variedade e acessibilidade. A alta concentração de estabelecimentos que oferecem esses produtos em determinadas áreas pode ser um obstáculo para o aumento do consumo em massa. O perfil dos consumidores que frequentam restaurantes com opções orgânicas ou compram em feiras tende a ser composto por pessoas com maior poder aquisitivo ou maior nível de conscientização sobre os benefícios dos orgânicos. Conclui-se que esta pesquisa contribui para a compreensão das dinâmicas de consumo de

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

alimentos orgânicos em Palmas-TO, oferecendo insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias que promovam a sustentabilidade e o consumo deste tipo de alimento.

**Palavras-Chave:** Consumidor, Alimento Natural, Alimentação Saudável.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, observa-se a degradação do planeta devido à liberação de produtos nocivos no meio ambiente, resultando em alterações climáticas que dificultam não apenas a produção de alimentos, mas também a sobrevivência humana. Torna-se fundamental incentivar práticas mais saudáveis para remediar esses problemas. Considerando que o corpo humano necessita cada vez mais de alimentos nutritivos para lidar com doenças e vírus, como demonstrado durante a pandemia de coronavírus, em que muitos dos afetados não conseguiram sobreviver devido à incapacidade do sistema imunológico em combater o vírus, é imprescindível adotarmos hábitos mais saudáveis. Isso pode ajudar a reduzir as chances de que cenários como esse se repitam, minimizando, ao menos, seu impacto.

Com o aumento do consumo de alimentos orgânicos em grande escala, observa-se um crescimento nos rendimentos dos diversos agentes envolvidos na produção, abrangendo pequenos, médios e grandes produtores. Esse retorno financeiro estimula alguns agricultores a migrarem da produção tradicional para a produção orgânica, tornando-a mais atrativa, apesar das perdas que podem ocorrer durante o processo produtivo em relação aos produtos industrializados. O aumento da renda está relacionado ao fato de que os produtos orgânicos conquistam cada vez mais espaço na alimentação diária da população e no mercado, competindo diretamente com os alimentos tradicionais. À medida que cresce o número de consumidores de alimentos orgânicos, aumenta também a



escala de produção, o que contribui para a redução do custo unitário de produção e torna os produtos mais acessíveis à população.

No contexto da crescente demanda por alimentos saudáveis e sustentáveis, a pesquisa sobre os fatores relevantes para a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas-TO se faz pertinente e necessária. O consumo de orgânicos tem ganhado espaço em várias regiões do Brasil, impulsionado pela maior conscientização sobre seus benefícios à saúde e ao meio ambiente. No entanto, o mercado de orgânicos ainda enfrenta desafios consideráveis, especialmente em regiões onde a oferta é limitada e os preços são mais elevados em comparação aos produtos convencionais. Diante desse cenário, a investigação proposta busca compreender o comportamento dos consumidores locais e os motivos que os levam ou não a adquirir esses produtos.

Uma das principais motivações para a realização deste estudo é a crescente preocupação global com a saúde e o impacto ambiental das práticas agrícolas convencionais, que frequentemente envolvem o uso intensivo de pesticidas e fertilizantes sintéticos. Em contrapartida, os alimentos orgânicos surgem como uma alternativa mais saudável e sustentável, uma vez que são produzidos sem o uso de insumos químicos nocivos, contribuindo para a preservação dos recursos naturais e para a biodiversidade. Esse apelo tem ganhado força em um mundo onde as questões ambientais são cada vez mais centrais nas discussões sociais e econômicas.

Entretanto, o mercado de orgânicos em Palmas ainda está em desenvolvimento, e a maior parte dos consumidores se depara com barreiras importantes para aderir a esse estilo de alimentação. O fator econômico é uma das principais dificuldades, como evidenciado por pesquisas anteriores que mostram que, embora os consumidores reconheçam os benefícios dos alimentos orgânicos, muitos ainda optam pelos produtos convencionais devido ao preço mais acessível. Essa realidade gera um dilema: mesmo cientes das vantagens para a

saúde e o meio ambiente, as famílias de menor poder aquisitivo são, muitas vezes, forçadas a escolher produtos mais baratos, mas com maior impacto ambiental e riscos à saúde.

Além disso, há uma questão de acessibilidade e variedade. Em cidades como Palmas, a oferta de orgânicos pode ser limitada a feiras específicas ou mercados especializados, dificultando o acesso da população em geral. A falta de variedade de produtos também é um fator que desestimula o consumo frequente, uma vez que os consumidores podem não encontrar todos os itens que desejam ou precisam.

Outro aspecto relevante que justifica a importância desta pesquisa é o papel da conscientização. Muitos consumidores ainda não possuem informações suficientes sobre os benefícios dos alimentos orgânicos e como esses produtos podem contribuir para uma vida mais saudável. A falta de campanhas educativas amplas e eficazes dificulta a expansão do consumo, especialmente em regiões onde a cultura de alimentação orgânica ainda não está tão enraizada. Compreender como a informação (ou a falta dela) impacta a decisão de compra pode ser essencial para o desenvolvimento de estratégias que fomentem a educação do consumidor.

A investigação sobre os fatores relevantes para a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas-TO permitirá uma compreensão mais profunda das motivações e obstáculos enfrentados pelos consumidores locais. A resposta a essa pergunta pode fornecer insights valiosos para produtores, comerciantes e formuladores de políticas públicas que desejam expandir o acesso e a adoção de alimentos orgânicos.

Além disso, o estudo contribuirá para o crescimento sustentável desse mercado na região, promovendo práticas agrícolas mais responsáveis e um consumo mais consciente. Em última análise, ao

investigar os fatores que influenciam a decisão de compra de alimentos orgânicos, a pesquisa busca não apenas entender o comportamento do consumidor, mas também promover mudanças que possam beneficiar tanto a saúde pública quanto o meio ambiente, consolidando os orgânicos como uma alternativa viável e acessível a todos.

## OBJETIVOS

### GERAL

Estudar os fatores relevantes que influenciam a decisão de compra de alimentos orgânicos pelos consumidores em Palmas-TO, identificando as principais motivações e barreiras para o consumo desses produtos, além de avaliar como questões econômicas, sociais e ambientais impactam essas escolhas.

### ESPECÍFICOS

- Identificar os fatores determinantes para a decisão de compra de alimentos orgânicos pelos consumidores de Palmas-TO, como saúde, sustentabilidade, impacto ambiental, entre outros.
- Analisar o perfil dos consumidores de alimentos orgânicos na cidade, considerando aspectos demográficos como idade, gênero, renda e grau de escolaridade.
- Avaliar o impacto da conscientização e da educação sobre alimentos orgânicos nas decisões de compra, verificando como o nível de conhecimento e acesso a informações influenciam as escolhas dos consumidores.
- Examinar os principais obstáculos para o consumo de alimentos orgânicos em Palmas-TO, como custo elevado, baixa oferta e variedade de produtos, acessibilidade e conveniência de compra.
- Investigar o papel dos canais de venda e distribuição, como supermercados, feiras e lojas especializadas, no acesso aos

alimentos orgânicos e como eles influenciam o comportamento de consumo.

- Propor estratégias para aumentar a adesão ao consumo de alimentos orgânicos na região, levando em conta os fatores que influenciam a decisão de compra e os desafios identificados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Aprimorar o conhecimento sobre a produção de alimentos orgânicos foi fundamental para compreender os desafios enfrentados tanto no processo produtivo quanto os relacionados às condições específicas da região de produção. O entendimento detalhado desse processo permitiu identificar como o valor agregado é gerado, especialmente considerando que muitos consumidores valorizam informações sobre os métodos de produção antes de decidir pela compra. Essa percepção reforça a importância da transparência e do cuidado na cadeia produtiva, atendendo às expectativas de um público cada vez mais consciente.

Em pesquisa de campo, foi analisada a produção de hortaliças orgânicas de uma empresa recente no mercado orgânico. Foram destacados os desafios enfrentados no início da operação, estabelecendo-se as limitações e identificando as condições mais favoráveis para a produção. Buscou-se, especificamente, compreender o relacionamento entre o produtor e o consumidor, além de investigar como as vendas eram ampliadas. Aspectos de melhoria foram discutidos com o objetivo de tornar o produto mais acessível ao público.

O conhecimento dos fornecedores foi essencial para compreender o tempo médio de produção, desde o preparo do solo até o processamento do alimento para venda. Também foi analisado o papel de supermercados e minimercados, que possuem maior espaço no ramo de comercialização, identificando os critérios considerados



por esses estabelecimentos ao atuar como revendedores.

Para compreender os fatores que influenciam a decisão de compra do consumidor, foi necessário considerar a quantidade de alimentos orgânicos ofertados na região, ou seja, a disponibilidade desses produtos. Em seguida, buscou-se identificar quais indivíduos realizavam o consumo regular desses alimentos, avaliando a demanda existente. Com base nessas informações, foi possível relacionar a oferta e a procura, permitindo uma análise das melhorias que podem ser implementadas no processo de venda para aumento do consumo de produtos orgânicos. Além disso, essa abordagem também possibilitou a identificação de fatores externos que influenciam diretamente a decisão de compra dos consumidores.

O levantamento dos estabelecimentos que fornecem alimentos orgânicos em Palmas/TO foi realizado através da identificação de três principais categorias de pontos de venda: restaurantes, supermercados e feiras orgânicas. A pesquisa contabilizou 38 restaurantes que oferecem opções orgânicas, 288 supermercados que disponibilizam produtos da natureza, além de 8 feiras orgânicas regulares na região e 22 hortas comunitárias. Para isso, foram utilizados dados de fontes locais, visitas a estabelecimentos e informações disponibilizadas por órgãos públicos e associações de produtores orgânicos. O objetivo foi mapear a oferta desses produtos na cidade, contribuindo para uma análise detalhada da relação entre oferta e demanda no mercado de orgânicos.

Para compreender os fatores que influenciam a decisão de compra dos consumidores, foi aplicado um questionário entre outubro de 2023 e setembro de 2024. Este questionário visava investigar o perfil de conhecimento e consumo de alimentos orgânicos dos habitantes de Palmas-TO. A pesquisa identificou os principais pontos de venda de alimentos orgânicos na região, incluindo lojas especializadas, feiras livres e restaurantes. Ao todo, 182 entrevistados participaram do estudo. A pesquisa considerou uma margem de erro

de 10%, resultando em um nível de confiança de 99%.

Para a coleta de dados, o questionário estruturado foi composto por 14 questões de múltipla escolha. O questionário abordou a descrição do perfil dos consumidores, coletando informações demográficas, como idade e gênero. Além disso, avaliou o grau de conhecimento dos consumidores sobre alimentos orgânicos, explorando o entendimento dos participantes acerca dos benefícios, métodos de produção e certificação desses produtos. Também identificou os atributos valorizados na decisão de consumo, destacando fatores como qualidade dos produtos, preço, benefícios à saúde e impacto ambiental. Foi questionado sobre a participação dos entrevistados em feiras e eventos de alimentos orgânicos, com o objetivo de investigar a frequência de envolvimento e o nível de interesse nas iniciativas locais voltadas à promoção de produtos orgânicos.

Essa investigação é de suma importância, pois a participação em tais eventos não apenas evidencia a disposição dos consumidores em adquirir alimentos orgânicos, mas também serve como um indicador do engajamento social e da conscientização sobre práticas sustentáveis. Além disso, esses eventos proporcionam uma plataforma para a disseminação de informações sobre os benefícios dos alimentos orgânicos, fortalecendo a comunidade em torno da sustentabilidade e contribuindo para o crescimento do mercado de produtos orgânicos na região.

A análise desses dados pode oferecer insights valiosos para formuladores de políticas, produtores e comerciantes, visando o aprimoramento das estratégias de marketing e a promoção de um consumo mais responsável e consciente. Os resultados obtidos foram amplamente reveladores. A maioria dos entrevistados demonstrou um nível significativo de conhecimento sobre alimentos orgânicos, com muitos reconhecendo os benefícios à saúde e o impacto positivo no meio ambiente. No entanto, o preço foi identificado como uma

barreira significativa para o aumento do consumo, indicando uma necessidade de políticas que tornem esses produtos mais acessíveis.

Além disso, a pesquisa permitiu identificar as motivações e preocupações dos consumidores em relação aos alimentos orgânicos. Muitos consumidores apontaram a qualidade dos produtos como um fator decisivo, seguido pelos benefícios à saúde. O impacto ambiental, embora menos citado, também foi um fator relevante para uma parcela significativa dos entrevistados. Esses dados são valiosos não apenas para os produtores e comerciantes, mas também para os formuladores de políticas públicas, que podem usar essas informações para promover campanhas de conscientização e incentivos ao consumo de alimentos orgânicos.

A análise detalhada do comportamento e das preferências dos consumidores em relação aos alimentos orgânicos proporciona insights profundos sobre os fatores que influenciam suas decisões de compra. Esses insights são essenciais para desenvolver estratégias eficazes que aumentem o consumo de alimentos orgânicos, beneficiando tanto os consumidores quanto o meio ambiente. Em suma, a pesquisa contribui significativamente para a compreensão das dinâmicas de consumo de alimentos orgânicos em Palmas-TO, oferecendo uma base sólida para futuras ações e estudos nessa área.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Em cada etapa da pesquisa, foram observados fatores que influenciam a compra do consumidor. Na etapa inicial de produção, analisamos como o produtor “conquista” o consumidor, identificando diferentes tipos de perfis que serão melhor classificados nas fases subsequentes da pesquisa. Também levantamos dados sobre os revendedores para compreender por que alguns consumidores não têm acesso ou interesse em alimentos orgânicos, bem como para investigar por que certos estabelecimentos não oferecem esses

produtos, o que dificulta a disseminação dessa prática saudável.

### **Produção**

Observando a influência de uma produção de qualidade sobre os resultados esperados, identificaram-se os principais desafios relacionados à produção na região de Palmas - TO. Um dos primeiros desafios é encontrar fornecedores de sementes de qualidade, que não estejam contaminadas com produtos químicos e que sejam ofertadas a um preço acessível, considerando os custos que serão exigidos ao longo do processo produtivo.

A escassez de fornecedores de sementes na região gera uma série de dificuldades para os produtores locais, os quais são obrigados a buscar alternativas em outras áreas geográficas. Essa procura por fornecedores fora da região acarreta o aumento dos custos de transporte e logística, além de prolongar os prazos de entrega, o que pode comprometer o calendário de plantio. Ademais, existe o risco de não encontrar sementes com as mesmas características ideais, como qualidade e adaptabilidade ao solo e ao clima local, o que pode prejudicar a produtividade.

Na etapa de produção, destacaram-se os consumidores frequentes, aqueles que evitam ao máximo produtos industrializados e se mantêm atualizados sobre o setor de alimentos saudáveis. Esses consumidores buscam conhecimento sobre a qualidade dos alimentos e não são facilmente influenciados pelo preço; sua prioridade é a qualidade da produção. Caracterizam-se por criar um vínculo de confiança com o produtor, interessando-se pelos métodos de produção para assegurar que os produtos são realmente naturais. Dessa forma, estão dispostos a pagar o valor oferecido, desde que confiem na procedência dos alimentos.

É importante observar a sequência de prioridades desse tipo de consumidor: inicialmente, ele busca informações sobre o processo de

produção para, só então, considerar o preço. Isso indica que o principal fator na decisão de compra é a qualidade, sendo o valor agregado entendido e justificado pela percepção de autenticidade e naturalidade do produto.

Além disso, por estar constantemente informado sobre o mercado, esse consumidor conhece a maioria, senão todos, os fornecedores de alimentos orgânicos da região. Diante de preços similares, sua escolha recairá sobre o produtor que oferece maior confiança em relação à qualidade, reafirmando a importância do método de produção na decisão de compra.

Outra classificação de consumidores que pode ser conquistada por meio de uma boa produção é a dos indivíduos que se preocupam mais com o preço dos produtos. Com uma produção em maior escala, seria mais viável equiparar os preços dos produtos orgânicos aos dos industrializados. Dessa forma, também se resolveria o problema dos revendedores que se negam a comercializar alimentos orgânicos, uma vez que não percebem valor em pagar mais por produtos saudáveis em comparação aos industrializados. Pois acreditam que o aumento do preço de determinados produtos geraria rejeição por parte dos clientes, resultando na não conclusão da venda.

## Pesquisa

Dado que a pesquisa foi conduzida de maneira aleatória, tornou-se fundamental identificar o sexo dos entrevistados, com o intuito de verificar a predominância de homens ou mulheres no referido grupo. No que tange aos aspectos relacionados ao consumo, foi solicitado aos participantes que expressassem seu nível de conhecimento acerca dos alimentos orgânicos.

Observa-se que a maioria dos respondentes é composta por mulheres, correspondendo a 59% do total de consumidores

entrevistados, enquanto os homens representam 41%. Esse desequilíbrio na amostra pode sugerir uma maior inclinação das mulheres em relação ao consumo de alimentos orgânicos, evidenciando um possível padrão de comportamento mais atento à saúde, bem-estar e sustentabilidade do meio ambiente por parte do público feminino.

Foi representada a distribuição percentual por faixa etária, revela que a maioria dos respondentes está na faixa etária de 31 a 40 anos (33%), seguida pela faixa de 20 a 30 anos (29%). Isso sugere que adultos jovens e de meia-idade demonstram maior interesse ou conscientização sobre o consumo de alimentos orgânicos. Observa-se ainda que 13% pertencem à faixa de 41 a 50 anos e 10% entre 51 e 60 anos, enquanto as faixas extremas têm menor representatividade: 12% abaixo de 20 anos e 3% acima de 60. Esses dados indicam que o consumo de orgânicos é mais expressivo entre indivíduos em idade produtiva, possivelmente devido a maior poder aquisitivo, acesso à informação e preocupação com saúde e bem-estar. A baixa participação de faixas mais jovens e idosas pode refletir menor acessibilidade ou diferentes prioridades, o que é essencial para orientar ações de conscientização e estratégias de marketing direcionadas.

A pesquisa demonstrou que 93% dos respondentes têm conhecimento sobre o que é um alimento orgânico, enquanto 7% afirmam não saber. Essa alta taxa de familiaridade indica que a maioria dos consumidores já foi exposta a informações sobre o tema, o que pode refletir um maior interesse ou conscientização sobre os benefícios dos produtos orgânicos. O conhecimento difundido entre os participantes sugere um potencial mercado receptivo para o aumento do consumo desses alimentos, já que grande parte da população demonstra estar informada. No entanto, a presença de 7% que desconhecem o conceito evidencia a necessidade de campanhas informativas mais direcionadas a grupos específicos, para aumentar a

compreensão e, conseqüentemente, o acesso a esses produtos. Esse cenário é positivo para o desenvolvimento de estratégias de promoção dos alimentos orgânicos, especialmente em políticas de consumo sustentável.

A definição de alimentos orgânicos revela-se um tema complexo e multifacetado. Os dados obtidos indicam que 52% dos respondentes associam esses produtos à ausência de agrotóxicos, evidenciando uma preocupação primordial com a segurança alimentar e a saúde pública. Ademais, 24% consideram a naturalidade dos alimentos como um critério determinante, ressaltando a valorização das características intrínsecas e não processadas. Por outro lado, apenas 15% reconhecem que práticas que minimizam o impacto ambiental são relevantes para a definição de alimentos orgânicos, sugerindo uma compreensão mais restrita das práticas agrícolas sustentáveis. A baixa adesão a critérios como isenção de adubação química (7%) e hormônios (2%) reforça essa tendência. A total ausência de menções a alimentos geneticamente modificados (0%) destaca uma aversão generalizada a esses produtos. Este panorama evidencia a necessidade de uma comunicação mais clara sobre os princípios que regem a produção de alimentos orgânicos, visando um entendimento mais abrangente entre os consumidores.

As evidências relatadas acerca das fontes de conhecimento sobre alimentos orgânicos evidenciam uma ampla variedade de referências. Notavelmente, 35% dos entrevistados identificaram escolas, estudos e palestras como os principais canais de conscientização, indicando a importância da educação, tanto formal quanto informal, na difusão desse conhecimento. Em segundo plano, 25% mencionaram a internet como uma fonte significativa, ressaltando o papel cada vez mais relevante das plataformas digitais na busca por informações sobre alimentação saudável. Adicionalmente, 22% dos entrevistados identificaram veículos de mídia tradicionais, como TV, rádio, jornais e revistas, como fontes relevantes

de informação sobre alimentos orgânicos.

Em contraste, apenas 15% afirmaram ter recebido esse conhecimento por meio de amigos e familiares, evidenciando que as relações pessoais têm um papel secundário nesse contexto. Por fim, é preocupante que 3% dos participantes relataram não ter conhecimento sobre o tema, indicando a necessidade de ampliar as estratégias de informação e educação sobre alimentos orgânicos na sociedade. Esses resultados ressaltam a importância de múltiplas fontes na formação da consciência sobre a alimentação orgânica e a necessidade de uma abordagem mais abrangente para disseminar essa informação.

Os resultados do consumo de alimentos orgânicos revelam uma tendência significativa, com 71% dos entrevistados afirmando que consomem tais produtos. Esse elevado percentual indica uma crescente conscientização sobre os benefícios da alimentação saudável e sustentável. Em contrapartida, 29% dos respondentes relataram não consumir alimentos orgânicos, o que pode sugerir obstáculos como custo, disponibilidade ou falta de informação. Esses dados sublinham a necessidade de iniciativas que promovam a educação e o acesso a alimentos orgânicos, visando ampliar a adesão a práticas alimentares benéficas à saúde.

Os motivos pelos quais os entrevistados afirmam não consumir alimentos orgânicos estão distribuídos de maneira variada. A maioria, representando 59%, indicou que consome alimentos orgânicos, revelando uma forte adesão ao consumo desse tipo de produto. Entre aqueles que não os consomem, 21% mencionaram o maior custo em relação aos alimentos convencionais como a principal barreira. Esse dado sugere que o fator econômico é um dos principais entraves à popularização dos orgânicos.

Além disso, 10% dos respondentes apontaram a falta de variedade de alimentos orgânicos disponíveis como motivo para não consumi-los, o que pode estar relacionado à dificuldade de encontrar



uma ampla gama de produtos orgânicos no mercado. Por outro lado, 7% dos entrevistados alegaram desconhecer os benefícios desses alimentos, indicando a necessidade de campanhas informativas para educar os consumidores sobre as vantagens dos produtos orgânicos. Apenas 3% dos participantes relataram não consumir alimentos orgânicos por outros fatores.

Esses resultados evidenciam que, embora uma parte significativa dos consumidores já adote produtos orgânicos em sua alimentação, questões como custo elevado, variedade limitada e falta de informação ainda são barreiras relevantes que precisam ser enfrentadas para ampliar o acesso e o consumo desses alimentos.

Entre os participantes da pesquisa, 15% declararam consumir exclusivamente frutas, enquanto 36% relataram o consumo apenas de hortaliças. Além disso, 23% dos entrevistados indicaram que incluem tanto hortaliças quanto frutas em sua dieta. Em contrapartida, 26% dos respondentes afirmaram não consumir nenhum desses alimentos. Esses dados revelam que uma parte significativa da população entrevistada incorpora hortaliças em sua alimentação, embora também exista uma parcela considerável que não consome esses itens.

As principais motivações para o consumo de determinados alimentos são lideradas pela preocupação com a saúde e pela percepção de que são mais saudáveis, ambas mencionadas por 39% dos entrevistados. Em seguida, 7% dos participantes classificaram esses alimentos como mais saborosos, enquanto 5% os consideraram mais nutritivos. Apenas 4% indicaram a preocupação com o meio ambiente como um fator influente, e 6% afirmaram que não consomem esses alimentos. Nenhum dos entrevistados citou a maior durabilidade como uma razão para o consumo. Esses resultados mostram que o bem-estar pessoal, representado pela saúde, é o principal motivador, enquanto fatores ambientais e nutricionais têm menor peso nas decisões dos consumidores.

Os resultados mostram que 30% dos entrevistados consomem alimentos orgânicos raramente, seguidos por 25% que os consomem até três vezes por semana. Em seguida, 21% afirmaram consumi-los diariamente. Já 18% dos participantes indicaram que consomem esses alimentos uma vez por semana, enquanto 3% disseram fazê-lo uma vez por mês. Por fim, 3% dos entrevistados relataram que nunca consomem alimentos orgânicos. Esses resultados revelam uma predominância de consumo ocasional entre os entrevistados, embora uma parte significativa também consuma regularmente.

Os dados revelam que a maioria dos entrevistados, 43%, adquire alimentos orgânicos em feiras, tornando essa a opção mais popular. Em segundo lugar, 29% dos participantes afirmaram comprar esses alimentos em supermercados. Já 19% disseram que obtêm alimentos orgânicos de hortas comunitárias, enquanto 9% optam por outras fontes de aquisição. Esses resultados indicam que as feiras são o principal local de compra para alimentos orgânicos, seguidas pelos supermercados, com hortas comunitárias como uma opção significativa para uma parte da população.

Os dados mostram que a maioria dos entrevistados, 42%, confere o selo de certificação no rótulo da embalagem como o principal método para garantir a organicidade dos alimentos. Em seguida, 29% afirmaram confiar na palavra do vendedor, enquanto 20% consideraram o local de compra como certificado ou autorizado. Por último, apenas 9% dos participantes avaliaram a aparência do alimento como um critério para determinar se ele é orgânico. Esses resultados indicam que a certificação oficial, representada pelo selo, é o critério mais confiável para os consumidores, superando amplamente outras formas de validação.

A grande maioria dos entrevistados, 96%, afirmou que consumiria ou aumentaria o consumo de alimentos orgânicos se o valor de aquisição fosse igual ao dos alimentos convencionais. Apenas 4% disseram que não mudariam seus hábitos de consumo

mesmo com a equivalência de preços. Esses dados indicam que o fator econômico é uma barreira significativa para o maior consumo de alimentos orgânicos, e que a redução de preços poderia impulsionar consideravelmente a demanda por esses produtos.

De acordo com a pesquisa, 81% dos entrevistados afirmaram nunca ter participado de uma feira ou evento voltado para alimentos orgânicos, enquanto apenas 19% relataram já ter participado de tais iniciativas. Esses números sugerem que, embora o interesse por alimentos orgânicos esteja crescendo, a participação em eventos específicos ainda é limitada para a maioria das pessoas.

Uma possível explicação para essa baixa participação pode estar relacionada à falta de acessibilidade ou divulgação desses eventos, que muitas vezes são realizados em locais específicos e podem não ser amplamente promovidos. Além disso, fatores como a localização geográfica, a disponibilidade de tempo, e até a falta de conhecimento sobre a existência dessas feiras podem influenciar esse resultado.

Por outro lado, os 19% que participaram desses eventos provavelmente possuem maior interesse em conhecer a origem dos alimentos que consomem e em apoiar práticas sustentáveis. Esses eventos podem servir como uma plataforma para educar os consumidores e promover o consumo de produtos orgânicos. Assim, o aumento na realização e divulgação dessas feiras poderia ser uma estratégia eficaz para ampliar o acesso e o consumo de alimentos orgânicos, além de atrair um público maior para esse tipo de mercado.

### **Estabelecimentos**

Após a realização do levantamento sobre a oferta de alimentos orgânicos em Palmas/TO, foram identificados que esses dados indicam que a cidade possui uma oferta específica e diversificada de

pontos de venda de alimentos orgânicos. No entanto, comenta-se que a distribuição desses produtos é desigual, com maior concentração em áreas centrais, o que pode limitar o acesso de consumidores que residem em regiões periféricas. Além disso, foi possível verificar que somente os grandes supermercados oferecem uma variedade de produtos orgânicos, enquanto os menores oferecem uma variedade restrita, que muitas vezes limitada a frutas, legumes e verduras. Já os restaurantes com opções orgânicas costumam atender um público mais específico, focando em consumidores que buscam uma alimentação saudável e diferenciada. As feiras orgânicas, por sua vez, têm um papel fundamental na promoção de alimentos frescos e de qualidade, além de permitir um contato direto entre os produtores locais e os consumidores.

Os resultados sugerem que, embora Palmas-TO tenha uma oferta significativa de alimentos orgânicos, o mercado ainda está em fase de expansão, especialmente em termos de variedade e acessibilidade. A alta concentração de estabelecimentos que oferecem esses produtos em determinadas áreas pode ser um obstáculo para o aumento do consumo em massa. O perfil dos consumidores que frequentam restaurantes com opções orgânicas ou compram em feiras tende a ser composto por pessoas com maior poder aquisitivo ou maior nível de conscientização sobre os benefícios dos orgânicos.

Esse cenário indica uma oportunidade de crescimento tanto para a oferta quanto para a demanda. Ao melhorar a disponibilidade de produtos orgânicos em diferentes tipos de estabelecimentos e em diferentes regiões da cidade, é possível ampliar o alcance desses produtos, tornando-os mais acessíveis para uma parcela maior da população. Os dados levantados são fundamentais para compreender o panorama atual da oferta de produtos orgânicos em Palmas-TO e podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para resolver os problemas relacionados à baixa penetração desses produtos em áreas

periféricas.

Uma das soluções pode ser a criação de incentivos fiscais ou programas de apoio a pequenos produtores, possibilitando a ampliação das feiras orgânicas e a inclusão de uma maior variedade de produtos nos supermercados. Além disso, campanhas de conscientização podem ser realizadas para educar os consumidores sobre os benefícios do consumo de produtos orgânicos, ajudando a aumentar a demanda e estimular o mercado.

Outra solução seria facilitar o acesso possível a produtos orgânicos por meio de parcerias entre produtores e grandes redes de supermercados, promovendo uma redução nos custos de distribuição e venda desses produtos. Isso pode ajudar a resolver o problema da percepção de que alimentos orgânicos são inacessíveis financeiramente para a maioria da população.

Ao longo da pesquisa, foram identificados diversos fatores que influenciam a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas-TO. A maioria dos consumidores está ciente dos benefícios desses produtos, principalmente no que diz respeito à saúde e à sustentabilidade ambiental. No entanto, barreiras significativas como o preço elevado, a falta de variedade de produtos e a acessibilidade limitada foram citadas como os principais motivos que desestimulam o consumo regular.

Os consumidores associam fortemente os alimentos orgânicos a uma vida mais saudável, livre de agrotóxicos e produtos químicos. A saúde é o fator mais citado para justificar a compra desses alimentos. Muitos consumidores demonstram preocupação com o impacto ambiental da agricultura convencional e veem os alimentos orgânicos como uma forma de contribuir para a preservação do meio ambiente.

O preço mais elevado dos alimentos orgânicos, em comparação com os convencionais, foi apontado como a principal barreira ao

consumo. Mesmo aqueles que reconhecem os benefícios dos orgânicos consideram o custo um impedimento significativo.

A oferta de alimentos orgânicos é vista como limitada, tanto em termos de variedade quanto de locais de venda. A maioria dos consumidores adquire esses produtos em feiras ou mercados especializados, o que restringe o acesso para uma parcela significativa da população.

A conscientização sobre os alimentos orgânicos é relativamente alta, mas ainda existe uma parcela dos consumidores que não compreende totalmente o que diferencia esses produtos dos convencionais. A educação e a disseminação de informações adequadas são aspectos fundamentais para aumentar o consumo.

Essas respostas refletem uma realidade complexa. Por um lado, há uma demanda crescente por alimentos mais saudáveis e sustentáveis, mas, por outro, fatores econômicos e estruturais limitam o acesso desses produtos a um público mais amplo. A predominância da saúde como motivação principal mostra que os consumidores estão cada vez mais preocupados com o bem-estar, e isso pode ser um ponto positivo para expandir o mercado de orgânicos. Contudo, o fato de o preço ser uma barreira significa que, para ampliar o consumo, é necessário trabalhar na redução de custos ou no aumento do poder de compra da população.

Além disso, a conscientização ambiental está presente, mas ainda de forma secundária em relação à saúde. Isso significa que os esforços de marketing e educação podem se beneficiar ao enfatizar tanto os benefícios individuais quanto os coletivos da produção orgânica.

Compreender os fatores que influenciam a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas-TO ajuda a mapear soluções possíveis para superar as barreiras identificadas. As respostas indicam que, embora a conscientização sobre os benefícios dos orgânicos seja alta, há uma necessidade urgente de tornar esses produtos mais acessíveis,

tanto economicamente quanto em termos de variedade e distribuição.

**Redução de custos e incentivos econômicos:** Políticas públicas que ofereçam incentivos fiscais ou subsídios para produtores orgânicos podem ajudar a reduzir os custos de produção, tornando os produtos mais acessíveis ao consumidor final. Programas que promovam a produção em larga escala ou cooperativas de pequenos produtores também podem ajudar a baratear os alimentos.

**Aumento da conscientização:** Campanhas de educação e conscientização podem esclarecer a população sobre os benefícios dos alimentos orgânicos, tanto para a saúde quanto para o meio ambiente. Essas campanhas podem ser promovidas em escolas, universidades e por meio de parcerias com o setor de saúde.

**Expansão dos canais de venda:** Estimular a venda de alimentos orgânicos em supermercados e lojas de conveniência pode aumentar o acesso a esses produtos. As feiras orgânicas já desempenham um papel importante, mas são limitadas geograficamente e em horários. Ampliar os pontos de venda tornaria os orgânicos mais acessíveis a uma parcela maior da população.

**Melhoria da logística de distribuição:** Investir na infraestrutura para a produção e distribuição de alimentos orgânicos é crucial. A falta de variedade é muitas vezes consequência de cadeias logísticas ineficientes. Melhorar essa estrutura pode aumentar a disponibilidade de diferentes produtos orgânicos no mercado.

**Principais dificuldades encontradas:**

**Custo elevado dos alimentos orgânicos:** Embora os consumidores reconheçam os benefícios dos orgânicos, o preço é o maior entrave para um consumo mais amplo. As técnicas de produção orgânica são mais caras, o que impacta diretamente o preço final dos produtos.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Isso também afeta a escalabilidade da produção, já que a demanda é limitada pela capacidade de compra da população.

**Baixa acessibilidade e variedade de produtos:** A limitação de locais onde os consumidores podem adquirir alimentos orgânicos, bem como a pouca diversidade de produtos, são dificuldades apontadas pelos entrevistados. A oferta concentrada em feiras e lojas especializadas restringe o público que pode acessar esses alimentos regularmente.

**Falta de incentivos governamentais:** A ausência de políticas claras de incentivo à produção e comercialização de orgânicos em grande escala é um desafio. Os produtores enfrentam dificuldades técnicas e financeiras, o que impede a redução dos preços e a ampliação da oferta.

**Informação e conscientização insuficientes:** Embora grande parte dos consumidores saiba o que são alimentos orgânicos, muitos ainda não entendem completamente seus benefícios em termos ambientais e sociais. Isso reflete uma necessidade de ampliação das iniciativas educativas, especialmente em populações de menor poder aquisitivo e com menor acesso à informação.

**Desafios na produção em larga escala:** Produzir alimentos orgânicos em grandes quantidades continua sendo um desafio devido à falta de insumos, mão de obra especializada e tecnologias adequadas. O modelo atual de produção orgânica ainda depende muito de métodos artesanais, o que encarece o processo e limita a capacidade de atender uma demanda maior.

### CONCLUSÃO

As respostas encontradas indicam que, embora o consumo de alimentos orgânicos em Palmas-TO esteja crescendo, há barreiras



significativas que limitam sua expansão. A saúde e a sustentabilidade são as principais motivações para o consumo, mas o custo elevado, a falta de variedade e a dificuldade de acesso são entraves que precisam ser superados.

Para resolver o problema, será necessário um esforço conjunto entre governo, produtores e varejistas para tornar os alimentos orgânicos mais acessíveis e atrativos. Investir em políticas públicas que incentivem a produção em larga escala, melhorar a logística de distribuição e ampliar a conscientização da população são passos essenciais para promover uma mudança significativa no consumo de orgânicos em Palmas-TO.

Dessa forma, a pesquisa contribui para a compreensão das barreiras e motivações que envolvem o consumo de orgânicos e aponta caminhos para o desenvolvimento sustentável desse mercado na região, beneficiando tanto os consumidores quanto o meio ambiente.

O estudo sobre os fatores de relevância para a decisão de compra de alimentos orgânicos em Palmas-TO revelou diversas barreiras e motivações que influenciam o comportamento do consumidor local. Apesar do crescente interesse e conscientização sobre os benefícios dos alimentos orgânicos, especialmente no que tange à saúde e à sustentabilidade ambiental, há desafios significativos que limitam a expansão deste mercado.

Os resultados indicam que o alto custo dos alimentos orgânicos é a principal barreira para a adoção mais ampla desses produtos. Embora os consumidores reconheçam as vantagens dos orgânicos, muitos são dissuadidos pelo preço elevado, que é influenciado pelas técnicas de produção mais caras e pela falta de incentivos governamentais. A acessibilidade e a variedade limitadas também se destacam como obstáculos importantes. A oferta de produtos orgânicos em Palmas-TO é frequentemente restrita a feiras específicas

e supermercados de grande porte, o que dificulta o acesso para uma parcela significativa da população.

Além disso, a pesquisa apontou que a conscientização sobre o que diferencia os alimentos orgânicos dos convencionais ainda precisa ser aprimorada. Embora a maioria dos consumidores tenha algum conhecimento sobre o tema, há uma parcela que não compreende totalmente os benefícios ambientais e sociais dos produtos orgânicos. Isso sugere a necessidade de campanhas educativas mais abrangentes e eficazes.

Para superar essas barreiras, é crucial um esforço conjunto entre governo, produtores e varejistas. Políticas públicas que ofereçam incentivos fiscais ou subsídios para produtores orgânicos podem ajudar a reduzir os custos de produção, tornando os produtos mais acessíveis ao consumidor final. Além disso, a expansão dos canais de venda e a melhoria da logística de distribuição são fundamentais para aumentar a disponibilidade e a variedade de produtos orgânicos no mercado.

Campanhas de educação e conscientização devem ser promovidas para esclarecer a população sobre os benefícios dos alimentos orgânicos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente. Essas campanhas podem ser realizadas em escolas, universidades e por meio de parcerias com o setor de saúde.

Em suma, a pesquisa contribui para a compreensão das dinâmicas de consumo de alimentos orgânicos em Palmas-TO, oferecendo insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias que promovam a sustentabilidade e a saúde pública. Ao abordar as barreiras identificadas e implementar as estratégias sugeridas, é possível fomentar um mercado de alimentos orgânicos mais robusto e acessível, beneficiando tanto os consumidores quanto o meio ambiente.

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Disponível em: . Acesso em: 10 conjuntos. 2023.<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. IBGE, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br>

## ANEXOS

### **Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003**

Esta lei regulamenta a agricultura orgânica no Brasil e define os critérios de produção e certificação de produtos orgânicos. Foi utilizado como referência para identificar as exigências legais e os padrões de certificação dos alimentos orgânicos comercializados em Palmas-TO. Disponível em : <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>.

### **Mapa da cidade de Palmas-TO**

Utilizado para realizar o georreferenciamento dos estabelecimentos que comercializam alimentos orgânicos. A localização exata de supermercados, restaurantes e feiras orgânicas foi registrada utilizando este mapa. A base geoespacial foi extraída de fontes públicas de mapas digitais, como Google Maps.

### **Lista de estabelecimentos orgânicos cadastrados pela ADAPEC-TO**

Documento fornecido pela Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Tocantins (ADAPEC), contendo a relação dos estabelecimentos e feiras que comercializam produtos orgânicos certificados no estado. Utilizado para verificar a conformidade dos estabelecimentos visitados com os critérios de certificação.

### **Relação de feiras orgânicas em Palmas-TO**

Documento público da Secretaria de Agricultura de Palmas contendo uma lista oficial de feiras que promovem a venda de alimentos orgânicos na cidade. Esse anexo foi utilizado para identificar a localização e a frequência de funcionamento daquelas feiras, complementando a pesquisa de campo.

## APÊNDICES

### **Apêndice A: Questionário**

Este apêndice apresenta o questionário utilizado na pesquisa sobre os fatores relevantes para a decisão de compra de alimentos

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

orgânicos. O questionário foi aplicado a 182 entrevistados e incluiu um levantamento demográfico, além de questões sobre o conhecimento relacionado ao tema, o consumo de alimentos orgânicos, as motivações para esse consumo, os métodos de compra, os impactos do preço e a participação em eventos. Assim, por meio da pesquisa, é possível identificar o interesse dos entrevistados em alimentos orgânicos, além de destacar os desafios relacionados ao custo e à disponibilidade desses produtos.

### 1. Sexo

- a) Feminino
- b) Masculino

### 2. Faixa etária:

- a) Menor de 20 anos
- b) 20 - 30 anos
- c) 31 - 40 anos
- d) 41 - 50 anos
- e) 51 - 60 anos
- f) Acima de 60 anos

### 3. Você sabe o que é alimento orgânico?

- a) Sim
- b) Não

### 4. O que você considera ser um alimento orgânico?

- a) Alimento natural
- b) Alimento livre de agrotóxicos
- c) Alimento isento de adubação química
- d) Alimento isento de hormônios
- e) Alimento cultivado com técnicas especiais com mínimo impacto sobre o ambiente
- f) Alimento hidropônico
- g) Alimento geneticamente modificado

### 5. Como tomou conhecimento sobre o

alimento orgânico? a) Veículos de mídia (TV, rádio, jornal, revista)

b) Internet

c) Amigos e familiares

d) Escolas / Estudos / Palestras

e) Não tenho conhecimento

6. Você consome alimentos orgânicos?

a) Sim

b) Não

7. Se não, qual o motivo?

a) Maior custo comparado com o alimento convencional b) Desconhece os benefícios

c) Pouca acessibilidade à compra (poucos locais com venda de orgânicos) d) Falta de opção de variados tipos de alimentos

e) Eu consumo

8. Se sim, quais são esses alimentos?

a) Hortaliças

b) Frutas

c) Hortaliças e frutas

d) Não consumo

9. Qual o motivo de consumir tais alimentos?

a) Preocupação com o meio ambiente

b) Preocupação com a saúde

c) São mais saudáveis

d) São mais saborosos

e) Possuem maior durabilidade

f) São mais nutritivos

g) Não consumo

10. Com qual frequência consome?

a) Diariamente

- b) Até 3 vezes por semana
- c) Uma vez por semana
- d) Uma vez por mês
- e) Raramente
- f) Nunca

11. Onde adquire tais alimentos?

- a) Supermercados
- b) Feiras
- c) Hortas comunitárias
- d) Outros

12. Como certificar se o alimento adquirido realmente é orgânico?

- a) Por meio do selo de certificação no rótulo da embalagem
- b) Local de compra é certificado / autorizado
- c) Confiança na palavra do vendedor
- d) Por meio da aparência do alimento

13. Você consumiria ou aumentaria o consumo de alimentos orgânicos se o valor de aquisição fosse igual aos alimentos convencionais?

- a) Sim
- b) Não

14. Você já participou de alguma feira ou evento de alimentos orgânicos?

- a) Sim
- b) Não

## Capítulo 2

### Prospecção da qualidade nutricional e tecnológica da semente de quiabo para produção de bebida

Maria Eduarda Spagnol

Caroline Roberta Freitas Pires

#### RESUMO

O quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench), originário da Etiópia e amplamente cultivado em regiões tropicais, é um ingrediente valorizado na culinária global e brasileira, no entanto, os estudos deste fruto concentram-se principalmente na matéria-prima verde como é habitualmente consumido, sendo pouca atenção dedicada ao aproveitamento de suas sementes. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar as características físico-químicas da farinha de semente de quiabo torrada, e a influência do método de extração nos teores de pH, compostos fenólicos e capacidade antioxidante de bebidas advindas desta farinha. As sementes de quiabo foram processadas para obtenção da farinha torrada e em seguida foi utilizada para obtenção das bebidas considerando três formas de extração: a) água fervente passada pela farinha em um filtro; b) contato entre farinha e água fervente por 2 minutos seguida de filtração e c) contato entre farinha e água fria por 2 minutos e posterior filtração. A farinha de semente de quiabo torrada apresentou baixos teores de umidade e elevados teores de fibra bruta, além de uma coloração escura semelhante ao café torrado. O método de obtenção das bebidas influenciou os valores de pH, o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante, sendo que a fervura da farinha de semente de quiabo torrada por 2 minutos contribuiu para a maior extração de compostos fenólicos e maior sequestro do radical DPPH. Esses achados fornecem informações relevantes sobre as propriedades físico-químicas da farinha de semente de quiabo e a atividade antioxidante e compostos fenólicos de suas bebidas, e destacam seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios com características nutricionais e funcionais aprimoradas.

**Palavras-chave:** Resíduos alimentares, Quiabo, Antioxidantes.

---

<sup>1</sup> Graduanda em Nutrição, Pibic/UFT, Universidade Federal do Tocantins,

maria.spagnol@mail.uft.edu.br

<sup>2</sup> Doutora em Ciência dos Alimentos, Curso de Nutrição, Universidade Federal do Tocantins, carolinerfpires@mail,uft.edu.br.

## INTRODUÇÃO

O quiabo, originário da região da Etiópia, na África, e com registros iniciais no Sul dos Estados Unidos em 1850, desempenha um papel fundamental na culinária global, inclusive no Brasil (Minami *et al.*, 1997).

Presente em pratos tradicionais como o Caruru na Bahia e o clássico frango caipira com quiabo em Minas Gerais, sua utilização reflete a versatilidade e o valor culinário desse ingrediente em diversas culturas (Lana *et al.*, 2016).

Cientificamente denominado *Abelmoschus esculentus* L. Moench, este fruto pertencente à família Malvaceae é amplamente cultivado em regiões tropicais, com destaque para o Brasil, que oferece condições ideais para seu desenvolvimento, especialmente nas regiões nordeste e sudeste (Silva *et al.*, 2022).

Sua presença nessas áreas, devido ao ciclo rápido, baixo custo de produção e resistência a pragas, representa uma fonte de renda significativa para pequenos agricultores (Silva *et al.*, 2022).

Em relação às características morfológicas, o quiabeiro pode atingir entre 0,5 m e 3 m de altura, com folhas medindo de 10 a 25 cm de comprimento, apresentando pecíolos longos e formato orbicular-ovado, muitas vezes ásperas e com pelos, já em relação as flores, são axilares e solitárias, possuem coloração branca e amarelada, com diâmetro de 4 a 8 cm. O fruto, de cor verde e formato alongado, varia de 10 a 25 cm de comprimento, com sementes arredondadas enfileiradas em seu interior (Roy; Shrivastava; Mandal, 2014).

As sementes, posuem um tamanho médio de 5 mm e pesam cerca de 6,8 gramas por 100 unidades, cada fruto pode conter até 60 sementes, resultando em aproximadamente 9.500 sementes por litro de quiabo (Minami *et al.*, 1997).



O quiabeiro não se limita apenas ao fruto comestível, pois outras partes da planta, como folhas, raízes e sementes, também têm diversos usos (Petropoulos *et al.*, 2017).

Diante disso, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a composição nutricional da semente de quiabo torrada e utilizá-la na produção de uma bebida.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Obtenção da matéria prima

Os quiabos secos foram adquiridos em hortas da cidade de Estrela do Indaiá - MG. Para a obtenção das sementes, os frutos foram cortados com faca de inox e as sementes separadas, sendo posteriormente acondicionadas em embalagens laminadas e armazenadas em local fresco, arejado e na ausência de luminosidade.

### Obtenção da farinha da semente de quiabo

As sementes foram sanitizadas, secas e posteriormente torradas, trituradas em um moinho de facas e em seguida peneiradas.

### Elaboração da bebida

Para a elaboração das bebidas, a amostra foi submetida a diferentes tratamentos, sendo o primeiro a passagem por água fervente no coador, o segundo a imersão em água fervente por 2 minutos seguida de filtração, e a terceira houve a mistura com água gelada em um copo por 2 minutos antes da filtração. Todas as bebidas foram preparadas com 40 ml de água e 2,4 gramas de amostra.

### Caracterização físico-química da farinha de semente de quiabo

Para determinar a umidade, as cápsulas com a amostra foram levadas à estufa a 105°C até atingirem peso constante. O peso final das cápsulas com a amostra seca foi obtido e a diferença entre o peso final e o peso inicial correspondeu ao valor da umidade da amostra (AOAC, 2000). Para determinação do extrato etéreo da amostra, foi utilizado o aparelho de "Soxhlet" e como solvente o hexano (AOAC, 2000). Já para determinação de proteína a amostra foi digerida e posteriormente destilada no aparelho de "Kjeldahl" sendo finalmente titulada com HCl. O teor de nitrogênio da amostra foi calculado, convertendo-o para proteína, através do fator de 6,25 (AOAC, 2000). Para a determinação de fibras, foi utilizado o método gravimétrico segundo Kamer e Ginkel (1952). O teor

de cinzas foi determinado por incineração da amostra em um forno tipo mufla a 550°C (AOAC, 2000). A fração glicídica das amostras foi determinada pela diferença, segundo a equação:  $\% \text{ FG} = 100 - [\% \text{ umidade} + \% \text{ extrato etéreo} + \% \text{ proteína} + \% \text{ fração de cinzas}]$  considerando a matéria integral.

### Determinação do pH

O pH das bebidas da farinha de semente de quiabo foi determinado utilizando um potenciômetro digital segundo a técnica da AOAC (1992).

### Determinação de cor

Para a determinação da cor da farinha da semente de quiabo, foi utilizado um colorímetro digital (Minolta CR4000) com fonte de luz D65 e sistema de cor Lab\* do sistema CIE Lab\*.

## Análise da atividade antioxidante

### Determinação da atividade antioxidante por DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante total pelo método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi adicionado 0,1 mL de amostra a 3,9 mL de solução de DPPH, segundo metodologia proposta por Rufino et al. (2007). As leituras foram realizadas após 120 minutos, em espectrofotômetro a 515 nm, sendo os resultados obtidos de acordo com a equação 1:

Equação 1:

$$\%SRL = (Ac - Am) \times 100 / Ac$$

Em que;

Ac = absorbância  
do controle Am =  
absorbância da  
amostra

### Compostos Fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada pelo método proposto por Waterhouse (2002), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da equação da reta obtida da curva padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g da amostra (mg EAG.100g<sup>-1</sup>).

## Análise estatística

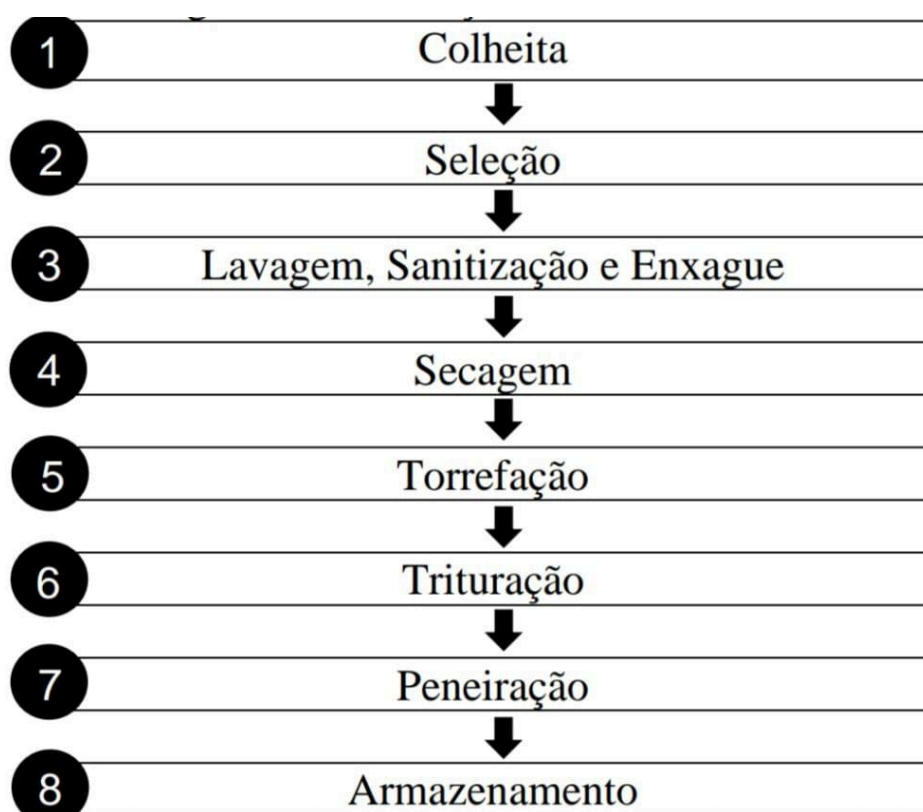
Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa SISVAR, no qual os resultados obtidos foram submetidos à análise de

variância e o teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias (Ferreira *et al.*, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processamento para obtenção da farinha da semente de quiabo está apresentado no fluxograma da figura 1, sendo descrito desde a sua chegada até seu armazenamento para análises.

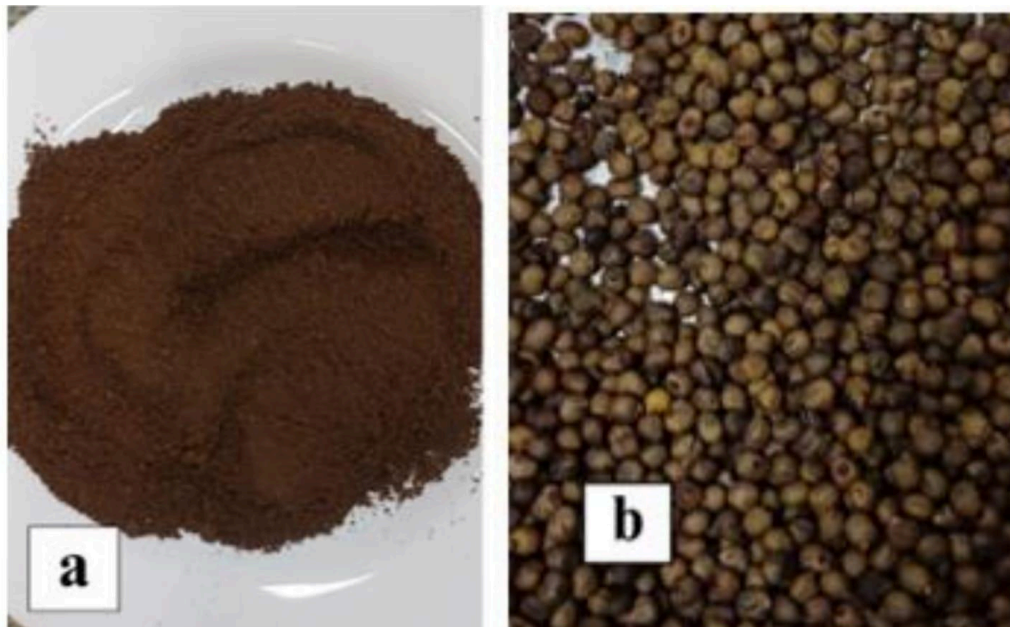
Figura 1 - Fluxograma de obtenção da farinha da semente de quiabo



Fonte: Autor (2024).

A figura 02 apresenta a fotografia da farinha da semente de quiabo e da semente de quiabo

Figura 02- Fotografia da farinha e da semente de quiabo torrada



Fonte: Autor (2024). Legenda: a) Farinha da semente do quiabo; b) Semente do quiabo sem triturar

Os valores médios dos percentuais da composição nutricional da farinha da semente de quiabo estão expressos nas tabelas 01

Tabela 01- Composição nutricional da farinha de semente de quiabo torrada

<b>Composição nutricional</b>	<b>Farinha da semente de quiabo</b>
<b>Umidade</b>	0,36±0,01
<b>Lipídios</b>	17,5±0,56
<b>Proteína</b>	20,7±2,75
<b>Cinzas</b>	4,91±0,01
<b>Fibras</b>	38,1±1,46
<b>Carboidratos</b>	18,33±3,66

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Fonte: Autor (2024). Legenda: Os resultados estão expressos na forma de média e  $\pm$  desvio padrão

A farinha da semente de quiabo torrada apresentou um teor médio de umidade de 0,36%, estando dentro da conformidade com a legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que conforme consta na RDC nº 263/2005 que aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, o teor máximo de umidade de farinhas obtidas de partes comestíveis de frutos é de 15% (BRASIL, 2005).

Em relação aos lipídios, observou-se um teor 17,5%. Já para proteínas foi encontrado um valor médio de 20,7%, e para cinzas foi observado um valor médio de 34,91%, já para fibra bruta foi encontrado um valor médio de 38,1%.

De acordo com Adelakun e Oyelade (2011), a farinha de semente de quiabo torrada apresentou um teor de proteínas de 30,3% e fibras de 9,47%. Cabe destacar que variações no solo, no clima, nas cultivares e na adubação interferem diretamente nas características nutricionais dos frutos.

A tabela 02 apresenta os valores médios dos parâmetros colorimétricos das bebidas advindas da farinha de semente de quiabo torrada.

Tabela 02 – Valores médios da análise de coloração das amostras de farinha de semente de quiabo torrada

<b>Parâmetros Colorimétricos</b>	<b>Farinha de semente de quiabo torrada</b>
<b>L*</b>	40,88 $\pm$ 0,25
<b>a*</b>	5,16 $\pm$ 0,67
<b>b*</b>	3,81 $\pm$ 0,29
<b>C</b>	6,41 $\pm$ 0,64
<b>H</b>	36,53 $\pm$ 3,20

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

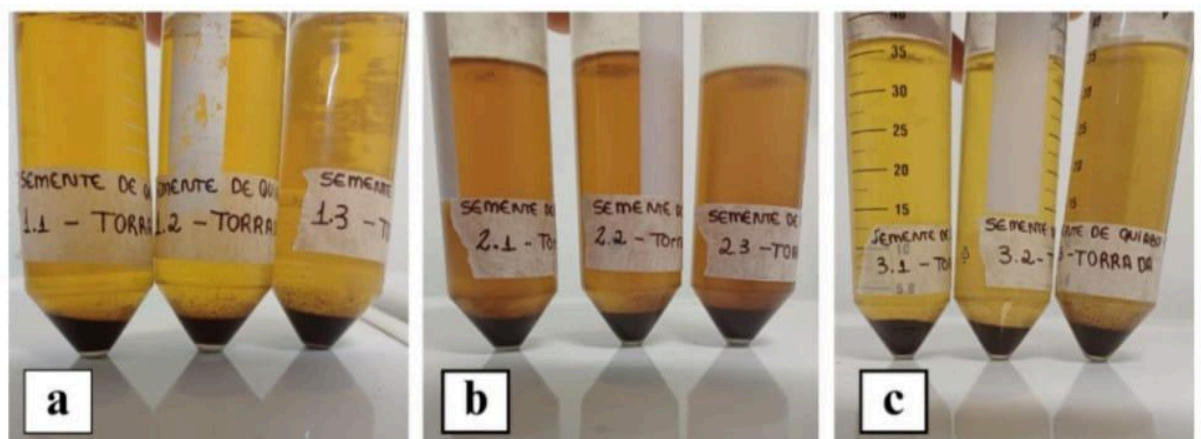
---

Fonte: Autor (2024). Legenda: Os resultados estão expressos na forma de média e  $\pm$  desvio padrão

Com relação aos valores de luminosidade observa-se que a farinha torrada apresentou um valor de  $L^*$  de 40,88, indicando uma coloração mais escura, visto que para esta variável, há uma variação de 0 (preto) a 100 (branco), e indica que quanto menor o número, mais escura é a amostra. Já em relação à variável  $a^*$ , que indica a tendência para o vermelho ou verde, a amostra apresentou um valor de 5,16, se direcionando para o vermelho, porém com menor intensidade. Foi encontrado um valor de croma de 6,41 e para o ângulo hue um valor de 36,53.

A figuras 03 mostra as fotografias das bebidas preparadas com farinha de semente de quiabo.

Figura 03- Bebida obtida da farinha de semente de quiabo submetida a diferentes tratamentos.



Fonte: Autor (2024). Legenda: a) Bebida obtida pela passagem por água fervente no coador; b) Bebida obtida por imersão em água fervente por 2 minutos seguida de filtração; c) mistura com água gelada em um copo por 2 minutos antes da filtração

Pela figura 03 observa-se que as amostras obtidas pela fervura em água quente por 2 minutos apresentaram uma coloração mais escura quando comparada às demais amostras, tendendo ao caramelo claro. Já as amostras submetidas à extração com água fria apresentaram uma coloração mais clara tendendo ao amarelo claro.

A tabela 03 apresenta os valores médios da análise de pH de amostras de bebidas obtidas da farinha de semente de quiabo.

Tabela 03 - Valores médios de pH de amostras de bebidas obtidas da farinha de semente de quiabo

Amostras	Extração com filtração	Extração com amostra na água fervente	Extração com água gelada
Farinha de semente de quiabo	5,69 <sup>b</sup> ±0,04	5,66 <sup>b</sup> ±0,03	6,30 <sup>a</sup> ±0,05

Fonte: Autor (2024). Legenda: Os resultados estão expressos na forma de média e  $\pm$  desvio padrão

A análise dos valores de pH das bebidas obtidas da farinha da semente de quiabo não mostrou diferença estatística significativa entre os tratamentos com água quente, já a amostra da bebida obtida com água fria apresentou um valor médio significativamente superior (6,30).

Ao fazer uma comparação com a bebida café, percebe-se que os valores para as bebidas advindas da farinha de quiabo torrada apresentam valores maiores aos considerados bons, já que de acordo com Siqueira et al. (2006) o pH ideal para uma bebida de café agradável ao paladar deve estar na faixa de 4,95 a 5,20.

As tabelas 04 e 05 apresentam os valores médios da avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos de amostras de bebidas obtidas da farinha de quiabo torrada.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Tabela 04 – Valores médios da avaliação da atividade antioxidante DPPH (%SRL) de amostras de bebidas obtidas da farinha de semente de quiabo torrada.

Análises	Extração com filtração	Extração com amostra na água fervente	Extração com água gelada
Farinha de semente de quiabo	56,45 <sup>b</sup> ±2,67	88,31 <sup>a</sup> ±2,55	38,36 <sup>c</sup> ±2,47

Fonte: Autor (2024). Legenda: Os resultados estão expressos na forma de média e  $\pm$  desvio padrão

De acordo com os resultados obtidos para a avaliação da atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH expresso em percentual de sequestro de radicais livres, observou-se que houve diferença estatística significativa entre todos os tratamentos, sendo que a maior atividade antioxidante

foi verificada nas amostras submetidas à fervura por 2 minutos e em seguida filtradas, registrando um percentual de sequestro de radicais livres de 88,31%. Os menores valores médios foram encontrados para as amostras obtidas pelo contato com a água fria, podendo inferir que a água quente potencializa a extração dos compostos com atividade antioxidante.

Hafeez (2020) avaliou a atividade sequestradora de radicais livres de extratos aquosos de sementes de *A. esculentus* e encontraram um percentual de sequestro do radical DDPH de 46,1%.

Tabela 05 – Valores médios de teor de compostos fenólicos (mg de ácido gálico/100ml) de amostras de bebidas obtidas da farinha de semente de quiabo torrada.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Análises	Extração com filtração	Extração com amostra na água fervente	Extração com água gelada
Farinha de semente de quiabo	10,34 <sup>b</sup> ±0,86	18,82 <sup>a</sup> ±1,04	7,68 <sup>c</sup> ±0,36

Fonte: Autor (2024). Legenda: Os resultados estão expressos na forma de média e  $\pm$  desvio padrão

Comportamento semelhante foi observado quando foi avaliado o teor de compostos fenólicos das amostras, visto que as bebidas obtidas por extração à quente apresentaram valores médios significativamente superiores à bebida advinda da extração à frio, sendo que o maior valor foi encontrado para a amostra colocada na água fervente por 2 minutos apresentando 18,82 mg EAG. 100g<sup>-1</sup>.

Bonigou (2018) avaliou o teor de compostos fenólicos de extratos hidroetanólicos de *Abelmoschus esculentus* L. e registraram uma variação entre 20,21 a 25,51 mg EAG/100 mg, no entanto, cabe destacar que fatores como cultivares, partes do fruto, estágio de maturação, adubação, clima, tipo de solo e tipo de extração podem interferir diretamente nos teores de compostos fenólicos.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A farinha de semente de quiabo torrada apresentou baixos teores de umidade e elevados teores de fibra bruta, além de uma coloração escura.

O método de obtenção das bebidas influenciou os valores de pH, o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.

A fervura da farinha de semente de quiabo torrada por 2 minutos contribuiu para a maior extração de compostos fenólicos e maior sequestro do radical DPPH.

Estes resultados fornecem informações relevantes sobre as características físico-químicas da farinha de semente de quiabo torrada, contribuindo para o desenvolvimento de produtos com maior valor nutricional e funcional.

As bebidas advindas da farinha de semente de quiabo torrada podem ser uma alternativa à tradicional bebida do café, no entanto, faz-se necessário mais estudos no que se refere aos compostos antinutricionais e também à sua qualidade sensorial.

## REFERÊNCIAS

ADELAKUN, Oluyemisi Elizabeth; OYELADE, Olusegun James. Potential use of okra seed (*Abelmoschus esculentus* moench) flour for food fortification and effects of processing. In: **Flour and breads and their fortification in health and disease prevention**. Academic Press, 2011. p. 205-212.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 18th ed. Washington, DC, 2000.

BOGNINOU G., Sophie Reine et al. Phytochemical composition and antioxydant capacity of *Abelmoschus esculentus* L. fresh immature fruits. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 223-227, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 263, de 22 de Setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE

BIOMETRIA. São Carlos, SP. Programa e Resumos... São Carlos: UFScar, p.235. 2000.

HAFAEEZ, Mamuna et al. Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Potential of *Abelmoschus esculentus*. **Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 5, n. 4, p. 69, 2020.

LANA, Milza Moreira et al. **Quiabo**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016.

MINAMI, Keigo et al. Cultura do quiabeiro: técnicas simples para hortaliça resistente ao calor. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1997. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/file/265/download?token=M-vxZQr8>. Acesso em: 29 out. 2023.

PETROPOULOS, Spyridon et al. The chemical composition, nutritional value and antimicrobial properties of *Abelmoschus esculentus* seeds. **Food & function**, v. 8, n. 12, p. 4733-4743, 2017.

RIBEIRO, Tassiano dos Santos. Estudo de validação de espécies vegetais da flora maranhense na terapêutica do câncer: análise química de *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench e *Senna alexandrina* Mill. 2019.

ROY, Anupam; SHRIVASTAVA, Shanker Lal; MANDAL, Santi M. Functional properties of Okra *Abelmoschus esculentus* L.(Moench): traditional claims and scientific evidences. **Plant science today**, v. 1, n. 3, p. 121-130, 2014.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical –Comunicado Técnico (INFOTECA-E), Fortaleza-CE, 2007.

SILVA, Micaelle Glícia dos Santos et al. Resposta fenológica do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L., malvaceae) cultivado em vasos com diferentes doses de matéria orgânica. *Diversitas Journal*, v. 7, n. 2, p 587 -594, 2022.

SIQUEIRA, H.H; ABREU, C.M.P. Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 112-117, 2006.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, v. 6, n. 1, 2002.

### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

## Capítulo 3

### Suplementação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com de Lemna sp. peletizadas

Peter Gaberz Kirschnik

Maria Lúcia Feitosa Gomes

Victória Silva Santos

Gabriela Benedetti

#### RESUMO

O presente estudo aborda a suplementação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com Lemna sp. peletizada, uma planta aquática de rápido crescimento e alto valor nutricional. A proposta surge da necessidade de explorar fontes alimentares sustentáveis e alternativas para aquacultura, reduzindo a dependência do pequeno produtor com a ração comercial. O problema reside no desafio de encontrar insumos que mantenham o desempenho zootécnico dos peixes e, ao mesmo tempo, sejam ambientalmente sustentáveis e economicamente viáveis. O método utilizado envolveu a criação de juvenis de tilápia em condições controladas, distribuídos em grupos com diferentes níveis de suplementação de Lemna sp. peletizada, em comparação com uma dieta convencional. Foram monitorados parâmetros de crescimento, como ganho de peso, taxa de conversão alimentar e sobrevivência. Os dados coletados foram analisados estatisticamente para verificar a significância das diferenças entre os grupos experimentais. Os resultados indicaram que a inclusão de Lemna sp. na dieta das tilápias juvenis não comprometeu seu desenvolvimento, apresentando desempenho estatisticamente semelhante ao grupo controle, que recebeu ração comercial. Além disso, observou-se uma potencial redução nos custos de produção, dada a viabilidade da produção de Lemna sp. em sistemas de cultivo integrados. Esses achados sugerem que a Lemna sp. pode ser uma alternativa promissora e sustentável para a alimentação de tilápias, contribuindo para a sustentabilidade da aquacultura.

**Palavras-Chave:** (Macrófita, desempenho, sustentabilidade, piscicultura)

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores mais dinâmicos da produção de alimentos no mundo, atingindo recordes de produção. Em 2020, a produção mundial de pescados e produtos aquícolas chegou a 214 milhões de toneladas, 60% a mais que a média registrada na década de 1990 (FAO, 2022). Esse crescimento exponencial tem sido impulsionado pelo uso de rações de alta qualidade e a intensificação dos sistemas de produção, que suprem as necessidades nutricionais dos peixes cultivados de forma mais eficiente. No Brasil, a aquicultura se expande rapidamente devido a suas condições climáticas favoráveis e a vasta disponibilidade de recursos hídricos. Em 2020, o país comercializou mais de 800 mil toneladas de peixes, destacando-se como um dos 15 maiores produtores do setor (Peixe BR, 2020).

No estado do Tocantins, onde a disponibilidade de recursos naturais favorece a prática da piscicultura, a produção de peixes tem mostrado um crescimento constante. Entre 2020 e 2021, o volume produzido aumentou em 9,76%, chegando a 16.250 toneladas (Seagro e Câmara Setorial da Piscicultura). No entanto, um dos maiores desafios para os piscicultores é o custo elevado da alimentação dos peixes, que pode representar entre 40% e 70% dos custos totais de produção, com a farinha de peixe sendo o componente mais caro das rações (Kubitza, 2000). Essa realidade força os produtores a buscarem alternativas que reduzam os custos sem comprometer o desempenho zootécnico dos peixes.

Nesse contexto, a utilização de plantas aquáticas como a *Lemna* sp. (família Lemnaceae) tem emergido como uma alternativa promissora. Conhecidas por serem as menores plantas vasculares do mundo, as lemnas se destacam não apenas por seu potencial de purificação de águas ricas em nutrientes, mas também pelo seu elevado valor nutricional. Elas possuem até 45% de proteína bruta na matéria seca, sendo uma fonte proteica atraente para a nutrição animal (Chakrabarti, 2018). Embora a quantidade de lipídeos seja relativamente baixa, cerca de 5,3%, o seu alto teor de proteínas e carboidratos as tornam uma excelente opção para substituir parcialmente a farinha de peixe nas dietas aquícolas (Graeff, 2007).

Estudos têm demonstrado que a inclusão de até 50% de *Lemna* desidratada na dieta de tilápias pode substituir a farinha de peixe sem comprometer o desempenho dos peixes (De Matos, 2014; Utami, 2018). Além disso, a oferta espontânea de *Lemna* fresca, uma estratégia que além de enriquecer o ambiente dos tanques, tem mostrado resultados positivos no desempenho

zootécnico, como observado por Cipriani (2020), que constatou que juvenis de tilápia do Nilo podem ingerir até 0,5% do seu peso vivo em Lemna sem prejudicar seu desenvolvimento.

Diante dos desafios enfrentados pelos piscicultores, o uso de Lemna sp. peletizada como suplemento alimentar para juvenis de tilápia do Nilo se apresenta como uma abordagem inovadora e sustentável, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental. A substituição parcial da farinha de peixe por uma planta aquática de fácil cultivo e alto valor proteico pode reduzir os custos de produção e contribuir para uma piscicultura mais acessível, especialmente para pequenos produtores. Além disso, a inclusão dessa planta pode colaborar para a preservação ambiental, uma vez que seu cultivo auxilia na remoção de poluentes dos corpos d'água. Assim, pesquisas que explorem o potencial da Lemna como parte da dieta aquícola são essenciais para fomentar a sustentabilidade do setor e garantir a continuidade do crescimento da piscicultura no Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar o impacto no desempenho de juvenis de tilápia do Nilo mediante a inclusão de diferentes níveis de Lemna sp. peletizadas na dieta.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a influência da suplementação com Lemna sp. processada na cor e composição bromatológica dos filés de juvenis de tilápia do Nilo.
- Desenvolver um método eficaz para peletizar Lemna sp., a fim de utilizá-la na alimentação de peixes.
- Investigar os efeitos do uso de lemna peletizada na dieta de juvenis de tilápia do Nilo, com foco no desempenho e eficiência alimentar.

## 3. Procedimento metodológico

### 3.1. Área de estudo e peixes

O trabalho foi realizado no Setor de Piscicultura do Campus II do



Centro Universitário Católica do Tocantins, localizado no município de Palmas – TO, na rodovia TO - 050. O trabalho contou com o apoio de uma equipe multidisciplinar compostas por pesquisadores e professores de várias Instituições de ensino e pesquisa como: professor do UniCatólica Me. Thiago Fontolan Tardivo; Pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Dra. Flávia Tavares de Matos. Todos os procedimentos de condução do presente projeto serão encaminhados para aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA.

O experimento foi conduzido em tanques-redes de 0,125 m<sup>3</sup> de volume útil, com medidas de 50cm de largura x 50cm de comprimento x 60cm de profundidade. Os tanques-rede foram dispostos dentro de um tanque elevado de ferro cimento com 30 m<sup>3</sup> de volume de água. O tanque conta com sistemas contínuos de aeração e de circulação fechada de água, com biofiltro individual de 3 m<sup>3</sup> de volume com função física e biológica sobre os dejetos produzidos durante o cultivo de peixes.

Os tanques de ferro cimento foram completamente drenados e expostos ao Sol por sete dias para vazio sanitário, como também manejados e limpos os filtros de decantação. Toda estrutura foi verificada para visualizar a presença de vazamento(s). Após esse procedimento, foram abastecidos para o povoamento dos alevinos. Foram utilizados 240 alevinos de tilápia revertidos com peso médio de  $131 \pm 7,81$  gramas de peso médio. Os mesmos foram adquiridos de empresa idônea e reversão sexual com eficácia mínima esperada de 98%.

### *3.2. Delineamento experimental*

As unidades experimentais utilizadas foram 12 tanques-redes de

estrutura de PVC com redes de polietileno com malha de 1cm. Com o objetivo de evitar dispersão de alimento entre os tanques, instalou-se comedouros individuais para cada tanque (anéis de alimentação com 30 cm de altura nas laterais dos tanques redes).

Para iniciar os estudos, 10 dias antes do início do experimento 20 tilápias foram condicionadas em cada tanque-rede (160 peixes/m<sup>3</sup>), com o intuito de aclimatar os animais. Após este período, foi realizada uma amostragem dos peixes (10 peixes por tanque) para a realização da primeira biometria para coleta dos dados iniciais de desempenho zootécnico.

O experimento foi realizado em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo avaliada a inclusão de três quantidades de lenha peletizadas na dieta dos peixes. As quantidades experimentais testadas foram: T0: 0% lenha peletizada + ração convencional (36% PB); T1: 15% lenha peletizada + ração comercial (36% PB) e T2: 30% de lenha peletizada + ração comercial (36% PB). Serão utilizadas quatro repetições por tratamento, totalizando doze unidades experimentais.

A quantidade de ração fornecida aos peixes foi calculada com base em seu peso corporal, sendo que os peixes receberam 3% da biomassa total. Para todos os tratamentos, o volume de ração oferecido foi corrigido, subtraindo a porcentagem adicionada de lenha peletizadas na dieta. A alimentação foi realizada em 3 tratos diários: às 09:00, 12:00 e 16:00. O experimento teve duração de 56 dias, sendo 10 dias para a aclimação dos peixes.

Para a caracterização bromatológica da ração comercial e da lemna (seca e peletizada), realizou-se a análise de composição centesimal, obtendo-se os índices de umidade, proteína bruta, Extrato etéreo, Fibra bruta e Cinzas, segundo as metodologias descritas pela AOAC (1999), referido na tabela 1. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Centro Universitário Católica do Tocantins Campus II.

As lemnas utilizadas no experimento foram obtidas em parceria com a EMBRAPA Pesca e Aquicultura. As lemnas foram coletadas em viveiros escavados da Embrapa e processadas. Após a coleta as lemnas realizou-se a desidratação em estufas até peso constante e armazenadas para a produção dos pellets. Para o desenvolvimento dos pellets de lemnas, foram testadas diferentes adições de aditivos (água, óleo vegetal e Carboxi-Metil-Celulose) para elaborar peletes que sejam palatáveis e aceitos pelos peixes.

O teste de palatabilidade foi realizado observando-se a aceitação dos peletes por peixes mantidos aquários. Os pellets foram elaborados no laboratório de Processamento de Alimentos do UniCatólica utilizando-se um picador e moedor elétrico, após a confecção dos pellets os mesmos foram secos em estufas a 55°C e acondicionados para posterior utilização. A formulação escolhida foi a que utilizou 2% de Carboxi-Metil-Celulose, 5% de óleo de soja e 30% de água.

Tabela 1- Matéria seca, umidade, matéria mineral, extrato etéreo, proteína bruta das lemnas secas, lemnas peletizadas e da ração utilizadas na pesquisa.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Componentes Lemna seca Lemna Peletizada Ração  
comercial Umidade

Componentes	Lemna seca	Lemna Peletizada	Ração comercial
Umidade (%)	0	4,75 ± 1,05	Max 13
Matéria mineral (%)	16,9 ± 0,01	0,66 ± 0,08	13
Extrato Etéreo (%)	1,25 ± 0,23	6,85 ± 1,02	7,5
Proteína Bruta (%)	24,2 ± 0,64	25,2 ± 0,45	35

### *3.3. Biometrias, Desempenho Zootécnico, Pigmentação e Análises de qualidade da água*

Quinzenalmente, 10 peixes de cada tanque-rede foram pesados e medidos (comprimento padrão e total). Estes parâmetros foram utilizados para avaliar os índices zootécnicos de ganho de peso diário (peso final – peso inicial/intervalo de dias), ganho de peso total (peso final – peso inicial), fator de conversão alimentar (alimento consumido/ganho de peso) e taxa de crescimento específico ( $100 \times \ln \text{ peso médio final} - \ln \text{ peso médio inicial} / \text{dias}$ ).

Ao final do experimento, 5 peixes de cada unidade experimental foram amostrados para avaliação da composição corporal e pigmentação dos filés. Os peixes foram anestesiados, abatidos por choque térmico. Após o abate o filé foi exposto para avaliação de cor, e posteriormente os peixes foram

homogeneizados e avaliados seus teores de umidade, proteína bruta, Extrato etéreo, Fibra bruta e Cinzas, segundo as metodologias descritas pela AOAC (1999).

A avaliação da cor foi desenvolvida em Colorímetro portátil Konica Minolta® CR400, previamente calibrado com o padrão de cor preto e branco antes de cada análise. Padronizando três pontos de mensuração com área de medição 8,0 mm. As cores que foram expressadas utilizaram os padrões CIE  $L^*a^*b^*$  “Comission Internationale de L’Eclairage: L (luminosidade), a (intensidade de cor vermelho-verde) e b (intensidade de cor amarelo-azul) (HUNTERLAB, 1996).

O parâmetro Croma ( $C^*$ ), que indica a cromaticidade ou intensidade de cor da amostra, será posteriormente determinado a partir dos resultados dos atributos a e b, por meio da equação (HUNTERLAB, 1996):

(eq. 3)  $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ , onde:

a = intensidade de cor vermelho-verde

b = intensidade de cor amarelo-azul

O ângulo hue ( $h^*$ ) indica a tonalidade da amostra e, sendo também considerado um importante atributo de cor, será obtido em seguida pela equação (HUNTERLAB, 1996):

(eq. 4)  $h^* = \tan^{-1}(b/a)$ , onde:

a = intensidade de cor vermelho-verde

b = intensidade de cor amarelo-azul

Para acompanhamento da qualidade da água do sistema

experimental, foram mensurados semanalmente avaliando, temperatura, Oxigênio Dissolvido, teores de pH e transparência. Durante o período do experimento, os valores médios oxigênio dissolvido foram de  $6,7 \pm 0,83$  mg de O<sub>2</sub> dissolvido/litro de água; o pH médio foi de  $7,4 \pm 0,63$ ; amônia total foi de  $0,06 \pm 0,03$  mg de NH<sub>3</sub>/litro de água; a temperatura médio observado foi de  $27,9 \pm 1,08$  graus de temperatura e a alcalinidade média foi de  $287 \pm 10,05$  mg/litro de alcalinidade. Todos os índices foram aferidos através de kits colorimétricos. Todos os parâmetros se encontram dentro do desejável pela literatura.

### *3.4. Análise estatística*

O estudo foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e quatro repetições. Os tanques 01, 06, 09, 12 foram alimentados com o tratamento 15%. Os tanques 02, 04, 07, 10 foram alimentados com o tratamento 30%. Já os tanques 03, 05, 08, 11 com o tratamento 0%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

## **4. RESULTADO E DISCUSSÃO**

Durante o período do experimento, não houve registro de mortalidade, demonstrando que os fatores ambientais e nutricionais não tiveram impacto significativo na taxa de sobrevivência dos peixes. O desempenho das tilápias do Nilo alimentadas com rações comerciais contendo diferentes quantidades de lemna incluída não causou prejuízos ao seu desenvolvimento ( $P > 0,05$ ). Os dados zootécnicos obtidos estão expostos na Tabela 2. Com relação ao peso médio dos peixes ao longo do tempo, considerando os diferentes tratamentos, observou-se que a inclusão da lemna na dieta não foi observada

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

em diferenças significativas ( $P>0,05$ ). Cipriani (2020) obteve resultados semelhantes ao analisar o impacto da evolução ocasionada de lemna fresca no desempenho zootécnico de juvenis de tilápia do Nilo na fase inicial, concluindo que essa suplementação pode diminuir a demanda de peixes por ração comercial sem comprometer seu desenvolvimento.

Tabela 2 – Peso médio, ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CAA) e taxa de crescimento específico (TCE) de tilápias do Nilo alimentadas diariamente com diferentes concentrações de lemnas peletizadas e ração comercial, durante as quatro biometrias realizadas do período de 46 dias.

Dias	Índice zootécnico	T0 - Ração	T1 15	T2 30
D0	Peso Médio	129,35 ± 7,22	129,8 ± 7,09	135,0 ± 9,91
	(g)			
D14	Peso Médio	181,95 ± 3,75	177,05 ± 3,4	167,45 ± 10,7
	(g)			
	GPD (g)	3,76 ± 0,60	3,38 ± 0,68	2,32 ± 0,21
	CAA	1,10 ± 0,19	1,23 ± 0,21	1,76 ± 0,16
	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	2,44 ± 0,44	2,22 ± 0,50	1,54 ± 0,15
D30	Peso Médio	242,83 ± 10,1	246,7 ± 5,83	236,65 ± 11,74
	(g)			
	GPD (g)	3,81 ± 0,68	4,35 ± 0,46	4,33 ± 0,83
	CAA	1,42 ± 0,30	1,22 ± 0,13	1,25 ± 0,25
	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	1,80 ± 0,30	2,07 ± 0,21	2,17 ± 0,44
D46	Peso Médio	334,03 ± 5,48	322,18 ± 5,83	299,42 ± 12,62
	(g)			
	GPD (g)	5,7 ± 0,47	4,44 ± 0,29	4,26 ± 0,36
	CAA	1,27 ± 0,11	1,55 ± 0,20	1,7 ± 0,14
	TCE (% dia <sup>-1</sup> )	2,00 ± 0,21	1,67 ± 0,23	1,47 ± 0,30

Média não apresentaram diferenças significativas pelo teste t ( $P>0,05$ ).

As tilápias alimentadas com ração comercial e diferentes concentrações de lemna peletizada apresentaram ganho de peso diário semelhante àquelas do grupo controle (apenas ração comercial), sugerindo que a lemna pode ser uma alternativa viável para a alimentação dessas espécies. A conversão alimentar aparente (CAA), que mede a eficiência na

transformação da ração em ganho de peso, não apresentou variações significativas entre os tratamentos, indicando que a inclusão de lemna na dieta não compromete a eficiência alimentar dos peixes.

Os valores de TCE, como mostrado na Tabela 4, também não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Isso está em consonância com os resultados de Tavares et al. (2008), que observaram que a substituição de até 50% da ração comercial por lemna seca na alimentação de alevinos de tilápia nilótica não afetou significativamente o crescimento específico sugerindo que a incorporação da lemna é uma opção viável, econômica e sustentável quando combinada com a ração comercial, sem comprometer o desempenho zootécnico das tilápias.

Através da colorimetria das amostras de filé de tilápia é possível perceber se os pigmentos presentes na lemna afetaram ou não a coloração do filé. As médias obtidas de luminosidade, intensidade da cor vermelho-verde e intensidade da cor amarelo-azul apresentaram resultados semelhantes entre os três tipos de tratamento (tabela 3), demonstrando que a incorporação de lemna na alimentação das tilápias do Nilo não afetou a coloração do filé. Tornando um resultado positivo para a melhor aceitação comercial do produto.

Tabela 3 - Análises de colorimetria de filés de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes quantidades de lemnas peletizadas.

Letra	T0 - Ração	T1-15% lemna	T2-30% lemna
L	42,3 ± 2,98	41,7 ± 2,03	43,2 ± 2,15
H	88 ± 123	111 ± 129	90,1 ± 155
A	3,71 ± 1,99	3,21 ± 1,01	3,45 ± 1,52
B	0,37 ± 1,02	0,55 ± 0,82	0,67 ± 1,25

L: luminosidade; H: tonalidade da amostra; A: intensidade de cor vermelho-verde; B: intensidade de cor amarelo-azul



## CONCLUSÃO

A inclusão de *Lemna* sp. na dieta de juvenis de tilápias do Nilo, em diferentes percentuais, não comprometeu o desempenho zootécnico nem a qualidade do filé. A planta se mostrou uma alternativa promissora e acessível, especialmente para pequenos produtores, reduzindo os custos com rações e oferecendo uma fonte nutricional de qualidade. Além de ser economicamente viável, seu uso contribui para práticas mais sustentáveis na piscicultura, promovendo uma produção mais ecológica e alinhada às tendências globais de sustentabilidade.

## REFERÊNCIAS

ANUÁRIO PEIXE BR – publicado pela Associação Brasileira de Piscicultura – Fevereiro, 2020. Disponível em: (<https://www.peixebr.com.br/>).

CHAKRABARTI, R.; CLARK, W. D.; SHARMA, J. G.; GOSWAMI, R. K. Mass production of *Lemna* minor and its amino acid and fatty acid profiles. \*Frontiers in Chemistry\*, v. 6, p. 479, 2018.

CIPRINI, L. A. A ingestão espontânea de *Lemna* afeta o desempenho zootécnico de juvenis de tilápia do Nilo? 2020. 43 f. Dissertação (Curso de pós-graduação em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2020.

De MATOS, F. T.; LAPOLLI, F. R.; MOHEDANO, R. A.; FRACALOSSI, D. M.; BUENO, G. W.; ROUBACH, R. Duckweed bioconversion and fish production in treated domestic wastewater. \*Journal of Applied Aquaculture\*, v. 26, n. 1, p. 49-59, 2014.

EL-SHAFI, S. A.; EL-GOHARY, F. A.; VERRETH, J. A. J.; SCHRAMA, J. W.; GIJZEN, H. J. Apparent digestibility coefficient of duckweed (*Lemna* minor), fresh and dry, for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). \*Aquaculture Research\*, v. 35, p. 547-586, 2004.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation. Rome: FAO, 2022.

FASAKIN, E. A.; BALOGUN, A. M.; FASURU, B. E. Use of duckweed, \*Spirodela polyrrhiza\* L. Schleiden, as a protein feedstuff in practical diets for tilapia (\*Oreochromis niloticus\* L.). \*Aquaculture

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Research\*, v. 30, p. 313-318, 1999.

GRAEFF, A.; VIANNA, A. G.; TONETTA, D.; PRUNER, E. N. Avaliação do potencial nutritivo da macrófita aquática \*Lemna minor\*, por meio da análise da composição química e por sua utilização em ração para carpa comum (\*Cyprinus carpio\* L.) na fase de recria. \*Evidência\*, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 37-50, jan./jun. 2007.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285 p.

TAVARES, F. de A.; LAPOLLI, F. R.; ROUBACH, R.; JUNGLES, M. K.; FRACALOSSI, D. M.; De MORAES, A. M. Use of domestic effluent through duckweeds and red tilapia farming in integrated system. \*Pan-American Journal of Aquatic Sciences\*, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.

UTAMI, R. H.; NIRMALA, K.; RUSMANA, I.; DJOKOSETIYANTO, D.; HASTUTI, Y. P. The application of phytoremediation \*Lemna perpusilla\* to increase the production performance of Nile tilapia (\*Oreochromis niloticus\*) in a recirculation system. \*Journal Akuakultur Indonesia\*, v. 17, n. 1, p. 34-42, 2018.

ANEXOS

APENDICE



Figura 1- Péletes de Lemna para os primeiros testes



Figura 2- Lemnas peletizadas e armazenadas



Figura 3- Lemnas em processo de peletização



Figura 4- Adição de água e aglutinante na lemna seca para  
iniciar o processo de peletização



Figura 5- Pesagem da lenha seca



Figura 6- Confeção dos tanques-rede

#### AGRADECIMENTOS:

Agradecemos as bolsas concedidas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Tocantins - FAPT, A UniCatólica por oportunizar este processo de geração de conhecimento e aos pesquisadores da Embrapa pelo apoio.

## Capítulo 4

### A Desenvolvimento de pães enriquecidos com farinha da Amêndoa de Sapucaia

Áryson Barbosa Serpa  
Maria Luciana Barbosa Mendes  
Caroline Roberta Freitas Pires  
Emerson Adriano Guarda  
Patrícia Martins Guarda

#### RESUMO

A sapucaia é um fruto da biodiversidade brasileira, conhecido como matéria-prima para artesanato e que tem se popularizado por seu potencial alimentício. Estudos demonstram o potencial da farinha de sapucaia para enriquecer alimentos como o pão, aumentando seu valor nutricional e funcional. A farinha da amêndoa sapucaia surge como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de produtos mais nutritivos e funcionais, atendendo à crescente demanda por alimentos saudáveis. A inclusão da farinha de sapucaia em formulações de pão resultou em produtos com boa aparência visual e capacidade antioxidante similar a produtos convencionais. Este estudo ressaltou a importância de pesquisas contínuas para explorar o potencial da sapucaia na indústria alimentícia, incentivando o extrativismo sustentável e gerando oportunidades para comunidades locais.

**Palavras-chave:** Composição proximal; desenvolvimento de novos produtos; panificação

---

<sup>1</sup> Graduando do curso de Engenharia de Alimentos, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, aryson.serpa@mail.uft.edu.br

<sup>2</sup> Pós-graduada do Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, luciana.barbosa@mail.uft.edu.br.

<sup>3</sup> Doutora em Ciência dos Alimentos, Curso de Nutrição, Universidade Federal do Tocantins, carolinerfpirez@mail.uft.edu.br.

<sup>4</sup> Doutor em Química Orgânica, curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Tocantins, emersonprof@mail.uft.edu.br

<sup>5</sup> Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, patriciaaguarda@uft.edu.br.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, sementes comestíveis de plantas, nozes e castanhas têm atraído atenção especial dos pesquisadores por serem fontes naturais de vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos essenciais e poderem contribuir para a nutrição humana e animal (AVELAR, PONTES E PAULA, 2023). Deste modo, é interessante a condução de novos estudos e pesquisas para ampliar o conhecimento a respeito da sapucaia, viabilizando assim o desenvolvimento de novos produtos e incentivando o extrativismo, gerando emprego para os moradores locais.

As castanhas da sapucaia pertencem à espécie *lecyrthis pisonis cambess* e são encontradas na região amazônica e no cerrado brasileiro (SOUZA et al., 2008). O fruto é redondo ou achatado, o pericarpo é firme e grosso e de cor marrom. Quando maduro, o opérculo inferior é liberado resultando em uma abertura circular pela qual as sementes são liberadas. As sementes são oleosas e de cor castanha clara ou branca, podem ser consumidas cruas, cozidos ou assadas, entretanto apesar de comestíveis a sapucaia é um fruto pouco difundido e pouco estudado como fonte de nutrição. (SOUZA et al., 2008).

Embora o ouriço de sapucaia seja mais procurado para decorações artesanais, a castanha de sapucaia também é consumida pela população local, sua composição nutricional e fitoquímica é pouco explorada, e o potencial econômico e sociocultural desta castanha não foi determinado. Além disso, embora esta matéria-prima seja muito procurada, ela não é produzida em larga escala apesar do potencial extrativista da mesma (OLIVEIRA, BENTES E JÚNIOR, 2023).

As pesquisas sobre a sapucaia como produto de consumo alimentar avançaram em 2018 com as atualizações da ferramenta IQ COSAN (Índice de Qualidade da Coordenação de Segurança Alimentar e Nutricional) desenvolvida Fundo Nacional de

Desenvolvimento da Educação (FNDE) para avaliação de cardápios escolares (BRASIL, 2018). Com a atualização do IQ COSAN a amêndoa de Sapucaia passou a ser considerada como alimento da sociobiodiversidade nos estados do norte e do sudeste do país. Embora os estados do sudeste não façam parte do Território Amazônico, possuem a cultura de consumir amêndoas como alimento, e o uso decorativo da casca da fruta é comum em outras partes do país (BRASIL, 2018).

O pão surgiu aproximadamente em 8.000 a.C, período compatível com o cultivo do trigo na Mesopotâmia (atualmente a região do Iraque). Sua história é tão antiga que carece de precisão. Os egípcios foram os primeiros a utilizar forno de barro para assar pão e atribui-se a eles a descoberta do fermento. No Brasil, o pão foi introduzido pelos colonos, mas a atividade de panificação só se expandiu com os imigrantes italianos. Atualmente, é um alimento mundialmente consumido. O dia 16 de outubro é o Dia Internacional do Pão, uma data festiva e propícia para que o panificador crie estratégias para ampliar a venda de pães. O pão é um alimento de expressivo consumo, e seu mercado vem crescendo rapidamente. Isso demanda a criação de novas plantas, equipamentos, formulações e aditivos alimentícios seguros (RONDANI, 2015).

Procurando atender as buscas dos consumidores por produtos mais saudáveis, a indústria alimentar procura constantemente desenvolver produtos com propriedades e composições inovadoras, a fim de inserir-se em novas áreas de mercado e tornar-se mais diversificada e atraente para os consumidores. Os produtos de panificação ocupam muito espaço no mercado de alimentos, no Brasil, somente o pão francês responde por 53% do consumo de produtos de panificação (GHENO et al, 2022).

O pão é um alimento básico amplamente consumido em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento. É composto



principalmente de farinha, água, fermento e sal. O pão branco é o tipo mais comum e consumido. No entanto, há um crescente interesse na fortificação de pães com diferentes fibras dietéticas e compostos funcionais, a fim de torná-lo um veículo de substâncias com atividade funcional. Não obstante, a incorporação de outros ingredientes aos produtos de panificação, seja como adição ou substituição parcial de ingredientes originais, deve ser cuidadosamente estudada para garantir que a qualidade do produto não seja comprometida nem descaracterizada. (MELO et al., 2020)

Dado o elevado consumo de produtos de panificação pelos consumidores brasileiros, a intensa produção de produtos de panificação tornou-se uma linha de desenvolvimento amplamente visada pela indústria alimentícia. Deste modo, o objetivo deste trabalho é estudar o efeito da utilização de farinha de amêndoa de sapucaia no enriquecimento de pão de trigo, além de obter a composição proximal da farinha de amêndoa de sapucaia, análise da atividade antioxidante, determinação de compostos fenólicos desenvolver formulações de pães enriquecidos com diferentes proporções de farinha de sapucaia.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Obtenção dos frutos

Os frutos de foram coletados na zona rural da cidade de São Luís-MA. Foram selecionados frutos de acordo com seu estágio de maturação e conservação sendo que os frutos que se apresentaram danos ou abaixo do grau de maturação foram descartados. Os frutos coletados foram encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (Lapeq) situado na Universidade Federal do Tocantins, campus Palmas, para onde foram limpos, sanitizados e armazenados.

Os frutos passaram por descasque manual, após o descasque as amêndoas foram armazenadas separadamente em embalagens de polietileno e então acondicionados em freezer -18°C até a realização das análises.

### **Obtenção da farinha**

As amêndoas foram secas em estufa de circulação de ar a 140 °C por 15 minutos conforme metodologia de Floriano (2021). As amêndoas foram trituradas em liquidificador industrial, em modo pulsar descontínuo, até a obtenção de material de aspecto granulométrico farináceo e homogêneo.

### **Caracterização físico-química dos frutos de sapucaia**

A caracterização química foi conduzida para as amêndoas visto que há pouca discriminação na literatura a respeito da composição química da amêndoa de sapucaia. As análises realizadas para esta caracterização estão discriminadas abaixo.

#### **Potencial hidrogeniônico (pH)**

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada em um potenciômetro (Digimed, modelo DMPH-2) calibrado previamente com soluções de pH 4,0 e 7,0, de conforme a Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2012).

#### **Acidez Total Titulável**

A acidez total titulável foi determinada por meio de titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, utilizando fenolftaleína como indicador, conforme a AOAC (2012).

### Composição Centesimal

A umidade (%) foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105 °C, até peso constante; o teor de lipídios (%) determinado por extração direta em Soxhlet utilizando hexano como solvente de extração; proteínas (%), por digestão seguido de destilação em destilador kjeldahl e titulação; fibra bruta (%), através da digestão ácida e básica, tendo o resíduo filtrado e calcinado; a determinação de cinzas (%) realizada por meio de incineração, com aquecimento em mufla a 550 °C; e os carboidratos pela metodologia de diferença utilizando os demais resultados obtidos; todas estas análises foram conduzidas de acordo com as normas propostas pela AOAC (2012).

### Atividade antioxidante

Para determinação da atividade antioxidante, foi necessária preparação de extratos das amostras, obtidos pela pesagem de 5g de amostra, adicionando-se 80mL de água destilada, mantendo em agitação por 1h. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro. Todo o procedimento foi conduzido na ausência de luz, e os extratos obtidos, serão armazenados em frascos âmbar e congelados até a realização das análises (RUFINO et al., 2010).

### Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante foi determinada pela redução do radical estável 2,2- di (4-t- octilfenil) -1-picrilhidrazila (DPPH.), seguindo o método descrito por Brand Williams *et al.* (1995), com modificações segundo Rufino *et al.* (2007b).

### Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante avaliada quanto ao poder de redução do ferro, foi mensurada de acordo com o método de Rufino *et al.* (2006b). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso/g de amostra.

Método ABTS+ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

A capacidade de redução do radical ABTS+ foi determinada segundo a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2007a). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox/ g de massa fresca.

Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados utilizando o reagente Folin Ciocalteau, conforme metodologia descrita por Waterhouse (2002), em espectrofotômetro digital a 750 nm. Os resultados serão expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG)/ 100g de amostra.

Desenvolvimento das formulações

Foram desenvolvidas 03 formulações de pães, sendo duas formulações enriquecidas com a farinha da amêndoa de sapucaia nas proporções de 25% e 50% de farinha de sapucaia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Têm sido realizados estudos a fim de melhorar o valor nutritivo dos pães, principalmente quanto ao teor e qualidade proteica, bem como o conteúdo de minerais, vitaminas e fibras alimentares. O grande consumo do pão evidencia que ele é um alimento que pode ser enriquecido com outros produtos para oferecer nutrientes ou componentes especiais, tornando-o mais nutritivo (RONDANI, 2015). Na

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Tabela 1 foram expressas as formulações de pães enriquecidos com farinha de sapucaia.

Tabela 1. Formulação de pães enriquecidos com farinha de amêndoa de sapucaia. (g).

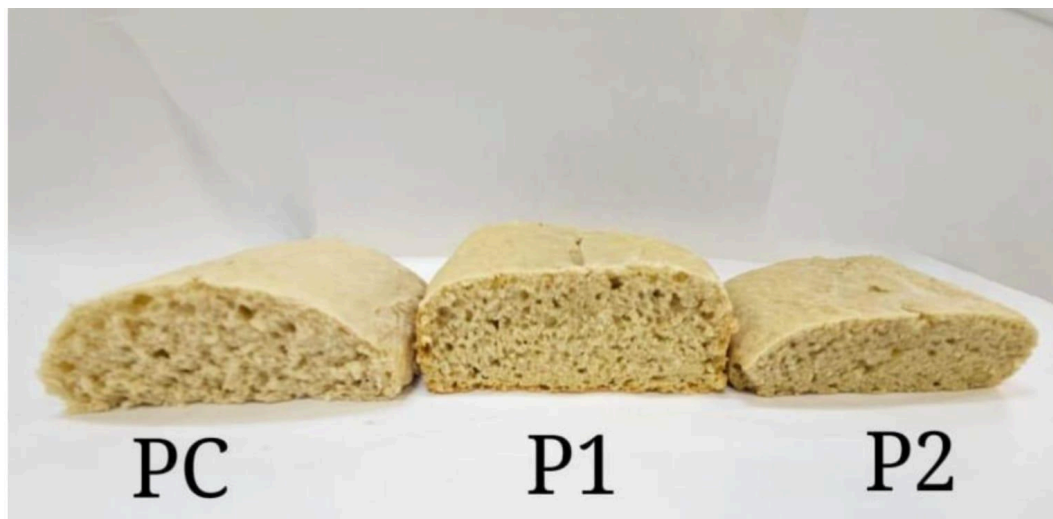
<b>Ingredientes</b>	<b>PC*</b>	<b>P1**</b>	<b>P2***</b>
Farinha de sapucaia	0	25	50
Farinha de trigo	100	100	100
Açúcar cristal	2	2	2
Fermento biológico seco	1	1	1
Sal iodado	2	2	2
Água	60	60	60

\*PC: pão controle; \*\*P1: pão enriquecido com 25% de farinha de sapucaia; \*\*\*P2: pão enriquecido com 50% de farinha de sapucaia.

Fonte: Autor, 2024.

Conforme apresentado na Tabela 1, a receita artesanal utilizada para a produção dos pães baseou-se em uma proporção fixa de farinha de trigo, açúcar cristal, fermento biológico e sal. Para enriquecer a formulação, o pão P1 recebeu 25% e o pão P2, 50% de farinha de sapucaia em relação à quantidade total de farinha de trigo, respectivamente.

Imagem 1. Pão controle (PC); Pão enriquecido 25% (P1); Pão enriquecido 50% (P2).



Fonte: Autor, 2024.

A amêndoa de sapucaia é rica em lipídios, a presença de óleos nas amêndoas pode ser percebida durante o manuseio. A caracterização físico-química (Tabela 2) atestou que dentre os macronutrientes presentes na amêndoa os lipídios são predominantes.

A análise dos pães (Imagem 1) indicou que o P1, com 25% de farinha da amêndoa de sapucaia, apresentou o perfil de crescimento mais próximo ao pão controle, sugerindo uma melhor aceitação da formulação. O P2, com 50% de farinha da amêndoa de sapucaia, demonstrou menor desenvolvimento, possivelmente devido à maior quantidade de lipídios provenientes da farinha, o que pode ter afetado a estrutura da massa e a atividade fermentativa. A presença de maior quantidade de lipídios também conferiu ao P2 uma textura mais oleosa.

Tabela 2. Composição proximal pães enriquecidos com farinha de amêndoa de sapucaia *Lecythis pisonis cambess.*(Resultados g./100g).

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Componentes	Farinha	PC	P1	P2
Umidade	3,81	16,82	17,50	16,82
Lipídios	55,18	59,82	64,41	71,07
Proteínas	4,09	4,10	3,30	3,64
Fibra bruta	0,04	0,01	0,01	0,01
Cinzas	0,19	0,33	0,42	0,47
Carboidratos	36,65	18,92	14,02	8,33
pH	6,44	6,28	6,33	6,37
Acidez titulável	0,03	0,08	0,06	0,06
Kcal	659,58	630,46	650,33	686,13

\*PC: pão controle. \*\*P1: pão enriquecido com 25% de farinha de sapucaia. \*\*\*P2: pão enriquecido com 50% de farinha de sapucaia.

Fonte: Autor, 2024.

Poucos trabalhos envolvendo a caracterização da amêndoa de sapucaia foram encontrados na literatura, nos quais não houve determinação de pH na farinha. Entretanto, os resultados encontrados para pH da farinha neste trabalho (6,44) aproximaram-se dos valores de pH encontrados por Ribeiro *et al.* (2023) em seu trabalho de caracterização de amêndoa de pequi (6,0) e do trabalho de Lopes *et al.* (2023) envolvendo castanha do Brasil (5,87).

A composição físico-química determinada foi comparada (Tabela 3) com os poucos trabalhos encontrados. Os resultados encontrados aproximam-se principalmente dos resultados publicados por Carvalho *et al.* (2012) e Vallilo *et al.* (1998).

Tabela 3. Comparação de dados de caracterização físico-química de amêndoa de sapucaia entre diferentes estudos.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Componentes	Autor, 2024	Oliveira, Bentes e Júnior, 2023	Carvalho <i>et al.</i> , 2012.	Vallilo <i>et al.</i> , 1998.
Umidade	3,81	9,54	10,20	4,92
Cinzas	0,19	3,65	3,17	3,91
Lipídios	55,18	46,00	54,80	63,03
Proteínas (N x 6,25)	23,03	8,80	26,82	19,86
Fibra bruta	0,04	-	-	-
Carboidratos	36,65	33,12	5,01	8,28
Kcal	659,58	577,24	620,52	684,00

Fonte: Autor, 2024.

Dos resultados encontrados, apenas o teor de fibras divergiu dos resultados encontrados na literatura. Entretanto deve-se levar em consideração que embora os estudos tenham sido desenvolvidos com a mesma espécie de amêndoa, os frutos foram coletados em diferentes regiões do país, segundo Oliveira, Bentes e Júnior (2023), fatores como o tempo de maturação, o local de coleta e a composição do solo podem explicar as diversas diferenças observadas na composição dos frutos. Essas variáveis ambientais exercem influência direta sobre o desenvolvimento e a acumulação de nutrientes nos frutos.

Em seguida, observou-se que a composição de antioxidantes pode sofrer alterações dependendo do local de coleta dos frutos. Sabe-se que os antioxidantes são perdidos ou transformados pela ação do calor, de acordo com Takemura (2024). Conforme observado na Tabela 4, sugere-se que durante a fermentação a autólise da farinha pode ter contribuído para a liberação de peptídeos bioativos ou fenólicos associados à matriz da farinha de trigo, os quais apresentam capacidade antioxidante (TAKEMURA, 2024).

Tabela 4. Atividade antioxidante em farinha e pães enriquecidos com farinha de amêndoa de sapucaia.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Amostra	DPPH	FRAP	ABTS	Fenólicos totais
Farinha	33,63 ± 2,06	64,25 ± 0,87	9,31 ± 0,30	64,79 ± 0,19
PC	38,54 ± 1,26	52,41 ± 1,07	8,16 ± 0,55	55,17 ± 0,23
P1	41,02 ± 1,49	50,03 ± 1,92	7,65 ± 1,00	57,08 ± 0,44
P2	45,04 ± 1,78	48,46 ± 1,84	7,23 ± 1,04	59,17 ± 0,76

Fonte: Autor, 2024.

O método DPPH é um método utilizado para determinar a capacidade que um composto antioxidante presente no alimento analisado possui de reduzir o radical livre DPPH (FUJII et al., 2022). Já o método FRAP mensura a capacidade dos antioxidantes em reduzir o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que são associados a reações de estresse oxidativo, enquanto o método ABTS determina a capacidade dos antioxidantes presentes no alimento possuem de neutralizar o radical ABTS, que é gerado pela oxidação do radical ABTS com um agente oxidante (FUJII et al., 2022). Além das análises de DPPH, FRAP e ABTS, a avaliação de compostos fenólicos é um importante parâmetro para determinação da atividade antioxidante dos alimentos.

A análise pelo método DPPH indicou uma leve variação nos antioxidantes do P1 em função do PC, enquanto o P2 apresentou um incremento consideravelmente baixo, apesar do enriquecimento com 50% de farinha de sapucaia. Os métodos FRAP e ABTS revelaram uma ligeira redução nos antioxidantes das amostras P1 e P2 em comparação com o PC e a farinha pura, que exibiu maior atividade antioxidante. A quantificação dos compostos fenólicos totais demonstrou que a farinha de sapucaia é rica nessa classe de compostos e que o teor de fenólicos aumentou proporcionalmente com o incremento da farinha nas formulações P1 e P2.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que a incorporação de farinha de amêndoa de sapucaia em formulações de pão resultou em produtos com propriedades antioxidantes significativas, atribuídas ao alto teor de compostos fenólicos presentes nessa farinha. Embora o enriquecimento com 50% de farinha tenha levado a um menor desenvolvimento da massa, a formulação com 25% apresentou características sensoriais e tecnológicas promissoras. A farinha de amêndoa de sapucaia, com composição nutricional equilibrada e alta capacidade antioxidante, representa uma alternativa inovadora para a produção de pães mais nutritivos e funcionais, agregando valor à indústria de panificação.

#### REFERÊNCIAS

OAC, 2012. AOAC INTERNATIONAL. Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. AOAC® Standards Development

©2012 AOAC INTERNATIONAL ALL RIGHTS RESERVED.

AVELAR, M. C. D., PONTES, A. N., PAULA, M. T. D. Educação Ambiental para conservação dos elementos naturais do Parque Natural Municipal de Castanhal (PA). Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA), v. 18, n. 1, p. 299-317, 2023.

BRASIL. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da educação (FNDE). Índice de qualidade da coordenação de segurança alimentar nutricional - IQ COSAN. 2018. Disponível em: <https://www.fnnde.gov.br> Acesso em: 12 de fevereiro de 2024.

DEMOLINER, F. *et al.* Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part I: Nutritional composition and lipid profile. Food Research International, 108, 27-34. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.028>

FUJII, H. *et al.* Antioxidant Activity of Food and Its Role in Disease Prevention: A Comprehensive Review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 103, p. 108239, 2022.

GHENO, A. M. *et al.* Avaliação de atributos tecnológicos de pão francês com adição de farinhas de vegetais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 25. 2022. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11321>.

MELO, R. DA S. *et al.* Armazenamento de pão doce enriquecido com frutos do cerrado. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 9, n. 11, pág. e8419118265, 2020.

Oliveira Z. B. de; Bentes F. N. C. Júnior A. Q. da S. Composição nutricional da castanha de Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess), proveniente de Santarém – PA. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 23, n. 9, p. e 13487, 25 set. 2023.

RIBEIRO, F. P. *et al.* Avaliação da farinha de amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) como fonte de proteínas vegetais-obtenção e caracterização físico-química de concentrado proteico. 2023.

RONDANI, F. M. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÃO DE  
FORMA

ENRIQUECIDO COM FARINHA DE CASTANHA DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.). *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 49–64, 2015. DOI: 10.31072/rcf.v4i2.191. Disponível em: <https://revista.unifaema.edu.br/index.php/Revista-FAEMA/article/view/191>. Acesso em: 12 set. 2024.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2006a.

RUFINO, M.S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. Food chemistry, v. 121, n. 4, p. 996- 1002, 2010.

RUFINO, M.S.M *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007a.

RUFINO, M.S.M *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2006b.

RUFINO, M.S.M *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007b.

TAKEMURA, Miriam Regina Canesin. Desenvolvimento de pão funcional com inclusão de farinha de casca de jaboticaba (" e; Myrciaria jaboticaba (Vell.) Berg." e); efeito antioxidante e no comportamento da glicemia em indivíduos saudáveis. 2024. Tese de Doutorado. [sn].

## FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento que tornou possível a realização deste projeto, à Universidade Federal do Tocantins (UFT), Laboratório de Pesquisa em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LAPEQ) e o Laboratório de Tecnologia de Alimentos por prover a infraestrutura e o ambiente propício para a pesquisa. Em especial, manifesto minha profunda gratidão à minha orientadora, Professora Dra. Patrícia Guarda Martins, por sua incansável dedicação, paciência e por compartilhar seus vastos conhecimentos de forma tão generosa. Sua orientação precisa foi fundamental para o sucesso deste trabalho. Agradeço também à graduanda em nutrição Maria Luciana Barbosa Mendes pela valiosa colaboração e companheirismo durante todas as etapas do projeto. Sua expertise em nutrição enriqueceu significativamente a pesquisa. Agradeço aos Professores Doutores Caroline Roberta Freitas Pires e Emerson Adriano Guarda por seus ensinamentos e por acompanharem o desenvolvimento do projeto, oferecendo sugestões e críticas construtivas que contribuíram para a sua melhoria.

## Capítulo 5

### Seleção de leveduras obtidas do fruto Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) Como agentes de biocontrole

José Rafael Farias das Chagas<sup>1</sup>;

Catiele Silva de Oliveira <sup>2</sup>;

Juliana Fonseca Moreira da Silva <sup>3</sup>;

Raphael Sanzio Pimenta<sup>4</sup>;

#### RESUMO

Este estudo aborda a importância de controlar doenças pós-colheita que afetam frutos tropicais, com destaque para a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, uma das principais causas de perdas em mangas. Tradicionalmente, o controle dessas doenças tem sido feito com fungicidas químicos, que podem causar sérios impactos à saúde humana e ao meio ambiente, incluindo o aumento de casos de câncer e outras doenças graves. Diante dos riscos, métodos alternativos têm sido explorados, incluindo o controle biológico e o uso de substâncias consideradas seguras (GRAS) pelo FDA. Entre as substâncias estudadas os ácidos acético, láctico, propiônico e os sais bicarbonato e carbonato de sódio nas concentrações de 1,3 e 5 %, apresentaram uma redução do fungo patogênico. A levedura LT76 foi eficaz no controle do *C. gloeosporioides* de acordo com testes realizados anteriormente e apresentou sensibilidade aos ácidos acético e propiônico em todas as concentrações testadas. A utilização de substâncias GRAS e microrganismos a partir de frutos nativos da Amazônia, como o tucumã, podem representar uma importante contribuição para o desenvolvimento de agentes biotecnológicos capazes de reduzir perdas pós-colheita e promover práticas mais sustentáveis na agricultura.

**Palavras-chave:** Tucumã, Agrotóxicos, Controle biológico, potencial biotecnológico.

---

<sup>1</sup>Graduando em Medicina, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins,  
[rafael.farias@mail.uft.edu.br](mailto:rafael.farias@mail.uft.edu.br)

<sup>2</sup>Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins,  
[catielesilva162016@gmail.com](mailto:catielesilva162016@gmail.com)

<sup>3</sup> Doutora em Microbiologia, curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins,  
[julianafmsilva@uft.edu.br](mailto:julianafmsilva@uft.edu.br)

<sup>4</sup> Doutor em Microbiologia, Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins,  
biorapha@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Para evitar perdas na conservação e durante o comércio de frutos tropicais, é de fundamental importância controlar doenças que surgem na fase pós-colheita (SANTOS *et al.*, 2022). Historicamente, o uso de fungicidas químicos tem sido a estratégia mais empregada para o controle dessas doenças (ECULICA; DOMINGOS; SERRANO, 2021).

No entanto, a aplicação indiscriminada desses fungicidas sintéticos têm um impacto negativo à saúde humana e ao meio ambiente (JOHN; BABU, 2021), podendo desencadear uma série de doenças graves ao homem, entre as doenças mais preocupantes estão: alterações nos hormônios da tireoide, câncer uterino, insuficiência renal crônica, e desenvolvimento de leucemia mieloide (BRAGA *et al.*, 2020).

O número de casos notificados de intoxicação por agrotóxicos registrou um aumento de duas vezes entre 2007 e 2016 (CARVALHO *et al.*, 2022), e diversas autoridades de saúde e órgãos ambientais alertaram sobre os riscos do uso excessivo de agrotóxicos. Alguns acreditam que, se a política agrícola não for alterada, o custo ambiental, para os agricultores e para os consumidores pode acabar superando a produção agrícola (ALCÂNTARA *et al.*, 2019).

Métodos alternativos estão sendo explorados para o controle dessas doenças pós-colheitas, incluindo abordagens químicas menos severas ou associadas com métodos menos nocivos, métodos físicos e principalmente os métodos de controle biológico e controle integrado (FONTANA *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

O controle biológico integrado é uma associação do controle biológico clássico com uma substância GRAS (Generally recognized as

safe) que são consideradas pela FDA (Food and Drug Administration) aditivos alimentares seguros para o ser humano e que podem possuir capacidade antifúngica ou fungistática (PIMENTA *et al.*, 2019). Entre as substâncias utilizadas que são consideradas seguras para o consumo humano podem-se citar: cloreto de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, entre outros. Estas substâncias contribuem para a redução populacional de fungos filamentosos, devido a sua capacidade de causar estresse osmótico e alteração de pH. (CORRÊA, 2020).

O controle biológico é tradicionalmente definido como o método que envolve o uso de espécies antagonistas com o objetivo de reduzir ou eliminar a atividade de organismos patogênicos que causam doenças e danos às espécies que são acometidas (SOUZA *et al.*, 2022).

Diversos microrganismos podem ser utilizados na aplicação de controle biológico, todavia o uso de leveduras biocontroladoras tem se destacado devido a diversas características como: estarem presentes naturalmente nas superfícies dos frutos, possuem pouca demanda nutricional levando uma rápida colonização na superfície de frutos, e serem tolerantes ao estresse gerado pelo uso de fungicidas, além de poderem ser obtidas de várias amostras e ambientes (FREIMOSER *et al.*, 2019; SANCHEZ *et al.*, 2019).

Dentre a ampla variedade de frutos nativos da região amazônica, destacam-se o Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) que é uma palmeira nativa da região Amazônica. Os frutos ainda são pouco explorados e podem apresentar uma variável possibilidade de bioprospecção não somente de novas substâncias, mas também de novos microrganismos que possam ter potencial biotecnológico. Desta forma, o isolamento de leveduras biocontroladoras obtidas do fruto tucumã podem levar à descoberta de novos agentes de controle biológico, capazes de reduzir as perdas pós-colheita em mangas (DURAN *et al.*, 2016; FELIZIANI e ROMANAZZI, 2016).



Entre as principais causas de perdas pós-colheita que acomete as mangueiras nesta fase é proveniente do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (MELO *et al.*, 2021). Esse fungo, quando entra em contato com o fruto, pode evoluir para uma doença chamada de antracnose, que ocasiona podridão no fruto e consequentemente perdas econômicas para o país (REZENDE *et al.*, 2020).

Com esse intuito, o estudo tem como objetivo caracterizar as leveduras biocontroladoras, associado ao fruto tucumã provenientes da região Amazônica como também a verificação de substâncias GRAS no controle da antracnose em mangas.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Reativação das leveduras

As 150 leveduras utilizadas no experimento foram obtidas da coleção de culturas microbiológicas mantidas no Laboratório de Microbiologia Geral (LMA) da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas-TO. Foram realizados testes prévios de seleção para observar a capacidade das leveduras com potencial antagônico ao fitopatógeno, tais como: crescimento e armazenamento dos isolados em diferentes temperaturas de crescimento; Capacidade de produzir enzimas pectinolíticas e celulolíticas; Capacidade de produção de compostos antifúngicos difusíveis e voláteis.

### Obtenção do fungo fitopatógeno

O fungo *C. gloeosporioides*, foi obtido a partir da coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Para a reativação, transferiu-se um disco com micélio fúngico, inicialmente armazenado em freezer a -20°C, para placas de petri contendo meio

de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA), com tempo de incubação de sete dias em temperatura controlada (BOD) de 25 °C.

#### Atividade inibitória de substâncias GRAS *in vitro* ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*

A atividade antifúngica do ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, bicarbonato de sódio, e carbonato de sódio frente ao fungo foram analisados em conformidade com a metodologia de Karaca *et al.* (2014) com algumas modificações. Para tanto, placas de Petri foram previamente preparadas contendo meio cultura NYDA e enriquecidas com os ácidos e sais nas concentrações de 1%, 3% e 5% (v/v). O *C. gloeosporioides* foi previamente ressuspendido em meio de cultivo NYDA e incubado a 25 °C por cinco dias. Após esse período, um disco micelial do fungo de 5 mm de diâmetro foi inserido no centro de cada placa contendo o meio NYDA acrescido das substâncias GRAS, nas três concentrações selecionadas. Para fins de controle, foram utilizadas placas de Petri

contendo o fitopatógeno sem a presença dos compostos GRAS. As culturas foram incubadas a 25 °C por 7 e 14 dias em BOD. O experimento foi realizado em triplicata com duas repetições independentes e o resultado foi obtido pela mensuração do diâmetro da colônia do fungo em comparação com o diâmetro crescido no tratamento controle (KARACA *et al.*, 2014).

#### Resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas

Utilizando as mesmas substâncias e concentrações selecionadas no ensaio anterior, procedeu-se à avaliação da sensibilidade do isolado LT 76. Esta levedura foi previamente cultivada em meio de cultura NYDA e incubada a 25 °C durante 48 horas. A levedura foi estriada em meio NYDA enriquecido de substâncias GRAS:

ácido acético, ácido lático, ácido propiônico, nas concentrações de 1, 3 e 5% para cada substância avaliada. As culturas foram mantidas sob incubação a 25 °C por 48 horas em BOD.

Este experimento foi realizado em duplicata com três repetições.

### Identificação molecular Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de extração de DNA com clorofórmio: álcool isoamílico, de acordo com a metodologia proposta por Ferreira *et al.*, (2019).

### Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

Os perfis genéticos da(s) levedura(s) isolada(s) serão obtidos pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2' na região do gene 28S que é um gene conservado utilizado para identificar espécies. Essa técnica é utilizada para facilitar a identificação das espécies de leveduras a nível específico. As amostras serão enviadas para sequenciamento no Laboratório de Ecologia, Taxonomia e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais. As sequências de

DNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (FERREIRA *et al.*, 2015).

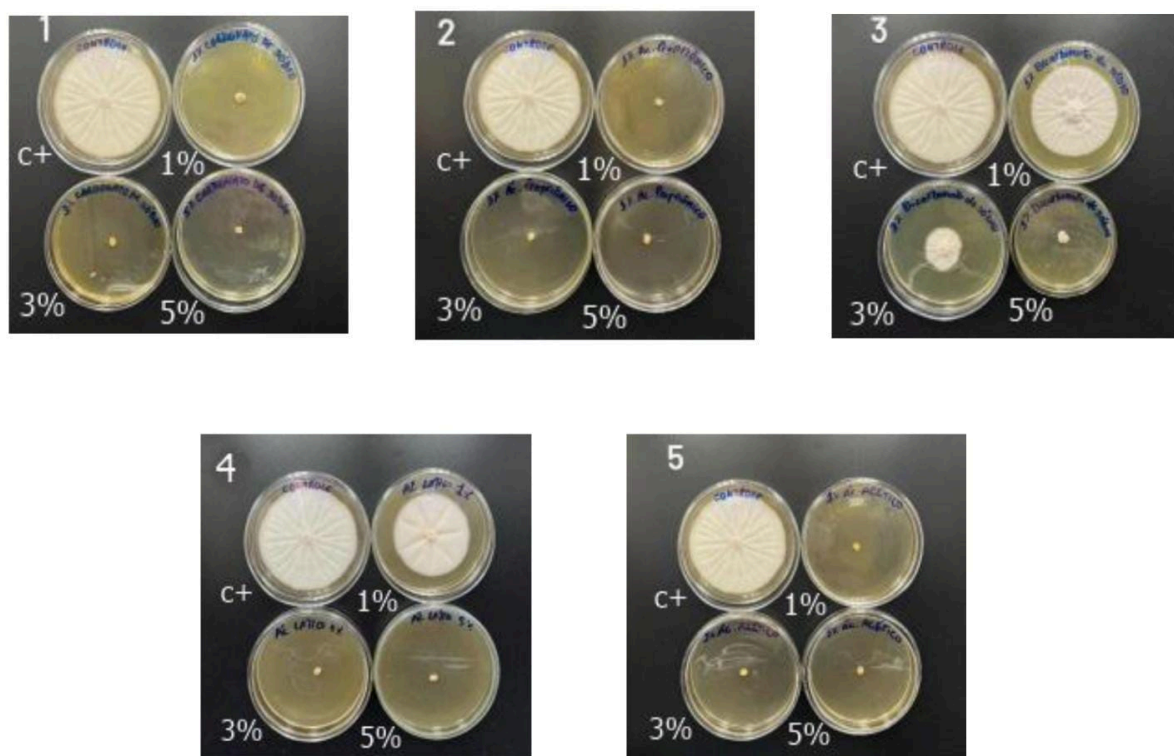
## DADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 150 cepas analisadas anteriormente, apenas a cepa LT 76 foi selecionada, destacando-se como promissora no que tange à sua capacidade de combater o fitopatógeno em questão, portanto, este isolado mostrou-se apto para a realização das outras etapas.

Foram preparadas soluções GRAS como ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio a fim de enriquecer os meios com diferentes concentrações dessas soluções (1%, 3% e 5%) para poder observar a resistência do fitopatógeno a esses meios enriquecidos, bem como a viabilidade da levedura LT 76 a essas substâncias GRAS.

Conforme demonstrado na figura 1, pode-se observar que o carbonato de sódio, o ácido acético e o ácido propiônico apresentaram resultados positivos quando comparados ao controle, alcançando 100% de inibição do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Por outro lado, o bicarbonato de sódio nas concentrações de 1 e 3% e o ácido láctico na menor concentração testada não inibiram significativamente o fitopatógeno durante 14 dias de incubação.

Figura 1: Efeito inibitório de substâncias GRAS contra o fitopatógeno *C. gloeosporioide* *in vitro* após 14 dias de incubação



Nº 1: Carbonato de sódio, Nº 2: Ácido propiônico; Nº 3: Bicarbonato de sódio; Nº 4: Ácido láctico. Nº 5: Ácido acético A ordem dos tratamentos para todos os números são: Controle, 1, 3 e 5% dos respectivos sais e ácidos testados.

As substâncias GRAS (Generally Recognized as Safe) são utilizadas como auxiliares na ação antagônica dos agentes biológicos, apresentando vantagens como disponibilidade, custo relativamente baixo e alta solubilidade em água (BADSHA *et al.*, 2022). Estas substâncias empregadas no presente estudo, foram previamente descritas na literatura por apresentarem atividade antifúngica.

De acordo com, Siddiqui e Ali (2014), cepas de *C. gloeosporioides* foram reduzidas em 75%, na presença do carbonato de sódio, sugerindo que esta substância tem uma ação antifúngica. Este achado corrobora a eficácia dos nossos resultados e demonstra a importância de um sal GRAS com propriedades antifúngicas, capaz de contribuir com o controle de doenças fúngicas e suplantar, em parte ou completamente, a utilização de fungicidas sintéticos.

O Carbonato de sódio se destacou como o mais acessível economicamente e efetivo nos testes realizados pelos autores. A menor concentração testada (1%) foi escolhida como a mais rentável para o produtor ou empresário que deseja utilizá-la no controle biológico, visto que apesar de todas as concentrações (1%, 3% e 5%) inibirem o patógeno, a menor concentração é a opção mais viável economicamente.

Em um estudo conduzido por Ferreira et al. (2015), foram avaliadas substâncias GRAS como possíveis agentes de controle de fungos fitopatogênicos que causam danos pós-colheita de frutos. De acordo com os resultados, o carbonato de sódio, utilizado em concentrações específicas, inibiu completamente o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

No que tange a resistência da levedura LT 76, foram utilizadas as mesmas substâncias e concentrações do ensaio supracitado. A cepa LT 76 demonstrou sensibilidade aos ácidos acético e propiônico em todas as concentrações testada, por outro lado, esta levedura demonstrou resistência ao ácido láctico na menor concentração utilizada (1%). Em relação aos sais, o carbonato de sódio e ao bicarbonato de sódio, a LT 76 apresentou crescimento nas concentrações 1% e 3%, apresentando certa sensibilidade na concentração de 5% conforme demonstrado na Tabela 2.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Tabela 2: Análise da resistência do isolados de LT 76 crescido em meio enriquecido com GRAS em três concentrações diferentes.

Levedura	Concentrações	A.P	A.AC	A.L	B.S	C.S
LT 76	1%	-	-	+	+	+
	3%	-	-	-	+	+
	5%	-	-	-	-	-

(+) Resistente a substância GRAS; (-) Sensível a substância GRAS; A.P: Ácido Propiônico; A.AC: Ácido Acético; A.L: Ácido Lático; B.S: Bicarbonato de Sódio e C.S: Carbonato de Sódio.

Mesmo os ácidos sendo considerados substâncias GRAS, estes apresentaram um odor quando adicionado ao meio de cultura durante a realização dos ensaios, o que poderia também causar ao fruto, não sendo uma característica desejada pelo estudo.

Em relação aos sais, o carbonato e o bicarbonato de sódio estes não demonstraram impedimento para o desenvolvimento da LT76, mesmo nas menores concentrações testadas. Portanto, experimentos futuros devem ser realizados a fim de verificar a associação de substâncias GRAS com a LT76 no controle do fitopatógeno visando uma maior redução em doenças pós-colheita.

O perfil genéticos da levedura LT 76 foi obtido pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2' na região do gene 28S do rDNA (gene conservado utilizado para identificar espécies), no entanto, a levedura LT76 demonstrou uma baixa similaridade genética (93,42%) com a cepa tipo *Pichia kudriavzevii*, sendo necessário realizar novas extrações do DNA

genômico e novas reações da PCR com o intuito de aumentar a similaridade genética para a confirmação da espécie.

Na literatura existem relatos que a levedura possui um potencial de biocontrole em pós- colheita, como descrito por Chi et al, 2015 e Liu et al., 2020. Em 2015, Chi e colaboradores isolaram

a levedura *P. kudriavzevii* da superfície do fruto kiwi e observaram que este isolado conseguiu inibir significativamente os patógenos *Botrytis cinerea* e *C. gloeosporioides*, fungos causadores de doenças pós-colheita no fruto pera e ressaltaram a importância de soluções sustentáveis e ecológicas para estas doenças.

Liu e colaboradores, em 2020, verificaram que cepas de *P. kudriavzevii* controlaram efetivamente a doença do mofo cinzento causada por *B. cinerea* em maçãs, sugerindo estas leveduras como agentes eficazes de biocontrole em pós-colheita. Portanto, novos estudos devem ser realizados para o melhor conhecimento sobre a ação da levedura no controle de fitopatógenos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado revelou que a levedura isolada do fruto tucumã (LT76) apresenta potencial como agentes de biocontrole contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides*, responsável pela antracnose em mangas. Entre as substâncias GRAS avaliadas, o carbonato de sódio ácido acético e o ácido propiônico, destacaram-se pela eficácia em inibir o crescimento do patógeno, já a cepa LT 76, demonstrou sensibilidade aos ácidos acético e propiônico em todas as concentrações testadas, sugerindo que este composto pode ser uma alternativa sustentável aos fungicidas químicos convencionais.

A confirmação da identificação molecular da levedura LT76, deve ser de grande valia para poderem complementar as estratégias de



controle biológico, promovendo uma agricultura mais sustentável e eficiente.

## REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, D. B. *et al.* Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. **Food Chemistry**, v. 298, p. 124958, 2019.

BADSHA, I *et al.* Polylysine: Natural Peptides as Antimicrobial Agents. A Recent Scenario in Food Preservation. **Handbook of Nutraceuticals and Natural Products: Biological, Medicinal, and Nutritional Properties and Applications**, v. 1, p. 257-272, 2022.

BRAGA, A. R. C. *et al.* Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312-314, 2020.

CARVALHO, K. P. *et al.* Intoxicações exógenas por agrotóxicos no Espírito Santo, 2007-2016: distribuição espacial e tendências da taxa de incidência e letalidade dos casos notificados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, 2022.

CHI, Mengshan *et al.* Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. **Biological Control**, v. 90, p. 113- 119, 2015.

CORRÊA, T. M. **Estratégia de controle de podridão mole (*Rhizopus Stolonifer*) em uva (*Vitis Vinifera* brs Carmem)**. 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11612/2698> Acesso em: 11/05/2023.

DURAN, M. *et al.* Potential of antimicrobial active packaging 'containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating' to extend shelf life of fresh strawberry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 354-363, 2016.

ECULICA, J. F.; DOMINGOS, I. F. N.; SERRANO, L. R. P. Efficiency of aqueous extract of the leaves of *ricinus communis* L. in the control of the lagarta *spodoptera frugiperda* (Original). Redel. **Revista Granmense de Desarrollo Local**, v. 5, n. 4, p. 342-352, 2021.

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. **Journal of Berry Research**, v. 6, p. 47-63. 2016.

FONTANA, D. C. *et al.* Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108980, 2021.

FREIMOSER, F. M. *et al.* Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1-19, 2019.

JOHN, D. A.; BABU, G. R. Lessons from the aftermaths of green revolution on food system and health.

**Frontiers in sustainable food systems**, v. 5, p. 644559, 2021.

KARACA, H. *et al.* Evaluating food additives as antifungal agents against *Monilinia fructicola* in vitro and in hydroxypropyl methylcellulose- lipid composite edible coatings for plums. **International Journal of Food Microbiology**. v. 179, p. 72-79, 2014.

LIU, Xia *et al.* *Pichia kudriavzevii* retards fungal decay by influencing the fungal community succession during cherry tomato fruit storage. *Food Microbiology*, v. 88, p. 103404, 2020.

MELO, T. A. *et al.* Efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e na resistência induzida de quiabeiros à fusariose. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e7110212357-e7110212357, 2021.

OLIVEIRA, T. S. *et al.* Anthracnose Controlled by Essential Oils: Are Nanoemulsion-Based Films and Coatings a Viable and Efficient Technology for Tropical Fruit Preservation?. *Foods*, v. 12, n. 2, p. 279, 2023.

PIMENTA, R.S. *et al.* New Brazilian Law May Put food production safety in check. *Public Health*. v. 167, p. 159-160, 2019.

REZENDE, D. C. *et al.* Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 10, p. e5369108822-e5369108822, 2020.

SANCHEZ, A. D. *et al.* Biological control of *Phytophthora* collar rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. *Biological Control*. v. 135, p. 124-134, 2019.

SANTOS, D. C. *et al.* Extension of Solanaceae food crops shelf life by the use of elicitors and sustainable practices during postharvest phase. *Food and Bioprocess Technology*, v. 15, n. 2, p. 249-274, 2022.

SIDDIQUI, Y; ALI, A. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In: *Postharvest Decay*. Academic Press, 2014. p. 337-371.

SOUZA, M. C. *et al.* Application of biopolymers to preserve '*Pseudomonas fluorescens*' cells and their efficiency in the biological control of '*Macrophomina*' sp. *Australian Journal of Crop Science*, v. 16, n. 2, p. 280-285, 2022

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil

## Capítulo 6

### Identificar e avaliar o potencial probiótico das leveduras isoladas do fruto Amazônico Tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

João Guilherme da Silva Araújo<sup>1</sup>

Thais Costa Santos<sup>2</sup>

Juliana Fonseca Moreira da Silva<sup>3</sup>

#### RESUMO

A região amazônica, rica em biodiversidade, abriga plantas frutíferas com grande potencial econômico e tecnológico, como o tucumã (*Astrocaryum vulgare*). Pouco explorado, este fruto apresenta oportunidades para a bioprospecção de microrganismos com potencial probiótico. Neste estudo, 158 leveduras isoladas do tucumã foram reativadas, das quais 149 (94%) estavam viáveis. Destas leveduras, apenas uma (LTC 24) esteve apta a passar pelos testes para investigar seu potencial probiótico como testes de virulência, que comprovaram que esta não é capaz de produzir fatores. Além do teste de armazenamento e viabilidade no processo de liofilização após uso de crioprotetores. Ao final, a levedura identificada molecularmente foi a *Meyerozyma guilliermondii*, amplamente conhecida por sua aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** Tucumã; Potencial probiótico; Biotecnologia.

---

<sup>1</sup> Graduando em Medicina, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins,  
silva.araujo@mail.uft.edu.br.

<sup>2</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins,  
thais.costa1@uft.edu.br

<sup>3</sup> Doutora em Microbiologia, Universidade Federal do Tocantins,  
julianafmsilva@uft.edu.br.

## INTRODUÇÃO

A região amazônica possui uma reserva nativa rica em uma diversidade de plantas frutíferas que apresentam grande potencial econômico, tecnológico e nutricional, no qual tem despertado interesse nas indústrias de alimentos, fármacos, cosméticos e aromatizantes (Cunha Junior et al., 2020). Esse interesse é devido a uma variável possibilidade de bioprospecção, tanto para o estudo de novas substâncias, como também para a obtenção de novos microrganismos que possam apresentar diversas aplicabilidades (Chang et al., 2018).

Dentre essa biodiversidade, os frutos regionais ainda são pouco explorados, como é o caso do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) que pertence à família *Arecaceae* (com dimensões de 10 a 25 metros de altura e 15 a 30 centímetros de diâmetro), seus frutos são drupas ovóides lisas com 5 a 6 centímetros de diâmetro e massa média de 70 gramas por unidade, apresentando tons de amarelo e vermelho (Carneiro et al., 2017; Silva et al., 2018), possuem frações comestíveis e não comestíveis com potencial uso tecnológico e medicinal demonstrando diversas aplicações, no entanto é importante o estudo da microbiota autóctone presente durante a fermentação espontânea, sobretudo para a avaliação do potencial probiótico de novos microrganismos associados a frutos disponíveis na região amazônica (Silva et al., 2015; Chang et al., 2018).

No que se refere à ecologia microbiana autóctone do tucumã, poucos estudos foram realizados até o momento, possibilitando a descobertas de novos microrganismos que possam apresentar potencial probiótico (Chang et al., 2018). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados regularmente e em quantidades adequadas, fornecem benefícios à saúde de quem os consome (FAO/OMS, 2002; Rizzoli; Biver, 2020).

O impacto de probióticos na saúde humana tem direcionado o desenvolvimento econômico de produtos que os contêm, compreendendo entre 60% a 70% de todo o mercado de alimentos funcionais. Sendo estes microrganismos aqueles que atingem as áreas finais do trato digestivo, exercendo um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, seja ele humano ou animal (Baliza et al., 2018; Neme; Monserrat, 2020, Machado et al., 2022).

Atualmente, vários microrganismos do grupo de bactérias designadas como do “ácido láctico” (BAL), estão presentes na maioria das preparações com probióticos. Entretanto, outros micro-organismos como a levedura *Saccharomyces boulardii* é utilizada como probiótico, sendo praticamente a única levedura comercializada em medicina. No entanto, outras leveduras de origem ambiental (fauna e flora) ou agroindustrial com propriedades bioterapêuticas similares ou até melhores, certamente existem, principalmente considerando a rica biodiversidade encontrada nos ecossistemas microbianos brasileiros (Ferreira et al., 2018; Brandão et al., 2017; Coutinho et al., 2021).

Baseado nessas evidências, o presente trabalho tem como objetivo identificar as leveduras provenientes da fermentação espontânea do fruto tucumã e avaliar o seu potencial probiótico, bem como verificar a possibilidade de aplicação biotecnológica.

## MÉTODO E MATERIAIS

**Reativação e purificação de leveduras do fruto amazônico tucumã (*Astrocaryum vulgare*).**

Após teste preliminares realizados anteriormente para verificação do potencial probiótico apenas a levedura LTC 24 obteve êxito, no entanto, esta levedura foi reativada e verificada a sua pureza, em ágar YMA (Yeast Malt Agar – 2% de glicose, 0,5% de peptona, 0,3% extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 2% de ágar, 0,02% cloranfenicol). Após o crescimento, a levedura foi novamente incubada por 48 horas a

37°C, 1 mL desse caldo foi transferido para tubos criogênicos estéreis com adição de 20% de glicerol estéril. Esses tubos foram estocados em ultra-freezer a uma temperatura de 80°C negativos, na Coleção de Microrganismos Carlos Augusto Rosa presente no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada, Universidade Federal do Tocantins. (Ferreira *et al*, 2019).

### **Avaliação dos fatores de Virulência**

Após a reativação a levedura foi submetida a avaliação dos fatores de virulência como descrito abaixo.

#### **Gelatinase**

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra *et al.*(2007). O microrganismo em estudo foi inoculado em tubo contendo 4 mL de caldo YPD com 12% de gelatina por 48h a 37°C. Após a incubação, o tubo foi destinado ao banho de gelo por um período de 30 minutos, sem agitação. Utilizou-se como controle positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido ou positivo: meio líquido. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

#### **Produção de lipase**

A produção de lipase foi realizada de acordo com Barbosa *et al.* (2010). Alíquotas de 2 µL do sobrenadante bruto de cada cultura serão semeados pontualmente em placas contendo Ágar YPD suplementado com 2g.L-1 de Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) e 10g.L-1 de Tween 80 e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.



### DNase

A atividade de DNase foi testada como descrita por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o Ágar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil). O microrganismo isolado foi estriado diretamente na placa contendo Ágar DNase e incubado à 37°C por 24h. Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1N por 3 min. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerada ou não, indicativo de resultado positivo. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### Atividade Hemolítica

A levedura foi testada quanto à atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno *et al.* (2003), utilizando Ágar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubação a 37°C por 48h. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma:  $\alpha$ -hemólise= linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias;  $\gamma$ -hemólise= não produziram qualquer efeito sobre as placas de Ágar Sangue (foram consideradas não hemolíticas). Linhagens, que apresentaram zonas de lise de sangue ao redor das colônias, foram classificadas como  $\beta$ -hemólise (hemolíticas). O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

### Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de extração de DNA com clorofórmio: álcool isoamílico, de acordo com a metodologia proposta Ferreira *et. al*, 2019.

## Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

O perfil genético da levedura isolada foi obtido pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2 na região do gene 28S que é um gene conservado utilizado para identificar espécies. Essa técnica é utilizada para facilitar a identificação das espécies de leveduras a nível específico. A amostras foi enviada para sequenciamento no Laboratório de Ecologia, Taxonomia e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais.

As sequências de DNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Ferreira *et al.*, 2019).

### Propriedades tecnológicas

Todo o experimento foi conduzido em triplicata e com dois experimentos independentes.

### Liofilização e armazenamento e viabilidade das leveduras

A biomassa de levedura a ser submetida ao processo de liofilização foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos, lavada e ressuspendida em 5mL de água destilada estéril e em seguida, adicionado os seguintes crioprotetores: glicose, quitosana, a qual foi diluída utilizando ácido acético até atingir pH 3 sob agitação constante, leite desnatado utilizando uma concentração de 10% (p/V),

após isso a mistura foi homogeneizada por agitação em vórtex durante 3 minutos. A solução resultante foi fracionada em frascos de vidro adequados para liofilização, em volumes de 5 mL.

Os frascos, tipo penicilina, contendo a levedura e a solução crioprotetora foram congelados utilizando nitrogênio líquido (NL 2) seguidos pela liofilização utilizando os procedimentos descritos por Kirsop (1984) e Chang & Elander (1986). O processo de liofilização ocorreu a uma temperatura de -40 °C, durante 46h, utilizando o equipamento Enterprise I (Terroni equipamentos científicos).

Após a conclusão da liofilização, os frascos foram hermeticamente fechados e armazenados sob refrigeração, a uma temperatura de 5 °C, até o momento de utilização. A viabilidade celular foi avaliada antes do congelamento, após o congelamento, 24h da liofilização, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias realizando-se a diluição das células liofilizadas em solução salina e inoculação em placas de Petri contendo Ágar YPD, a 37 °C por 48h e em seguida realizada a contagem das colônias formadas (VIGANÓ et al., 2012; FREITAS et al., 2017).

### Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey em nível de confiança de 95%, *software* estatístico utilizado será o *Statistica 7.0*.

### DADOS E DISCUSSÃO

Foram reativadas 158 leveduras previamente isoladas do fruto tucumã (*Astrocaryum vulgare*), estas foram submetidas previamente a avaliação das propriedades funcionais *in vitro*, para verificar, o potencial probiótico dos isolados, após esta avaliação, a levedura (LTC 24) mostrou-se apta a realizar os testes de virulência.

De acordo com os testes de virulência, a levedura LTC 24 não apresentou secreção de enzimas extracelulares (gelatinases), como

também não ocorreu a formação de halo que indicasse atividade lipolítica. Em relação aos testes da produção de DNase, não se observou formação de halo indicativo da atividade de produção de DNase. Quanto à atividade hemolítica, nos testes realizados, obteve-se que a levedura testada não foi capaz de degradar o ágar sangue, o que se manifesta pela não formação de halos ao redor dos inóculos ( $\gamma$ -hemólise), ou seja não apresentou atividade hemolítica.

Assim, os resultados obtidos estão em consonância com a caracterização de leveduras probióticas, como a preconizada por Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater (2021) em que pontuam a necessidade de biossegurança em microrganismos probióticos, onde as cepas não devem produzir toxinas, exibir patogenicidade e apresentar atividade metabólica perigosa.

Quanto à identificação molecular e subsequente sequenciamento do genoma, a levedura LTC 24 demonstrou uma correspondência genética de 99% com a espécie tipo depositada no banco de dados GenBank: *Meyerozyma guilliermondii*. Este microrganismo é conhecido por sua ampla aplicação biotecnológica, dentre as quais estão a biotransformação do xilitol e produção de algumas enzimas como inulinase e lipase. A *M. guilliermondii* também se mostra eficaz no controle biológico de frutas e vegetais (Wei Yan, 2021). No entanto, apesar de ser isolado do ambiente, pele e mucosa de seres humanos como uma microflora saprófita, este microrganismo pode assumir caráter oportunista em indivíduos com fatores de risco como quimioterapia, imunodeficiência, cirurgias gastrointestinais e cardíacas e em pessoas com desordens oncológicas (Ghasemi, 2022). Portanto, visando a biossegurança seriam necessários mais testes para o uso como probióticos em indivíduos saudáveis como forma de descartar ou não sua viabilidade.

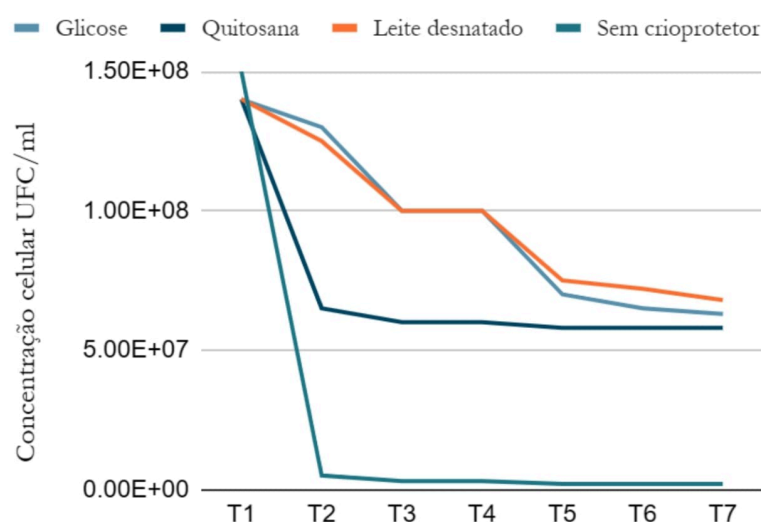
Já no teste de liofilização a LTC 24 apresentou uma redução da concentração celular logo após o congelamento em nitrogênio líquido independente do crioprotetor utilizado. Ao comparar a concentração

celular inicial da levedura observou-se uma redução bastante significativa na concentração de células do microrganismo quando submetida ao congelamento sem algum crioprotetor demonstrando que não seria capaz de se manter viável após o processo de liofilização (figura 1).

O uso de crioprotetores nos processos de congelamento tem por objetivo proteger os microrganismos, impedindo a formação de cristais de gelo que possam surgir durante o congelamento, o que levaria ao rompimento da membrana plasmática da célula, e consequentemente, à uma diminuição da viabilidade celular e a morte do microrganismo.

Com relação aos crioprotetores utilizados, a LTC 24 apresentou respostas semelhantes aos diferentes materiais utilizados com melhor desempenho ao uso da glicose e leite desnatado na concentração de 10%, conforme demonstrado na figura 1. Na literatura, Stefanello et al (2019) e Freitas et al (2020) descrevem estas duas matérias supracitadas como bons crioprotetores na conservação da viabilidade das leveduras no processo de liofilização.

Figura 1. Viabilidade em UFC/mL da levedura (LTC 24) isolada do fruto tucumã, utilizando ou não os seguintes crioprotetores a 10%: glicose, quitosana e leite desnatado.



T1= antes do congelamento; T2= após o congelamento; T3= 24h após liofilização; T4= 7 dias após liofilização; T5= 14 dias após liofilização; T6= 21 dias após liofilização; T7= 30 dias após liofilização.

A composição do meio empregado no congelamento é uma das condições para o êxito da criopreservação. Os agentes crioprotetores atuam para minimizar o estresse físico e químico causado pelo congelamento e pelo degelo das células (SAEKI et al., 2015; SILVA et al., 2014). No presente estudo, essa relação ficou evidenciada, uma vez que, a glicose e o leite desnatado a 10% mostraram serem eficientes para a preservação da levedura estudada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nos testes de virulência, a LTC 24 não apresentou secreção de gelatinase, atividade lipolítica, produção de DNase e atividade hemolítica.

- A identificação molecular da LTC 24 indicou uma correspondência genética de 99% com *Meyerozyma guilliermondii*.
- A glicose e o leite desnatado na concentração de 10% demonstraram ser eficiente como crioprotetores para a levedura LTC 24 no processo de liofilização.

## REFERÊNCIAS

- BALIZA, D. D. M. S.; SILVA, J. F. M. da; PIMENTA, R. S.. Evaluation of the applicability of a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae* in cereal bars. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.
- BANNERMAN, T. M. *Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. In P. R. Murray (org.), **Manual of clinical Microbiology**, Washington, DC: ASM Press. 2003. P. 384-404.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v. 21, p. 651-656, 2010.
- BRANDÃO, L. R., et al..Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes.**Fungal Ecology**, v. 28, p. 33-43, 2017.
- BOLLA, P. A., SERRADELL, M. A., URRIZA, P.J., ANTONI, G.L. Effect of freeze drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 15-22, 2011
- CARNEIRO, A.B.A.; PINTO, E.J.S.; RIBEIRO, I.F.; MAGALHÃES, M.R.G.; NETO, M.A.B.M.Effect of *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) on doxorubicin

toxicity: in vivo experimental model. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 30, n. 3, p. 233, 2017.

CHANG, L.S.; KARIM, R.; MOHAMMED, A.S.; GHAZAI, H.M. Characterization of enzyme- liquefied soursop (*Annona Muricata* L.) puree. *LWT - Food Science and Technol.*, v. 94, p. 40-49, 2018.

COUTINHO, O. P. A. J. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021 Oct;13(5):1338-1354. doi: 10.1007/s12602-021- 09758-8. Epub 2021 Mar 23. PMID: 33759043.

CUNHA JÚNIOR, J. B.; TAVARES, L. B. Fenologia do Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* [Willd. Ex. Spreng.] Schum.) em um sistema agroflorestal, submetido à diferentes lâminas de irrigação no município de Castanhal, Pa., 52f. **Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Florestal)** - Universidade Federal da Amazônia, Belém, 2020.

FERREIRA, E. M. S.; MALTA, C. M.; BICALHO, J. O.; PIMENTA, R. S. A safe method to control the anthracnose in papaya. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 40, 2018.

FERREIRA, E. M. S.; SOUSA, F. M. P.; ROSA, L. H.; PIMENTA, R. S. Taxonomy And Richness Of Yeasts Associated With angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. *Extremophiles*, v. 23, n. 1, p. 151-159, 2019.

FREITAS, A. B. et al. Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* após liofilização. *Ciência Animal Brasileira*, v. 21, p. e-47464, 2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations And World Health Organization (FAO/OMS). Health and nutritional properties probiotics in food including powder milk with live lactic acid



bacteria. *World Health Organization*[online], [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf) (2001).

FOULQUIÉ-MORENO, M. R. et al. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 214- 229, 2003.

GHASEMI, R. et al. *Meyerozyma guilliermondii* species complex: review of current epidemiology, antifungal resistance, and mechanisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 53, p. 1761-1779, 2022.

SILVA, J. F. M. et al..Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains.*The Scientific World Journal*, v. 2015, p. 1-8, 2015.

SILVA, R.S.; et al..Physicochemical Properties Of tucumã (*Astrocaryum maculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers. *LWT*, v. 94, p. 79-86, 2018.

MACHADO, A. P. F et al...Brazilian tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum maculeatum*) and tucumã- do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits, and technological potential. *Food Research International*, v. 151, p. 110902, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110902>.

NEME, E.; MONSERRAT, S. Evaluación del comportamiento de bacterias potencialmente probióticas medio de cultivo suplementado con pectina cítrica. *Revista agronómica del noroeste argentino*, v. 40, n. 1, p. 23-30, 2020.

RIZZOLI, René; BIVER, Emmanuel. Are probiotics the new calcium and vitamin D for bone health?. *Current Osteoporosis Reports*, v. 18, n. 3, p. 273-284, 2020.

STANISZEWSKI, A.; KORDOWSKA-WIATER, M. Probiotic and potentially probiotic yeasts – characteristics and food application. *Foods*, v. 10, 1306, 2021.

STEFANELLO, R. F. et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, v. 115, p. 90-94, 2019.

WEI YAN et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances*, v. 46, p. 107674, 2021.

#### FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil”.

## Capítulo 7

### Leveduras obtidas do fruto da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) Associadas a substâncias gras no controle da Antracnose em manga (*Mangifera indica*)

Ester Campos da Silva <sup>1</sup>

Catiele Silva de Oliveira<sup>2</sup>

Juliana Fonseca Moreira da Silva<sup>3</sup>

Raphael Sanzio Pimenta<sup>4</sup>

#### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de leveduras obtidas do fruto amazônico Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em associação com substâncias GRAS (Generally Recognized As Safe) para o controle da antracnose em mangas (*Mangifera indica*), causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Inicialmente, foram realizados testes prévios que triaram duas cepas de leveduras (LP73 e LP101) de acordo com características como: capacidade de produção de compostos antifúngicos difusíveis e voláteis. Posteriormente, foram testadas cinco substâncias GRAS, como ácidos orgânicos e sais, na inibição do crescimento do fungo *C. gloeosporioides* e na resistência da levedura a estas substâncias. O carbonato de sódio, o ácido acético e o ácido propiônico que inibiram 100% o fitopatógeno nas concentrações testadas (1,3 e 5%). O isolado LP 101 apresentou resistência as mesmas substâncias que inibiram o *C. gloeosporioides*. No que se refere a identificação molecular, ficou evidente a necessidade de uma identificação precisa da espécie a fim de evitar fungemia em humanos. se utilizada como controle biológico.

**Palavras-chave:** Pupunha; Leveduras; Controle Biológico; Antracnose.

---

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina, Pibic/FAPT, Universidade Federal do Tocantins,  
ester.campos@mail.uft.edu.br

<sup>2</sup> Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins,  
catielesilva162016@gmail.com

<sup>3</sup> Doutora em Microbiologia, curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins,  
julianafmsilva@uft.edu.br

<sup>4</sup> Doutor em Microbiologia, Curso de Medicina, Universidade Federal do Tocantins,  
biorapha@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

As doenças pós-colheita apresentam grande relevância devido aos danos econômicos que propiciam. Estima-se que cerca de 5 a 20% de todos os alimentos produzidos são deteriorados e perdidos pela ação de microrganismos. Esses índices apresentam-se ainda mais elevados em países em desenvolvimento ou emergentes como o Brasil, podendo atingir cifras da ordem de 30% ou mais da produção (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A redução das perdas pós-colheita na cadeia produtiva representa um constante desafio, visto que frutos são órgãos que apresentam um alto teor de água e nutrientes e seus vários processos biológicos continuam em atividade mesmo após a colheita, apresentando assim maior predisposição a distúrbios fisiológicos e ocorrência de podridões (KADER, 2002). O uso de fungicidas químicos ainda é um dos métodos mais utilizados para este controle biológico (PIMENTA *et al.*, 2019).

Dentre os métodos alternativos para a substituição desses produtos, podemos destacar o uso do controle biológico, que é definido como o método que utiliza uma ou mais espécies antagonistas de microrganismos, objetivando-se a redução da densidade de inóculos ou das atividades produtoras de enfermidades de organismos patogênicos (FERREIRA *et al.*, 2015).

Diversos microrganismos podem ser utilizados na aplicação de controle biológico, todavia o uso de leveduras biocontroladoras tem se destacado devido a características como: estarem presentes naturalmente nas superfícies dos frutos, não produzirem esporos ou

micotoxinas, possuírem pouca demanda nutricional levando uma rápida colonização na superfície de frutos, e serem tolerantes ao estresse gerado pelo uso de fungicidas, além de poderem ser obtidas de variadas amostras e ambientes (FREIMOSER *et al.*, 2019; SANCHEZ *et al.*, 2019).

Geralmente, a eficácia do controle biológico clássico pode ser melhorada pela combinação da utilização de leveduras antagônicas com a implementação de substâncias GRAS (Generally Recognized As Safe), que são definidos como produtos de baixa toxicidade e, normalmente, são aplicados como conservantes de alimentos. As substâncias GRAS, são consideradas seguras para consumo humano, também sendo analisadas, normalmente, por apresentar potencial antifúngico. E por serem substâncias isentas de intolerâncias de resíduos em todas as commodities agrícolas pelo Food and Drug Administration (FDA) (CORRÊA, 2020).

A manga é considerada uma fruta climatérica, ou seja, que continua o seu processo de amadurecimento mesmo após colheita, esse procedimento normalmente ocorre entre três a oito dias, dependendo das condições do ambiente em que a fruta se encontra armazenada. No armazenamento, a manga torna-se suscetível à infecção por patógenos que tem como consequência a podridão em frutos (BLANCAS-BENITEZ *et al.*, 2022).

Uma das principais espécies de fungos que acometem os frutos da mangueira na fase pós-colheita é o *Colletotrichum gloeosporioides* (MELO *et al.*, 2021). Esse fungo, quando entra em contato com o fruto, pode evoluir para uma doença chamada de antracnose, que ocasiona podridão no fruto (REZENDE *et al.*, 2020). Essa doença é conhecida mundialmente, principalmente por infectar frutos de origem tropicais como mamão, uva, amoras, morangos, (OLIVEIRA *et al.*, 2019), entre outras. O *C. gloeosporioides* apresenta

maior prevalência em mangas cultivadas e armazenadas em regiões de áreas com climas quentes e úmidos (UDDIN *et al.*, 2018).

Com isso, o presente estudo objetivou a utilização dessas leveduras já pré-selecionadas em protocolos clássicos de biocontrole e/ou integrado a substâncias GRAS contra a doença antracnose pós-colheita em *Mangifera indica*.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Reativação das leveduras

As leveduras previamente isoladas do fruto amazônico pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), pré selecionadas em testes anteriores, foram reativadas em meio líquido GYMP (1% extrato de levedura; 0,5% Peptona; 1% glicose; 0,02% fosfato de sódio monobásico) por 48 h a 25° C. Em seguida, foram repassadas na forma de estrias ao meio NYDA-Agar Nutriente Dextrose de Levedura, (0,3% extrato de carne, 0,5% extrato de levedura, 0,5 % peptona, 1% glicose e 1,8% ágar), onde foram incubadas por 48 h a temperatura de 25°C. Posteriormente a reativação dos isolados, foi observado a pureza de suas colônias, e realizado o preparo das lâminas de cada isolado, para verificação de possíveis contaminações e confirmação das características micromorfológicas de cada isolado.

### Obtenção do fungo fitopatógeno

O *Colletotrichum gloeosporioides*, um fungo fitopatógeno, foi obtido a partir da coleção de culturas Carlos Rosa do laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), cepa cedida pelo Laboratório de Mecanismos de Infecções Fúngicas da UFMG. Para a reativação, foi retirado um disco com micélio fúngico de uma cultura que estava armazenada a -20°C em freezer. Posteriormente, este foi transferido e reativado em meio de

cultu Ágar Batata Dextrose (BDA), com tempo de incubação de sete dias a 25°C de temperatura.

**Atividade inibitória de substâncias GRAS *in vitro* ao fitopatógeno  
*Colletotrichum gloeosporioides***

As ações do ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, bicarbonato de sódio, e carbonato de sódio no desenvolvimento micelial radial de *Colletotrichum gloeosporioides* foram analisados segundo a metodologia de Karaca et al. (2014) com algumas modificações. Placas de Petri foram previamente preparadas com meio NYDA e enriquecidas com ácidos e sais nas concentrações de 1, 3e 5% (v/v). O fungo *C. gloeosporioides* foi previamente ressuscitado em meio de cultivo NYDA e incubado a 25°C em BOD por 24 horas.

Após esse período, um disco micelial do fungo de 5 mm de diâmetro foi inserido no centro de cada placa contendo o meio NYDA acrescido das substâncias GRAS, em três concentrações selecionadas anteriormente. Para o controle positivo foram utilizadas placas com meio NYDA contendo o fitopatógeno, porém sem a presença dos compostos GRAS. As culturas foram incubadas a 25°C por 72 horas.

Este experimento foi realizado em triplicata com duas repetições independentes, e o resultado obtido pela medição do diâmetro da colônia do fungo e, comparado com o diâmetro da cultura do tratamento controle. Os resultados obtidos foram representados pela porcentagem de inibição do crescimento micelial:  $[(dc-dt) / dc] \times 100$ , onde  $dc$  = é a média do diâmetro da colônia de fungos nas placas de controle e  $dt$  = é o diâmetro médio da colônia de fungos em placas acrescidas das substâncias GRAS (KARACA et al., 2014).

**Resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas**

As mesmas substâncias empregadas para testar a resistência do fitopatógeno, foram utilizadas para à avaliação da sensibilidade das

leveduras selecionadas isoladas do fruto pupunha. Estas foram previamente cultivadas em meio NYDA e incubadas a 25°C durante 48 horas. Com o auxílio de uma alça, as leveduras serão repicadas em meio NYDA acrescido das substâncias GRAS: ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, nas concentrações de 1%, 3% e 5% para cada substância testada. As culturas serão mantidas sob incubação a 25°C em BOD por 5 dias. O experimento foi realizado em triplicata com duas repetições independentes.

#### Identificação molecular

- **Extração de DNA**

A extração de DNA genômico foi baseada no protocolo de extração de DNA com clorofórmio: álcool isoamílico, conforme a metodologia proposta por Ferreira et al., (2015).

- **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento**

O perfil genético da levedura isolada foi obtida pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), que se anelam nos domínios D1-D2' na região do gene 28S do rDNA que é um gene conservado utilizado para identificar espécies. Essa técnica é utilizada para facilitar a identificação das espécies de leveduras a nível específico. As amostras foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Ecologia, Taxonomia e Biotecnologia de Fungos da Universidade Federal de Minas Gerais. As sequências de DNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados GenBank utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (BLAST disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (FERREIRA et al., 2019).



### Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey em nível de confiança de 95%, software estatístico utilizado será o Statistica 7.0

## DADOS E DISCUSSÃO

### Reativação e seleção das leveduras

Foram realizados testes prévios nas leveduras isoladas do fruto Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) visando observar a capacidade de potencial antagonico ao fitopatógeno, tais como: crescimento e armazenamento dos isolados em diferentes temperaturas de crescimento; Capacidade de produzir enzimas pectinolíticas e celulolíticas; Capacidade de produção de compostos antifúngico difusíveis e voláteis. Após esta triagem apenas 2 leveduras (LP 73, LP 101) foram escolhidas para prosseguir nos experimentos por apresentaram potencial de controlar o fungo causador da antracnose.

### Atividade inibitória de substâncias GRAS in vitro ao fitopatógeno

#### *Colletotrichum gloeosporioides*

As substâncias GRAS desempenham um papel essencial na inibição de microrganismos em diversas aplicações industriais e alimentícias. Neste estudo, foram utilizados dois sais amplamente reconhecidos: o carbonato de sódio e o bicarbonato de sódio, ambos valorizados por suas propriedades alcalinizantes, que ajudam a criar ambientes adversos ao crescimento microbiano (De Oliveira et al., 2020) e os ácidos propiônico, acético e lático, também considerados GRAS, são conhecidos por suas amplas propriedades antimicrobianas, capazes de suprimir uma vasta gama de patógenos (Silva et al., 2019; Johnson & Case, 2021).

Adicionalmente, os três compostos orgânicos voláteis foram empregados devido à sua comprovada eficácia na preservação de alimentos e na inibição de fungos e bactérias. O ácido propiônico e o ácido acético demonstraram ser bastante eficazes contra o fitopatógeno, por outro lado, o ácido lático inibiu o crescimento fúngico, nas maiores concentrações testados (3 e 5%) quando expostos a 7 dias, sendo que, no décimo quarto dia de experimento, a substância não apresentou eficiência no crescimento do fitopatógeno, conforme apresentado na tabela 1.

No que tange à atividade inibitória dos sais, o carbonato de sódio apresentou resultados positivos significativos no crescimento do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, atingindo 100% de inibição, durante todos os dias do experimento (14 dias) e em todas as concentrações testadas (1, 3 e 5%). Já o bicarbonato de cálcio apresentou inibição fúngica somente na maior concentração testado durante todo o experimento (14 dias), dados apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Efeito das substâncias GRAS no desenvolvimento das colônias de *Colletotrichum Gloesporioide* após 7 e 14 dias de crescimento.

HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Concentração	7 dias	14 dias
<b>Bicarbonato de Sódio</b>		
0%	80a $\pm$ 2	90a $\pm$ 2
1%	56b $\pm$ 1	62b $\pm$ 2
3%	24c $\pm$ 2	41c $\pm$ 1
5%	5d $\pm$ 0	5d $\pm$ 0
<b>Carbonato de Sódio</b>		
0%	80a $\pm$ 2	90a $\pm$ 2
1%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0
3%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0
5%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0
<b>Ácido Propiônico</b>		
0%	80a $\pm$ 2	90a $\pm$ 2
1%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0
3%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0
5%	5b $\pm$ 0	5b $\pm$ 0

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Concentração	7 dias	14 dias
<b>Ácido Lático</b>		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	56b ± 2	63b ± 3
3%	5c ± 0	13c ± 2
5%	5c ± 0	8d ± 1
<b>Ácido Acético</b>		
0%	80a ± 2	90a ± 2
1%	5b ± 0	5b ± 0
3%	5b ± 0	5b ± 0
5%	5b ± 0	5b ± 0

Os dados de inibição de crescimento do patógeno são expressos pela média em milímetro (mm) de três repetições em comparação com o controle (0%), acompanhada do desvio padrão e diferença significativa à nível de 5% pelo teste de Tukey.

A utilização de substâncias GRAS permite pontencializar os efeitos fungistáticos ou fungicidas nos fitopatógenos apresentando vantagens como disponibilidade, custo relativamente baixo e alta solubilidade em água. Além disso, são comumente utilizados como aditivos alimentares e seu uso é sancionado pelo FDA (FERREIRA *et al.*, 2018).

Em estudos realizados por Siddiqui e Ali (2014), cepas de *C. gloeosporioides* foram reduzidas em 75%, empregando-se carbonato de sódio como agente antifúngico. Estes achados corroboram a eficácia dos nossos resultados e demonstram a importância de um sal GRAS com propriedades antifúngicas, capaz de contribuir com o controle de doenças fúngicas e suplantar, em parte ou completamente, a utilização de fungicidas sintéticos.

Assim, o uso de substâncias GRAS como as utilizadas no presente estudo teria diversas vantagens não apenas pelo seu viés econômico, devido ao baixo custo relativo, como também, a redução de prejuízos à saúde e impactos ambientais provenientes dos tóxicos liberados pelo uso extensivo de fungicidas.

#### **Resistência das leveduras a substâncias GRAS selecionadas**

As cepas de leveduras selecionadas foram avaliadas quanto a sua resistência (capacidade de crescimento) aos ácidos propiônico, acético e lático e aos sais carbonato e bicarbonato de sódio.

A tabela 2 demonstra que a cepa LT 101, apresentou resistência ao carbonato de sódio, ácido acético e ácido propiônico nas concentrações testadas, por outro lado, observou-se que a levedura não apresentou crescimento frente ao ácido lático e ao bicarbonato de sódio, mas maiores concentrações testadas, demonstrando sensibilidade a essas substâncias GRAS. A levedura LT 73 apresentou resistência apenas ao carbonato de sódio, mas concentrações testadas, e foi sensível as outras substâncias testadas em pelo menos uma ou duas concentrações estudadas, estes resultados demonstram que a LT 101 foi mais resistente as substâncias GRAS no presente estudo.

**Tabela 2:**Potencial de resistência das leveduras a substâncias GRAS.

Concentração	Leveduras	
	LP 73	LP 101
<b>Ácido Propiônico</b>		
1%	-	+
3%	-	+
5%	-	+
<b>Ácido Láctico</b>		
1%	-	+
3%	-	-
5%	-	-
<b>Ácido Acético</b>		
1%	-	+
3%	-	+
5%	-	+
<b>Carbonato de Sódio</b>		
1%	+	+
3%	+	+
5%	+	+
<b>Bicarbonato de Sódio</b>		
1%	+	+
3%	-	-
5%	-	-

Resistente a substância GRAS (+); Sensível à substância GRAS (-)

Corroborando com os resultados encontrados, Ferreira *et al* (2015) avaliaram a resistência dos seus isolados leveduriformes contra as mesmas substâncias GRAS deste estudo. Os autores verificaram que as quatro cepas avaliadas, apenas uma foi capaz de sobreviver sete dias na presença de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio em três concentrações testadas. Esses resultados demonstram a fragilidade de leveduras frente às substâncias testadas e a incompatibilidade do seu

uso no controle integrado com leveduras que não apresentam resistência.

Apesar da levedura ter mostrado resistente aos ácidos acético e propiônico (todas as concentrações), estes possuem um odor desagradável, o que poderia afetar o fruto no futuro. O carbonato de sódio é reconhecido por seu baixo custo e ampla disponibilidade no mercado, assim esse sal é o mais promissor para futuros testes. Diante do exposto, a LT 101 foi escolhida para os testes subsequentes e para a identificação molecular.

No que se refere a identificação molecular, nas primeiras amplificações não foi possível confirmar a espécie da levedura LT 101, devido à baixa similaridade genética (92,61%) apresentada após a análise das sequências de DNA no banco de dados GenBank.

A provável espécie da levedura LT 101, *Kodamaceea ohmeri*, é descrito na literatura como um problema de saúde pública, fungos incomuns como este são importantes patógenos oportunistas que podem causar doenças infecciosas graves nos hospedeiros imunocomprometidos e em outros pacientes com fatores de risco, contribuindo para um aumento de mortalidade (Boekhout et al., 2022).

Caso esta espécie seja confirmada como *K. ohmeri*, não será possível a utilização desta como um agente de controle biológico, devido as, característica patogênicas da espécie, sendo assim é imprescindível a identificação correta da levedura isolada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo destaca o potencial biocontrolador de substâncias GRAS na inibição do *C. gloeosporioides*, agente causador da antracnose em mangas, demonstrando ser uma estratégia viável e segura. A cepa LP 101, deve ser identificada molecularmente de forma

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

confiável, uma vez que microrganismos podem ser patogênicos para seres humanos.

### REFERÊNCIAS

- BOEKHOUT, T., *et al.* Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, v.114, n 1, p.491-537, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- BLANCAS-BENITEZ, F. J. *et al.* Impacto dos revestimentos comestíveis na qualidade dos frutos: uma revisão. *Controle Alimentar*, v. 139, pág. 109063, 2022.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2. ed. Lavras: UFLA, 785 p. 2005.
- CORRÊA, T. M. Estratégia de controle de podridão mole (*Rhizopus Stolonifer*) em uva (*Vitis vinífera* brs Carmem). 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11612/2698> Acesso em: 11/05/2023.
- FERREIRA, E. M. S. *et al.* GRAS substances in control of *Colletotrichum gloeosporioides* growth and *Fusarium guttiforme* in vitro/Substâncias GRAS no controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* in vitro. *Journal of bioenergy and food science*, v. 2, n. 4, 2015.
- FERREIRA, E. M. S. *et al.* Método seguro para controle da antracnose em mamão. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 40, n. 3, 2018.
- FREIMOSER, F. M. *et al.* Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 1-19, 2019.
- JOHNSON, S. P.; *et al.* Volatile Organic Compounds in Food Preservation: Mechanisms and Applications. *Food Control*, v. 123, p. 107832, 2021.
- KADER, A. A. Postharvest biology and technology: an overview. In: KADER, A. A. (Ed.) *Postharvest technology of horticultural crops*. 3 ed. Riverside: UC Regents, 535 p. 39-47, 2002.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

MELO, T. A. *et al.* Efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e na resistência induzida de quiabeiros à fusariose. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e7110212357-e7110212357, 2021.

OLIVEIRA, T. S. *et al.* Anthracnose Controlled by Essential Oils: Are Nanoemulsion-Based Films and Coatings a Viable and Efficient Technology for Tropical Fruit Preservation?. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 279, 2023.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Use of Sodium Bicarbonate and Sodium Carbonate in Food Preservation. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 2, p. e12796, 2020.

PIMENTA, R. S. *et al.* New Brazilian law may put food production safety in check. **Public Health**. v. 167, p. 159-160, 2019.

REZENDE, D. C. *et al.* Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5369108822- e5369108822, 2020.

SANCHEZ, A. D. *et al.* Biological control of *Phytophthora collarrot* of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. **Biological Control**. v. 135, p. 124-134, 2019.

SILVA, T. M.; *et al.* Antimicrobial Properties of Organic Acids in Food Applications. **Food Chemistry**, v. 275, p. 118- 124, 2019.

UDDIN, M. *et al.* Management of anthracnose disease of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*: A review. **Acta Scientific Agriculture**, v. 2, n. 10, p. 169-177, 2018.

### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Tocantins.

## Capítulo 8

### Desenvolvimento de um processo contínuo para a produção de açúcar invertido em reator de leito fixo utilizando invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato

Natanael Do Carmo Sousa Gomes

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

#### RESUMO

O açúcar invertido, uma mistura de glicose e frutose obtida pela hidrólise da sacarose, é amplamente utilizado na indústria de alimentos devido à sua doçura superior, maior solubilidade e capacidade de reter umidade. O objetivo deste trabalho foi implementar e avaliar um sistema reacional de leito fixo para a produção contínua de açúcar invertido, utilizando invertase oriunda de uma bactéria isolada do fruto da pupunha, imobilizada em polihidroxibutirato (PHB) como biocatalisador. A imobilização da enzima em PHB por adsorção alcançou um rendimento de 86,4% e uma atividade recuperada de 78%, demonstrando a eficácia do método. A estabilidade durante o armazenamento do biocatalisador foi avaliada ao longo de 150 dias, sem perdas expressivas na atividade enzimática, evidenciando seu alto potencial para aplicações industriais. O teste de estabilidade operacional do reator revelou que a invertase imobilizada manteve sua atividade durante 4 horas. Além disso, a análise das vazões volumétricas, testadas em 3 mL/min, 10 mL/min, 15 mL/min e 20 mL/min, identificou a vazão de 15 mL/min como a mais eficaz para maximizar a conversão de sacarose em açúcar invertido. Esse resultado sugere que a otimização do fluxo é crucial para o sucesso do processo. Em suma, este trabalho demonstra que a utilização de invertase imobilizada em PHB em um reator de leito fixo é uma abordagem promissora para a produção contínua de açúcar invertido.

**Palavras-chave:** invertase, imobilização, polihidroxibutirato, reator de leito fixo, açúcar invertido.

---

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia de Alimentos, Pibiti/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, natanael.carmo@mail.uft.edu.br.

<sup>2</sup>Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, sergio.morales@mail.uft.edu.br.

<sup>3</sup>Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, michellecax@mail.uft.edu.br.

### INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas complexas (proteínas) que desempenham um papel fundamental em reações químicas, graças à sua alta especificidade catalítica e capacidade de atuar em temperaturas amenas. A invertase, uma enzima hidrolítica, catalisa a hidrólise da sacarose, resultando em uma solução equimolar de D-glicose e D-frutose (KOTWAL e SHANKAR, 2009; MANOOCHEHRI et al., 2020).

A produção de invertase tem sido tradicionalmente associada a fontes vegetais; no entanto, a obtenção da enzima a partir de microrganismos, especialmente fungos e algumas bactérias, tem se mostrado mais viável e eficiente. Embora a pesquisa sobre a produção de invertase por bactérias ainda seja limitada, como no caso da *Bacillus tequilensis*, isolada do fruto da pupunha amazônica, essa abordagem oferece vantagens significativas. Essa bactéria não apenas apresenta propriedades catalíticas, mas também permite a obtenção de produtos seguros para o consumo, tornando-a uma opção promissora na indústria alimentícia (NADEEM et al., 2015; ÖZTOP et al., 2020; RASBOLD et al., 2021; BASTO, 2022).

Entretanto, a aplicação industrial de enzimas enfrenta limitações devido às suas características moleculares, como sensibilidade a variações de temperatura, pH e concentração de substrato (ASHKAN et al., 2021). Para superar essas barreiras, a imobilização enzimática em suportes específicos representa uma solução eficaz. Este processo envolve a confinamento da enzima em locais específicos, promovendo interações eficientes e aumentando a estabilidade operacional da enzima (MELLER et al., 2016; ASHKAN et al., 2021).

A imobilização de enzimas melhora suas propriedades operacionais em relação a variações de temperatura e pH, além de

permitir a reutilização dos biocatalisadores em múltiplos ciclos sem perda significativa de atividade enzimática. Essa abordagem é altamente vantajosa em contextos industriais, pois possibilita a utilização de diversas configurações de reatores, otimiza processos e reduz custos operacionais (REMONATTO et al., 2022).

Os métodos de imobilização variam e exploram as interações entre a enzima e o suporte. A adsorção física é um método simples e econômico, mantendo uma maior atividade enzimática, pois não altera a estrutura da enzima, deixando seus sítios ativos disponíveis para interação com o substrato (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022; NUNES et al., 2021). Para garantir um alto rendimento de imobilização, é essencial selecionar cuidadosamente o método e o material de suporte, como o polihidroxibutirato (PHB). Este material biodegradável e renovável, produzido a partir de bactérias, é promissor para a imobilização de enzimas microbianas devido às suas propriedades que se assemelham a polímeros petroquímicos (MANIKANDAN et al., 2020).

A invertase imobilizada em PHB mostra-se como um biocatalisador promissor para a implementação de um sistema de produção contínua de açúcar invertido. Essa abordagem é relevante em reatores de leito fixo (PBR), que favorecem um contato eficaz entre o substrato e o biocatalisador, além de oferecer um sistema de escoamento facilmente controlável (FOGLER, 2012). Além disso, a utilização de reatores de leito fixo apresenta vantagens em relação a sistemas em batelada, melhorando a transferência de massa e calor e evitando a mistura indesejada (KAMBLE; YADAV, 2017). Análises demonstram que a cinética de enzima imobilizada permanece constante por 8 dias em um PBR, evidenciando a eficiência e estabilidade desse sistema. Assim, reatores de leito fixo e uma escolha preferencial em aplicações industriais, visando a otimização de processos e viabilidade econômica (ÁLVARO et al., 2019).

O reator de leito fixo (PBR) é uma estrutura utilizada em processos químicos e biotecnológicos que imobiliza catalisadores, como enzimas, em uma matriz estável. Essa configuração permite a passagem contínua do substrato, aumentando o tempo de contato e mantendo condições ideais de operação. O PBR oferece maior estabilidade do catalisador e minimizam a formação de subprodutos, além de serem sustentáveis, pois viabilizam a reutilização de biocatalisadores e reduzem a necessidade de tratamentos complexos (ÁLVARO et., 2019).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo implementar e avaliar um sistema reacional de leito fixo para a produção enzimática de açúcar invertido de forma contínua, utilizando invertase oriunda de bactéria isolada do fruto da pupunha, imobilizada em polihidroxibutirato, como biocatalisador, assim como avaliar a estabilidade de armazenamento e durante o reuso da enzima imobilizada.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Produção da invertase

A invertase foi produzida a partir da linhagem bacteriana *Bacillus tequilensis* (PP6) isolada dos frutos amazônicos da Pupunha, obtido por meio do projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01). Essa bactéria foi preservada em criotubos contendo 50% de glicerol 40%, e 50% do meio de cultura, contendo 5 g/L de peptona de carne e 3 g/L de extrato de carne e armazenada a -80 °C até o momento da reativação. Para o repique em placas, foi utilizado o meio caldo nutriente com 20 g/L de ágar, 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne. O meio preparado e as placas foram esterilizados em autoclave, sendo feita em seguida as estrias utilizando alças de inóculo descartáveis estéreis e colocadas em incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 24 horas a 30 °C. Após o crescimento do microrganismo em placas, foi preparado o

pré-inóculo em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 20 mL do meio basal, utilizando 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne, sendo esterilizados a 121 °C por 15 minutos e inoculado a colônia do microrganismo com alças de inóculo descartáveis e estéreis . O pré-inóculo foi mantido em agitador tipo shaker a 150 rpm por 24 horas a 30 °C. Para o cultivo submerso, foi utilizado 2 mL do pré-inóculo em 18 mL de meio esterilizado, contendo cloreto de cálcio 0,01 g/L, cloreto de sódio 10,0 g/L, 0,1 g/L de fosfato monopotássio, 0,1 g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio e 2% de sacarose. Esse cultivo foi mantido em agitador tipo shaker em 150 rpm, por 48 horas a 30 °C. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em tubo falcon de 15 mL e centrifugadas em 3500 rpm, por 10 minutos a 10 °C, obtendo assim o sobrenadante para seguir com a imobilização (BASTOS, 2022).

#### **Pré-tratamento do suporte**

O polihidroxiburitirato PHB foi fornecido gratuitamente pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), mediante parceria de pesquisa existente entre pesquisadores da UFT e estas instituições. O PHB foi colocado 10 g do suporte em 50 mL de etanol anidro 96% PA, em frascos Erlenmeyers (125 mL), sendo levado ao shaker por 2 horas a 25 °C em 50 rpm. Após esse período, o PHB foi filtrado e lavado três vezes com água destilada, obtendo assim o PHB puro (ARAUJO et al., 2022). Esse suporte foi seco em estufa na temperatura de 80 °C por 24 horas.

#### **Imobilização enzimática**

A imobilização das enzimas nos suportes foi realizada em um volume de 20 mL de amostra contendo invertase. Esta amostra foi misturada com 1,00 g de suporte (peso seco) em um frasco Erlenmeyer e mantida sob agitação de 150 rpm em um shaker, a uma temperatura

constante de 30 °C. Antes do início da imobilização e após a conclusão do processo, foi retirado 1 mL do sobrenadante para ensaios de atividade enzimática da invertase nestes momentos. Após a imobilização, a mistura foi filtrada a vácuo, e a torta resultante (suporte com a enzima imobilizada) foi armazenada sob refrigeração. Posteriormente, foram realizados ensaios para determinar o rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (AR).

### **Método para determinação da atividade enzimática**

A determinação da atividade enzimática (U/mL) foi realizada pelo método Miller (1959), onde o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. Durante essa reação o grupo aldeído é oxidado a ácido carboxílico, resultando em uma mudança de coloração da amostra de amarelo para vermelho marrom. Essa análise foi desenvolvida em triplicata, sendo preparado inicialmente o meio reacional com tampão McIlvaine pH 5.0 e 2% de sacarose. 800 µL de meio reacional foi colocado em banho-maria a 50 °C por 5 minutos, após esse tempo foi adicionado 200 µL de amostra (ou 0,2 g do derivado imobilizado) nesse meio reacional.

Depois da homogeneização foram retirados 200 µL do meio reacional com a amostra e adicionado em 200 µL de DNS, sendo considerado o tempo zero. Após 5 minutos, outra alíquota de 200 µL da mesma amostra com meio reacional foi adicionada a solução de DNS. Essas amostras foram levadas para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos e logo em seguida colocado no banho de gelo, adicionando 2 mL de água destilada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm, com os valores, foi calculada a atividade enzimática (U/mL) e a média das repetições.

### Determinação dos parâmetros de imobilização

Após a determinação da atividade enzimática do sobrenadante antes e do final da imobilização e do derivado imobilizado foi calculado o rendimento de imobilização (RI) pela Equação (1) e atividade recuperada (AR) pela Equação (2) (TARVENINI et al., 2021; PRADO, 2021).

$$RI \% = \frac{(Ati - Atf)}{Ati} * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

$$ATi \% = \frac{Atd}{Ati} * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, *Atd* é a atividade enzimática (U) do derivado enzima-suporte, *Ati* representa a atividade enzimática do sobrenadante antes da imobilização e *Atf* a atividade enzimática após a imobilização. O rendimento de imobilização refere-se a um valor teórico estimado da quantidade de enzimas presentes no extrato enzimático que migraram para o suporte, calculado de acordo com a equação (1). Por outro lado, a atividade recuperada reflete um valor real, pois parte das enzimas consideradas imobilizadas no cálculo teórico pode perder sua atividade enzimática. Assim, a equação (2) expressa a proporção de enzima imobilizada que ainda mantém atividade catalítica (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

### Estabilidade de armazenamento

Os ensaios da estabilidade de armazenamento prosseguiram durante 30 dias até o momento, sendo realizado com as enzimas imobilizadas em PHB. As amostras foram armazenadas sob refrigeração



a 4 °C, determinando diariamente a atividade enzimática por 3 dias seguidos e esporadicamente completando os 150 dias.

### **Estabilidade operacional**

A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada durante seis ciclos de reação sequenciais em batelada, onde 1 g do suporte contendo a enzima imobilizada (biocatalisador) foi adicionado em 4,0mL de meio reacional composto por tampão MClvaine pH 5,0 e sacarose 2%. Após cada ciclo de 1 h da reação em batelada o biocatalisador foi separado do meio reacional mediante filtração e utilizado em um novo ciclo nas mesmas condições, sendo realizado em triplicata. 200 microlitros desse meio filtrado foram adicionados a 200 microlitros de DNS e colocado no banho-maria a 100°C por 5 min, após esse período a amostra passou pelo banho de gelo, adicionando 2,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e com esse resultado foi determinada a concentração de açúcares redutores (FARIA et al., 2021).

### **Implementação do reator PRB em produção contínua de açúcar invertido.**

As reações foram realizadas em um reator cilíndrico de borossilicato, com diâmetro interno de 12 mm e equipado com uma jaqueta de vidro para a recirculação de água, que atuará como fluido de troca térmica. O reator, ilustrado na Figura 1, possui suportes tanto na base quanto na parte superior, permitindo a fixação do biocatalisador. A temperatura da reação será mantida constante utilizando um banho termostático com sistema de recirculação a 50 °C. O transporte dos reagentes será realizado por uma bomba peristáltica, que proporcionará um fluxo ascendente de uma solução de sacarose.

*Figura 1 Reator de leito Fixo PRB*



Fonte: Autor, 2024.

Após a saída do reator, as amostras serão coletadas em tubos de ensaio. Assim que os tubos forem preenchidos, eles serão imediatamente submersos em água a 100 °C por 5 minutos para desnaturar a enzima e interromper a reação. Em seguida, as amostras serão colocadas em um banho de gelo para garantir a parada rápida da atividade enzimática.

### Ensaio de estabilidade operacional

Os estudos de estabilidade operacional foram realizados em sistema reacional contínuo na ausência e presença de corrente de reciclo. Para isso, o reator PBR foi recheado com biocatalisadores 2g de enzimas imobilizadas em PHB com altura de leito catalítico igual a 6 cm. A reação foi conduzida a 50 °C por 4 horas, alimentando-se o reator com

solução de sacarose 2 % e pH 5,0 a uma vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram coletadas nos seguintes períodos de tempo de reação 5min, 15min, 30min, 60min, 120min, 180min e 240min. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### Vazão volumétrica

Para se avaliar a influência da vazão volumétrica nos perfis de atividade enzimática, o reator PBR foi alimentado à 3 mL min<sup>-1</sup>, 10 mL min<sup>-1</sup>, 15 mL min<sup>-1</sup>, e 20 mL min<sup>-1</sup> com solução de sacarose a 2%, pH 5,0. A reação foi conduzida à 50 °C por 60 min em reator PBR com altura de leito catalítico de 6 cm. Foram coletados amostras nos tempos 5min, 15min, 30min e 60min. Os ensaios foram realizados em duplicata.

### DADOS E DISCUSSÃO

#### Produção e imobilização enzimática

A invertase foi imobilizada por adsorção no PHB após um período de 8 horas. Os parâmetros de imobilização foram calculados em triplicata e estão apresentados na Tabela 1, que demonstra o rendimento de imobilização e a atividade recuperada da invertase imobilizada no PHB.

*Tabela 1 Parâmetros de Imobilização*

PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO	%	DESVIO PADRÃO
Rendimento de Imobilização	86,4	1,40
Atividade Recuperada	78	3,7

Fonte: Autor, 2024.

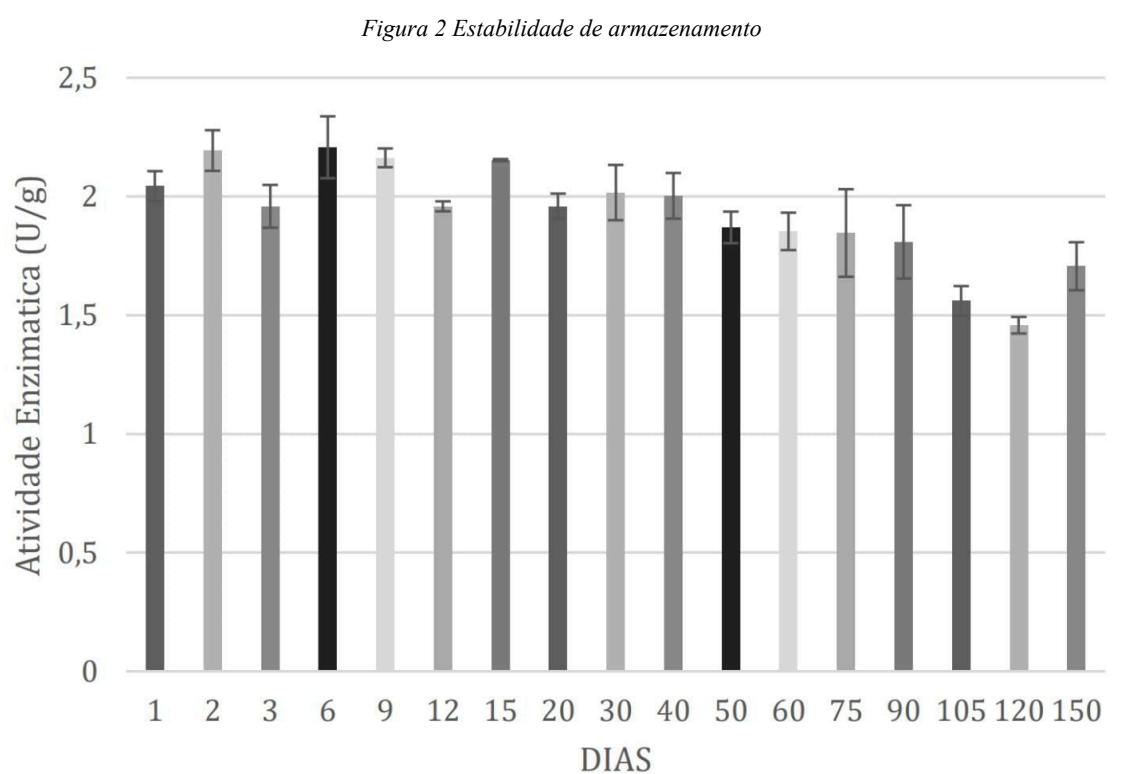
Com base nos parâmetros apresentados na tabela 1 acima, a enzima foi efetivamente imobilizada no PHB por adsorção física, alcançando um rendimento de imobilização de 86,4% e uma atividade recuperada de 78%. Em comparação com os parâmetros de imobilização relatados na literatura para o mesmo suporte e método, mas utilizando uma enzima diferente, a frutossiltransferase apresentou rendimento de 40% e atividade recuperada de 17%. Esses resultados indicam que a imobilização da invertase resultou em um rendimento significativamente superior e uma atividade recuperada mais substancial em relação à frutossiltransferase, sugerindo uma maior eficácia do método de imobilização para a invertase neste contexto específico (ARAUJO et al., 2022). As diferenças nos parâmetros de imobilização são esperadas devido às características distintas das enzimas envolvidas. Cada enzima interage de forma única com o suporte, influenciada por sua estrutura molecular.

Essas interações podem afetar a eficácia da imobilização, podendo proporcionar benefícios em determinados suportes e apresentar desafios em outros. Por exemplo, a sílica gel, por sua alta área superficial e propriedades químicas favoráveis, é frequentemente associada a melhores rendimentos de imobilização (MISHRA et al., 2020). Em contraste, o biocarvão pode demonstrar variações significativas em suas propriedades dependendo das condições de pirólise, podendo reduzir sua capacidade de imobilização em temperaturas elevadas (RAJAPAKSHA et al., 2022).

Portanto, as variações nos rendimentos e nas atividades recuperadas refletem as complexidades das interações entre enzima e suporte, ressaltando a importância de uma seleção cuidadosa do método de imobilização, levando em consideração as características específicas de cada enzima e suporte utilizado.

### Estabilidade de Armazenamento

Os resultados da estabilidade de armazenamento da invertase imobilizada em PHB por adsorção durante um período de 150 dias estão apresentados na Figura 2. Os dados mostram o comportamento da atividade da enzima imobilizada quando armazenada a 4 °C.



Fonte: Autor, 2024.

A parti do gráfico, observa-se a estabilidade na atividade enzimática da invertase imobilizada em PHB ao longo de 150 dias, sem perda significativa da atividade do biocatalisador. Isso é particularmente relevante, pois estudos anteriores, como o de ARAUJO et al. (2022), observaram uma perda gradual de atividade em biocatalisadores similares.

A análise da estabilidade de armazenamento é crucial para entender a viabilidade do biocatalizador em aplicações industriais. A capacidade de manter a eficiência ao longo do tempo impacta

diretamente na redução de custos operacionais e otimização do tempo de produção. Num contexto em que a indústria busca processos sustentáveis e econômicos, a manutenção da atividade enzimática permite a reutilização dos biocatalisadores, aumentando a produtividade.

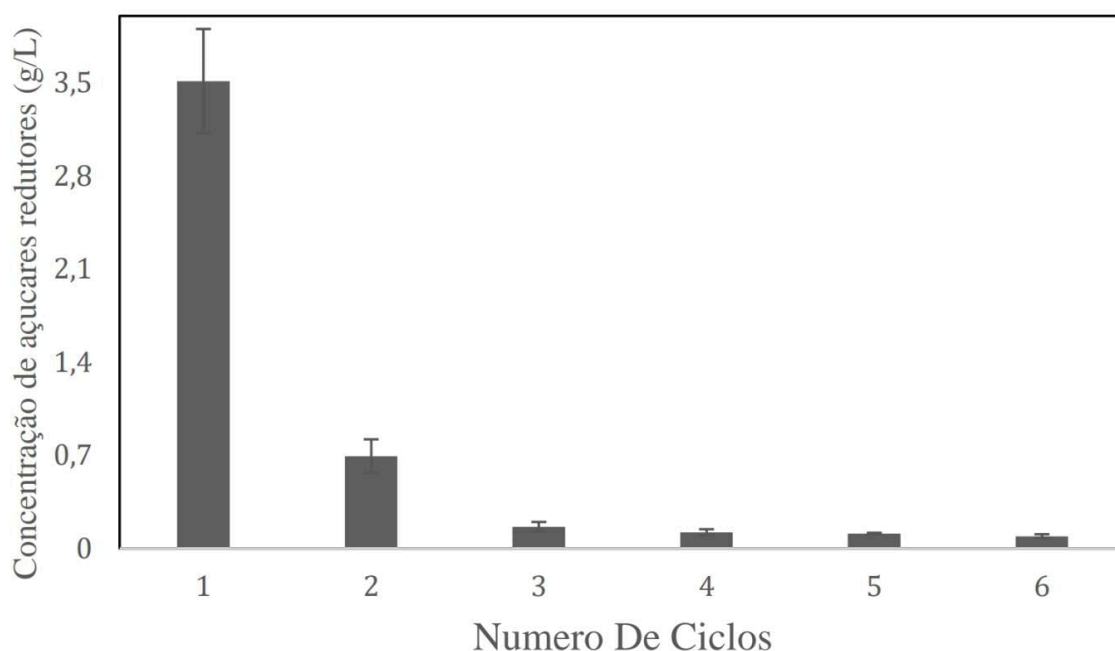
Dados adicionais reforçam essa importância. Por exemplo, a pesquisa de MISHRA et al. (2020), que avaliou a estabilidade da invertase imobilizada em um suporte bio-híbrido composto por nanopartículas de sílica e sementes de *Ocimum basilicum*, revelou que as enzimas imobilizadas retiveram entre 45% e 78% da atividade após 60 dias. Em comparação, a enzima livre perdeu completamente a atividade em apenas 25 dias. Isso enfatiza como a imobilização adequada pode prolongar a funcionalidade da enzima, um aspecto vital para reatores de leito fixo, onde a eficiência do catalisador influencia diretamente a viabilidade econômica do processo.

O uso de biocatalisadores imobilizados não apenas proporciona estabilidade das enzimas, mas também facilita a operação contínua em processos industriais, onde a eficiência e a economia de recursos são primordiais.

### Ensaio de estabilidade operacional das enzimas imobilizadas

Os resultados da estabilidade operacional estão apresentados na Figura 3, com o objetivo de avaliar a viabilidade do reuso do biocatalisador. Para minimizar a perda de suporte durante a análise, foram realizados seis ciclos operacionais, permitindo assim uma avaliação mais precisa das concentrações do meio reacional e do desempenho contínuo do biocatalisador.

Figura 3 Estabilidade operacional



Fonte: Autor, 2024.

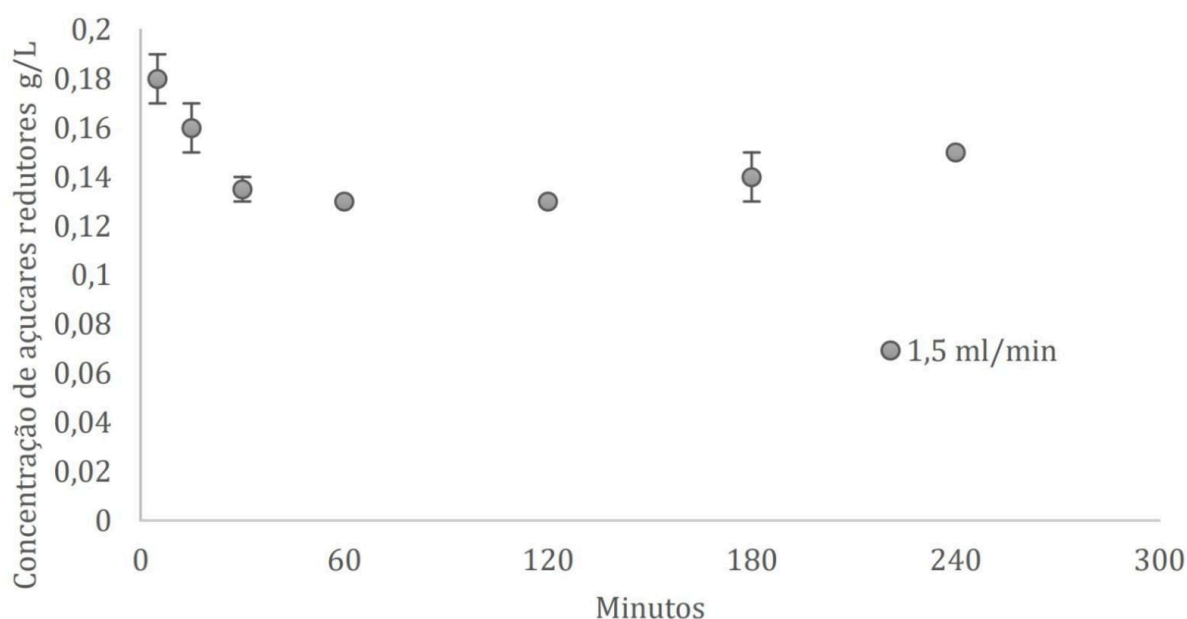
No segundo ciclo de reação, observou-se uma queda significativa de 80% na atividade relativa da invertase imobilizada por adsorção em PHB. Estudos anteriores mostram variações na estabilidade de enzimas imobilizadas; por exemplo, BINHAYEEDINGB et al. (2020) relataram que a lipase imobilizada em PHB manteve 50% da atividade após 15 ciclos, enquanto GARCIA et al. (2021) encontraram 88,90% de atividade para a biomassa catalítica do *Aspergillus oryzae* IPT301 ao longo de 12 ciclos. MIRANDA et al. (2014) observaram cerca de 70% de estabilidade para a lipase de *Thermomyces lanuginosus* em PHB após cinco ciclos. Em contraste, LI et al. (2018) reportaram uma perda de 66,20% da atividade inicial da lacase imobilizada em biocarvão após sete ciclos. Essas diferenças de estabilidade estão ligadas ao tipo de suporte e ao método de imobilização. Métodos que utilizam ligações covalentes proporcionam uma fixação mais estável da enzima ao suporte, reduzindo a lixiviação e melhorando a retenção de atividade ao longo dos ciclos. Uma alternativa promissora seria a

utilização de reatores de leito fixo (PBR), que podem proporcionar um ambiente controlado para o biocatalisador, potencialmente melhorando sua estabilidade e desempenho ao longo do tempo.

### Estabilidade operacional da enzima imobilizada em PBR

A Figura 4 ilustra a reação que ocorreu ao longo de quatro horas em um (PBR) contendo invertase imobilizada em PHB. Nele, é possível observar o desempenho do biocatalisador na catalização da conversão de sacarose em açúcar invertido.

*Figura 4 Estabilidade operacional em PBR*



Fonte: Autor, 2024.

Como apresentado no gráfico a utilização de invertase imobilizada no (PBR) por quatro horas, com vazão de 1,5 mL por minuto. Neste contexto, a enzima catalisa a conversão de sacarose em glicose e frutose, açúcares de relevância econômica. A estabilidade da invertase durante todo o período sugere que a imobilização cria um

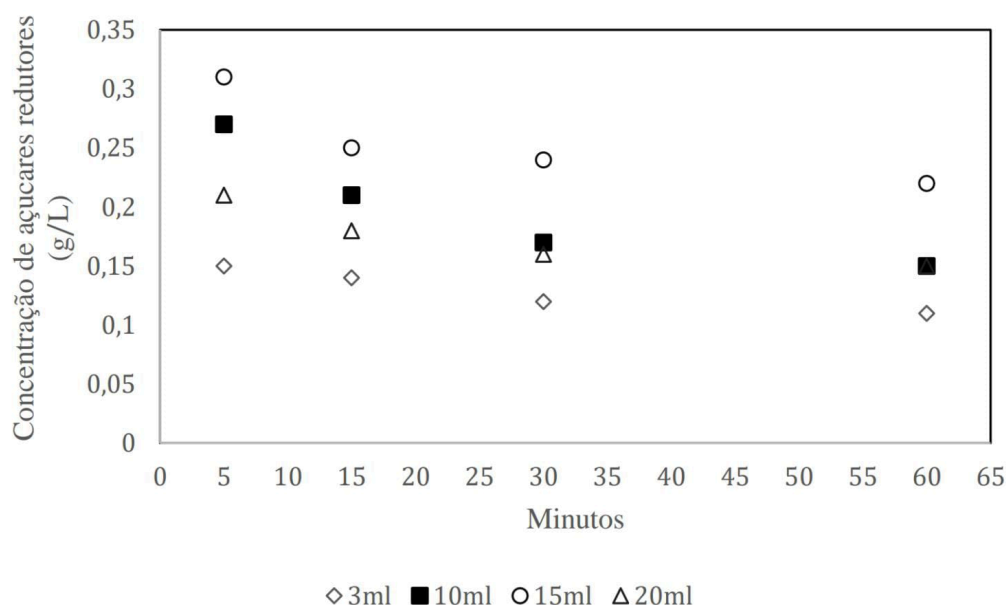


ambiente que protege a enzima, evitando sua desativação precoce. Em um estudo focado na estabilidade de enzimas imobilizadas, a levansucrase demonstrou manter sua atividade por até oito dias em (PBR) (ÁLVARO et., 2019). Essa observação ressalta a importância da imobilização, pois contribui significativamente para a estabilidade das enzimas, permitindo um desempenho prolongado e eficiente em condições de processos contínuos, que são de interesses industriais. Assim, o uso de PBRs com enzimas imobilizadas se apresenta como uma abordagem promissora para maximizar a durabilidade e a eficácia das reações enzimáticas.

### Análises de vazões volumétricas no PBR.

A Figura 4 mostra os resultados da conversão de sacarose em açúcar invertido sob quatro diferentes vazões volumétricas no PBR. A análise evidencia como variações na vazão influenciam a eficiência do processo de conversão, permitindo identificar a vazão ideal para maximizar a produção de açúcar invertido.

*Figura 4 Experimento de vazões*



Fonte: Autor, 2024.

A eficiência na conversão de sacarose em açúcar invertido é influenciada pelas volumétricas, com a vazão de 3 mL apresentando baixa eficiência devido ao curto tempo de contato entre reagentes e catalisador. A conversão melhora com o aumento para 5 mL, atingindo um pico em 15 mL, onde o equilíbrio entre tempo de contato e condições de reação é otimizado. No entanto, ao elevar a vazão para 20 mL, a conversão diminui, indicando que um fluxo excessivo compromete a interação. Esses resultados estão parecidos com os de Ribeiro (2022), que observou que a atividade enzimática aumentou nos primeiros minutos antes de cair e a melhor vazão que não sofre uma redução significativa, enquanto a invertase imobilizada em PBR mostrou um comportamento diferente, mantendo a atividade constante inicialmente e apresentando uma leve diminuição com o tempo para todas as vazões.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de invertase imobilizada em um reator de leito fixo (PBR) representa uma abordagem inovadora para a conversão de sacarose em açúcar invertido. Esta enzima, isolada de uma bactéria da pupunha, uma fruta amazônica, foi imobilizada com sucesso no polihidroxibutirato (PHB), resultando em um rendimento de 86,4% e uma atividade recuperada de 78%. Sua estabilidade, mantida por 150 dias a 4 °C, destaca seu potencial como biocatalisador viável para operações industriais, especialmente em comparação com formas livres que perdem atividade rapidamente. A estabilidade operacional no segundo ciclo diminuiu consideravelmente, ressaltando a necessidade de uma operação contínua do catalisador. Além disso, a vazão volumétrica de 15 mL/min permitiu a obtenção da maior concentração de açúcares redutores. Assim, a utilização de invertase

imobilizada em PBR pode proporcionar maior produtividade por permitir a produção contínua.

## REFERÊNCIAS

- ÁLVARO, G. G.; RUIZ S.; ÁLVARO S.; TABERNERO A.; VALLE, E. M.; Biotechnological strategies to produce levan: Mass transfer and technoeconomical evaluation. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 141, 2019.
- ARAÚJO; I. Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato e sua caracterização bioquímica para a produção de frutooligossacarídeos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2021.
- ARAÚJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; SILVA, E. S.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, p. 419-430, 2022.
- ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.
- BASTOS, L. T. A. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas 2022.

BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174-185, 2020.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v.90, p.66-80, 2020.

FARIA, L. L.; MORALES, S. A. V.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G. S.; ALMEIDA, A. F. ; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides. **Biotechnology Letters** (online), v. 43, p. 43-59, 2021.

FOGLER, S. C. **Elements of chemical engineering reactions**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2012.

GARCIA, R. L.; DIAS, G. S.; MORALES, S. A. V.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. D.; MAIORANO, A. E.; TARDIOLI, P. W.; PERNA, R. F. Glutaraldehyde-crosslinked cells from *Aspergillus oryzae* IPT- 301 for high transfructosylation activity: Optimization of the immobilization variables, characterization and operational stability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, p. 273-285, 2021 KAMPLE, P. MANOJ.; YADAV, D. GANAPATI. Resolução cinética de (R,S) - $\alpha$ -Tetralol por Immobilized *Candida antarctica* Lipase B: Comparação entre o bed empacotado sobre o biorreator de lote de tanque agitado Industrial. **Engineering Chemistry Research** Volume 2017, 56, 7, 1750 – 1757, 2017.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 311- 322, 2009. LI, N.; XIA, Q.; NIU, M.; PING, Q.; XIAO, H. Immobilizing laccase on different species wood biochar to remove the chlorinated biphenyl in wastewater. **Scientific Reports**, v. 8, p. 13947, 2018.

MANIKANDAN, N. A.; PAKSHIRAJAN, K.; PUGAZHENHI, G. A closed-loop biorefinery approach for polyhydroxybutyrate (PHB) production using sugars from carob pods as the sole raw material and downstream processing using the co-product lignin. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123247, 2020.

MANIKANDAN, N. A.; PAKSHIRAJAN, K.; PUGAZHENHI, G. A closed-loop biorefinery approach for polyhydroxybutyrate (PHB) production using sugars from carob pods as the sole raw material and downstream processing using the co-product lignin. **Bioresource Technology**, v. 307, p. 123247, 2020.

MANOOCHERI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F. A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 2020.

MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes— Characterization, dividing, perspectives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 84-106, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 3, 1959.

MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392– 403, 2014.

MISHRA, A.; MELO, J. S.; AGRAWAL, A.; KASHYAP, Y.; SEN, D. Preparation and application of silica nanoparticles-*Ocimum basilicum* seeds bio-hybrid for the efficient immobilization of invertase enzyme. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 188, p. 110796, 2020.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1202-1210, 2015.

NUNES, Y. L.; MENEZES, F. L.; SOUSA, I. G.; CAVALCANTE, A. L. G.; CAVALCANTE, F. T. T.; MOREIRA, K. S.; OLIVEIRA, A. L. B.; MOTA, G. F.; SOUZA, J. E. S.; FALCÃO, I. R. A.; ROCHA, T. G.; VALÉRIO, R. B. R.; FECHINE, P. B. A.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, J. C. S. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalyst: How to choose the best strategy? *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 1124- 1170, 2021.

ÖZTOP, H. N.; AKYILDIZ, F.; SARAYDIN, D. Poly (acrylamide/vinylsulfonic acid) hydrogel for invertase immobilization. *Microscopy Research and Technique*, v. 83, p. 1487-1498, 2020.

PRADO, J. P. Z. Imobilização da enzima frutotransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel pura e funcionalizada para produção de frutooligossacarídeos. 2021. 104 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2021.

RASBOLD, L. M.; HEINEN, P. R.; SILVA, J. L. C.; SIMÃO, R. C. G.; KADOWAKI, M. K.; MALLER, A. *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical characterization of a promiscuous enzyme. *Journal of Food Biochemistry*, v. 45, 2021.

RAJAPAKSHA, A. U.; CHEN, S. S.; TSANG, D. C. W.; ZHANG, M.; VITHANAGE, M.; MANDAL, S.; GAO, B.; BOLAN, N. S.; OK, Y. S. Engineered/designer biochar for contaminant removal/immobilization from soil and water: Potential and implication of biochar modification. *Chemosphere*, v. 148, p. 276-291, 2016.

REMONATTO, D.; JUNIOR, R. H. M.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; PAULA, A. V.  
Applications of imoobilized lipases in enzymatic reactors: A review.  
*Process Biochemistry*, v. 114, p. 1-20, 2022.

RIBEIRO, Beatriz Menossi. Imobilização de células íntegras de *Aspergillus Oryzae* IPT-301 visando estudos biocatalíticos em reator de leito fixo para a produção de frutooligossacarídeos / Beatriz Menossi Ribeiro. - Poços de Caldas, MG, 2022.

TAVERNINI, L.; ROMERO, O.; ABURTO, C.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; ILLANES, A.; WILSON, L. Development of a hybrid bioinorganic nanobiocatalyst: Remarkable impact of the immobilization conditions on activity and stability of  $\beta$ -Galactosidase. *Molecules*, v. 26, p. 4152, 2021.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and apllications. *Current Opinion in Food Science*, v. 43, p. 27-35, 2022.

#### FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil e PROCAD-AM 1707/2018 – processo n ° 88887.666945/2022-00”

## Capítulo 9

### Estudo da estabilidade de invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato para a produção de açúcar invertido

Gabriel Rocha Matsuura

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

#### RESUMO

Na Amazônia existem diversos frutos e neles são apresentados diversos microrganismos que são capazes de produzir enzimas, e entre elas a invertase que é capaz de catalisar a hidrólise da sacarose, podendo gerar o açúcar invertido e fruto-oligossacarídeos. No entanto, essa enzima é instável em sua forma solúvel, pelo qual é feita a sua imobilização em suportes visando gerar maior estabilidade. Porém, a imobilização tem que ser feita utilizando um método e material de suporte adequados. O presente trabalho utilizou o processo de imobilização por adsorção física da invertase produzida pela bactéria *Bacillus tequilensis*, que é isolada do fruto amazônico da pupunha, e o material escolhido foi o polihidroxibutirato (PHB) com o objetivo de ter biocatalisadores estáveis para a produção de açúcar invertido. A enzima foi imobilizada por 8 h, na temperatura de 30 °C e utilizando o método de adsorção física para conseguir realizar ensaios de estabilidade térmica (30 °C a 60 °C) e estabilidade frente ao pH (4,0 ao 7,0). Após esses ensaios observou-se que, a enzima demonstrou os maiores valores de atividade enzimática após ser armazenada em pHs de 4,0 a 5,0 e na temperatura de 40 °C. Além disso, os parâmetros termodinâmicos demonstraram uma alta termoestabilidade da enzima, uma menor aleatoriedade causada pela desnaturação térmica e uma resistência a desnaturação. Esses resultados demonstram a importância do processo de imobilização para garantir a estabilidade de enzimas microbianas.

**Palavras-chave:** invertase microbiana; imobilização; estabilidade.



## INTRODUÇÃO

O açúcar invertido apresenta várias vantagens, sendo considerado mais doce, o que desperta maior interesse por parte da indústria. Além disso, ele não se cristaliza durante o processamento. E dependendo do método de produção, pode ainda oferecer outras características, por exemplo: quando produzido pela ação da invertase, é tido como um produto de maior qualidade, livre de coloração e subprodutos, tornando-se mais desejável para a fabricação de alimentos do que o açúcar resultante da hidrólise ácida (CABRERA *et al.*, 2017). Essa enzima, chamada de invertase ou  $\beta$ -frutofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26), é responsável por catalisar a hidrólise da sacarose, gerando glicose e frutose como produtos, o que resulta na formação do açúcar invertido (MANOOCHEHRI *et al.*, 2020).

Na indústria alimentícia, o açúcar invertido encontra aplicação em diversas áreas, como na produção de doces, geleias, bebidas alcoólicas, mel e outros produtos. Além disso, é utilizado na indústria farmacêutica, especialmente na fabricação de xaropes, nutracêuticos e na formulação de rações para animais (LINCOLN e MORE, 2017).

A invertase pode ser obtida por diferentes métodos, mas, na indústria alimentícia, a mais comum é aquela derivada da *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua característica de não ser tóxica ou patogênica. No entanto, também existem outras fontes utilizadas nesse setor, como os microrganismos presentes no fruto da pupunha (*Bactris gasipaes*), nos quais as enzimas são geradas por bactérias (ANDJELKOVIĆ; PIĆURIĆ; VUJČIĆ, 2010; MATOS *et al.*, 2019).

Apesar de possuir propriedades catalíticas, a enzima na forma livre apresenta baixa estabilidade térmica, devido à sua rápida desnaturação, o que limita sua aplicação e eleva os custos de produção do açúcar invertido. No entanto, é possível contornar essa limitação, imobilizando a enzima em um suporte. Quando imobilizada, ela pode aumentar tanto sua estabilidade térmica quanto sua

estabilidade operacional, com a possibilidade de ajustes conforme o tipo de suporte utilizado (ÖZTOP *et al.*, 2020; ASHKAN *et al.*, 2021; MELLER *et al.*, 2016).

A imobilização pode ser classificada em diferentes categorias conforme o método utilizado, sendo elas: física, química e físico-química. A categoria física é a mais indicada por preservar uma maior atividade catalítica das enzimas, e é subdividida em dois tipos: adsorção e aprisionamento (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022; NUNES *et al.*, 2021).

O método de imobilização por adsorção física depende de uma interação hidrofóbica ou iônica entre o suporte e a enzima, no qual, permite a reutilização do suporte após a inativação da enzima imobilizada, o que leva a uma redução de custos. Contudo, esse método apresenta desvantagens, devido às ligações físicas fracas e existe a possibilidade da enzima se desprender do suporte, o que pode resultar em uma contaminação indesejada, especialmente em indústrias que requerem altas concentrações e uma maior força iônica (NAZAROVA *et al.*, 2021).

Nesse contexto este trabalho teve como objetivo de determinar os parâmetros de imobilização, sendo o rendimento de imobilização e atividade recuperada, da invertase imobilizada em PHB puro. Além de avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em PHB puro frente ao pH e a temperatura. Finalizando com a determinação dos parâmetros termodinâmicos associados à estabilidade dessa enzima imobilizada.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Produção da invertase

A invertase foi produzida a partir da linhagem bacteriana *Bacillus tequilensis* (PP6) isolada dos frutos amazônicos da Pupunha, obtido por meio do projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº

88881.200497/2018-01). Essa bactéria foi preservada em criotubos contendo 50% de glicerol 40%, e 50% do meio de cultura, contendo 5 g/L de peptona de carne e 3 g/L de extrato de carne e armazenada a -80 °C até o momento da reativação. Para o repique em placas, foi utilizado o meio caldo nutriente com 20 g/L de ágar, 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne.

O meio preparado e as placas foram esterilizados em autoclave, sendo feito em seguida as estrias utilizando alças de inóculo descartáveis estéreis e colocadas em incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 24 horas a 30 °C. Após o crescimento do microrganismo em placas, foi preparado o pré-inóculo em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL do meio basal, utilizando 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne, sendo esterilizados a 121 °C por 15 minutos e inoculado a colônia do microrganismo com alças de inóculo descartáveis e estéreis.

O pré-inóculo foi mantido em agitador tipo shaker a 150 rpm por 24 horas a 30 °C. Para o cultivo submerso, foi utilizado 2 mL do pré-inóculo em 18 mL de meio esterilizado, contendo cloreto de cálcio 0,01 g/L, cloreto de sódio 10,0 g/L, 0,1 g/L de fosfato monopotássio, 0,1 g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio e 2% de sacarose. Esse cultivo foi mantido em agitador tipo shaker em 150 rpm, por 48 horas a 30 °C. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas em 3500 rpm, por 10 minutos a 10 °C, obtendo assim o sobrenadante para seguir com a imobilização (BASTOS, 2022).

#### **Pré-tratamento do suporte**

O polihidroxibutirato (PHB) foi fornecido gratuitamente pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), mediante a uma parceria de pesquisa existente entre pesquisadores da UFT e estas instituições. 10 g do suporte (PHB) foram colocados em 50 mL de etanol anidro 99,5%

PA, em frascos Erlenmeyer (125 mL) e levados ao shaker por 2 horas a 25 °C em 50 rpm. Após esse período, o PHB foi filtrado e lavado três vezes com água destilada, obtendo assim o PHB puro (ARAÚJO *et al.*, 2022). Esse suporte foi seco em estufa na temperatura de 80 °C por 24 horas.

### **Imobilização da invertase**

A imobilização das enzimas nos suportes foi realizada em um volume de 20 mL de amostra, contendo invertase extracelular e misturando com 1 g de suporte (peso seco), em Erlenmeyer, mantido sob agitação de 150 rpm em shaker a temperatura constante de 30 °C. Foi retirado uma 1 mL do sobrenadante antes do início da imobilização e depois de finalizado o processo de imobilização para ensaios de atividade enzimática da invertase nesses momentos. Ao término da imobilização, foi feita a filtração a vácuo, e a torta (suporte com a enzima imobilizada) armazenada sob refrigeração. Posteriormente, os ensaios de rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (Atvr).

### **Método para determinação da atividade enzimática**

A determinação da atividade enzimática (U/g) foi realizada pelo método Miller (1959), onde o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) foi reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino, a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. Durante essa reação o grupo aldeído foi oxidado a ácido carboxílico, resultando em uma mudança de coloração da amostra de amarelo para vermelho marrom. Essa análise foi desenvolvida em triplicata, sendo preparado inicialmente o meio reacional com tampão McIlvaine pH 5.0 e 2% de sacarose, 800 µL de meio reacional junto com 0,2 g do derivado imobilizado foi colocado em banho-maria a 50 °C por 5 minutos.

Depois da homogeneização foram retirados 200 µL do meio reacional com a amostra e adicionado em 200 µL de DNS, sendo considerado o tempo zero. Após 5 minutos, outra alíquota de 200 µL da mesma amostra com meio reacional foi adicionada a solução de DNS. Essas amostras foram levadas para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos e logo em seguida colocado no banho de gelo, adicionando 2 mL de água destilada. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm, com os valores, foi calculada a atividade enzimática (U/g) e a média das repetições.

#### Determinação dos parâmetros de imobilização

Após a determinação da atividade enzimática do sobrenadante antes e do final da imobilização do derivado imobilizado foi calculado o rendimento de imobilização (RI) pela Equação 1 e atividade recuperada (AR) pela Equação 2 (TARVENINI *et al.*, 2021; PRADO, 2021).

$$RI \% = \frac{Ati}{(Ati - Atf)} \quad \text{Equação (1)}$$

$$AR \% = \frac{Ati}{Atd} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, *Atd* é a atividade enzimática (U) do derivado enzima-suporte, *Ati* representa a atividade enzimática do sobrenadante antes da imobilização e *Atf* a atividade enzimática após a imobilização.

#### Ensaio de estabilidade frente ao pH

A estabilidade em frente ao pH foi determinada pela incubação da invertase em tampão tris- acetato a 0,2 mol/L em um intervalo de pH de 4,0-7,0 (mudando 0,5 de cada pH), na ausência de substrato, a 4 °C e durante 24 horas. Após isso, foi medida a atividade residual em condições padrão, os ensaios foram feitos em triplicata.

### Ensaio de estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

As enzimas imobilizadas em PHB funcionalizados foram incubadas em tampão McIlvaine pH 5,0 e ausência de substrato em diferentes temperaturas, sendo elas 30 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C. As amostras foram retiradas com 60 min, 120 min, 240 min, 360 min e 1440 min e resfriadas a banho de gelo. Em seguida foi determinada a atividade enzimática, realizando o experimento em triplicata (ARAÚJO, 2021). Para determinação dos parâmetros termodinâmicos foi encontrada a constante de desativação térmica ( $K_d$ , em  $\text{min}^{-1}$ ) a partir do ajuste ao modelo linear no Excel, com os dados de atividade enzimática versus tempo de incubação (Equação 3).

$$\ln A = \ln A_0 - K_d t \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo: A atividade enzimática em determinada temperatura,  $A_0$  a atividade enzimática inicial,  $K_d$  a constante de desnaturação térmica de primeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ) e t o tempo de incubação (min).

O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$  em min) determinado pela Equação 4 é inversamente proporcional ao  $K_d$ , sendo o tempo necessário para redução da atividade da enzima a metade do seu valor inicial (FARIA *et al.*, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2020).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad \text{Equação (4)}$$

Para o cálculo da energia de ativação para a desnaturação térmica ( $E_d$ ) foi utilizada a linearização da equação de Arrhenius (Equação 5). Essa energia de ativação se dá de modo irreversível,

sendo que quando ocorre a desnaturação térmica da enzima, há uma transição de um estado de menor energia para um estado de maior energia (CAMPELLO, 2010).

$$\ln K_d = -\frac{E_d}{R} * \frac{1}{T} + \ln A \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, R é a constante universal dos gases ideais (8,314 J / mol \* K) e T são os valores experimentais da temperatura (K).

A entalpia de ativação da desnaturação ( $\Delta H_d$ ) indica a energia necessária para desnaturar a enzima, determinada a partir da Equação 6 (FERREIRA, 2021; SAQIB *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

$$\Delta H_d = E_d - R * T \quad \text{Equação (6)}$$

A partir da equação 7 é possível determinar a energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação ( $\Delta G_d$ ), onde quantifica a estabilidade térmica abrangendo a entalpia e entropia para determinar a espontaneidade da perda de estabilidade da enzima (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta G_d = -R * T * \ln \left( \frac{K_d * h}{K_b * T} \right) \quad \text{Equação (7)}$$

Sendo, h a constante de Planck ( $11,04 \times 10^{-36}$  J/min) e  $K_b$  a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K).

A entropia de ativação da desnaturação térmica da enzima ( $\Delta S_d$ ) está relacionada com a aleatoriedade do processo de desnaturação enzimática, determinada pela equação 8 (KUMAR *et al.*, 2013).

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T} \quad \text{Equação (8)}$$

## DADOS E DISCUSSÃO

### Determinação dos parâmetros de imobilização

Por meio dos resultados da atividade enzimática pela média da triplicata das amostras apresentadas, foi possível calcular o rendimento de imobilização e a atividade recuperada, onde ambos foram feitos a partir da imobilização da enzima ao suporte pelo método de adsorção. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimento de imobilização e atividade recuperada

	Rendimento de Imobilização (%)	Atividade Recuperada (%)
Média	86,4 ± 1,40	78 ± 3,70

Os parâmetros de imobilização calculados foram o rendimento de imobilização e a atividade recuperada, onde eles indicam respectivamente, o percentual de enzimas imobilizadas no suporte em relação a atividade enzimática inicial e o percentual de atividade enzimática da enzima, após sua imobilização no suporte (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

Segundo Araújo (2022), que utilizou a enzima frutossiltransferase, porém o mesmo suporte (PHB) e pelo mesmo método (por adsorção), é possível observar que, ele obteve o valor de rendimento de imobilização de aproximadamente 41% para o PHB puro e a atividade recuperada de aproximadamente 17% para o PHB puro. Comparando

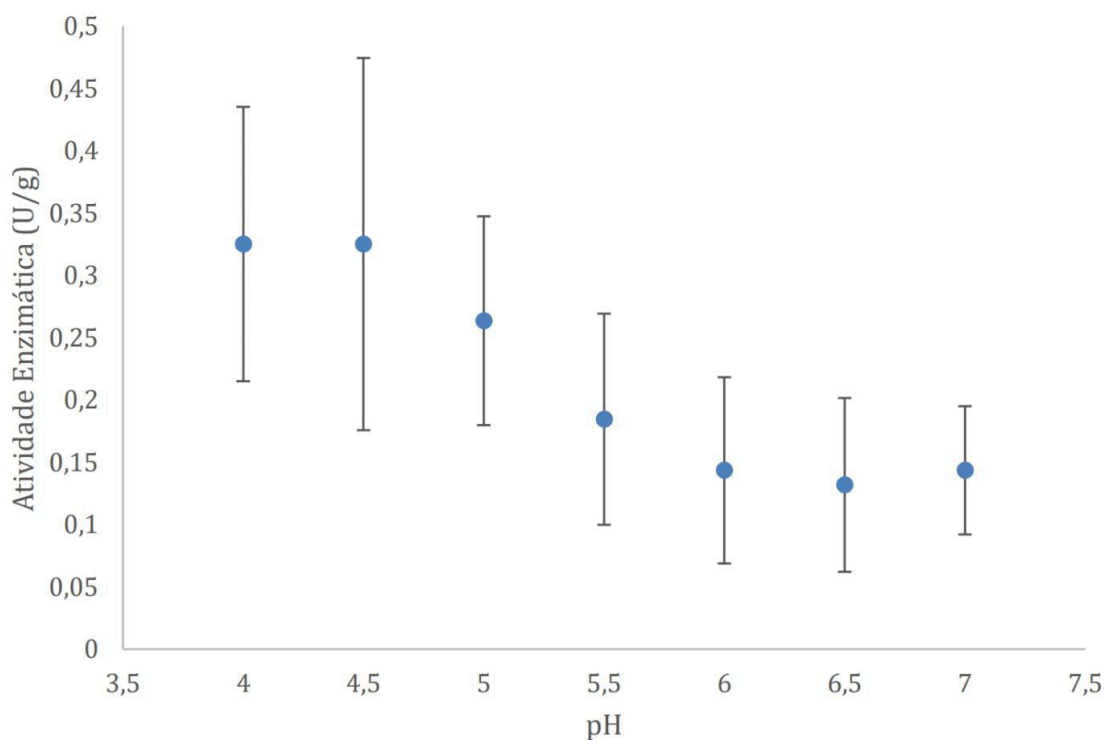


com o presente trabalho, os resultados demonstram que a invertase imobilizada obteve um rendimento e atividade recuperada com valores mais elevados. Porém, é importante lembrar que cada enzima reage de uma forma diferente com o suporte, devido às suas estruturas moleculares diferentes. Por isso, é preciso selecionar cuidadosamente o suporte e o método para a imobilização de cada enzima, sempre levando em conta suas características específicas (ARAÚJO *et al.*, 2022).

### Ensaio de estabilidade frente ao pH

Por meio dos ensaios realizados, é possível observar que a Figura 1 mostra a atividade enzimática de cada pH, após a incubação nos tampões tris-acetato.

Figura 1 – Estabilidade enzimática frente ao pH



Observando a Figura 1 é possível perceber que, os maiores valores de atividade enzimática obtidos foram para a faixa dos pHs 4,0 ao 5,0.

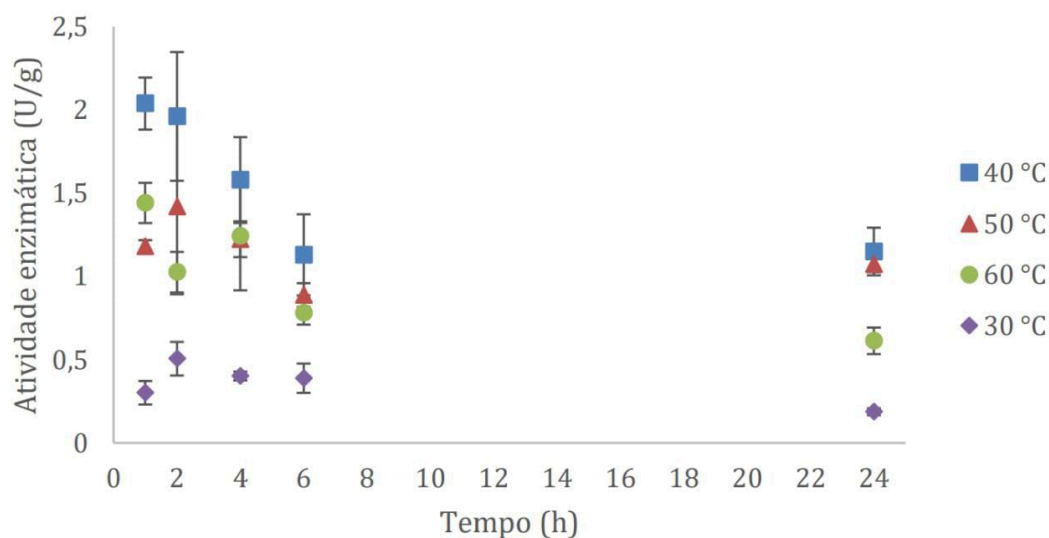
Esses resultados mostram que o processo estando dentro desta faixa de pH, a enzima conseguirá ter sua maior atividade enzimática.

Observando a literatura, que utilizou uma enzima diferente (frutossiltransferase), porém o mesmo suporte (PHB) e pelo mesmo método (por adsorção), é possível observar que, ele obteve os valores de atividade enzimática frente ao pH para o PHB puro um pouco diferentes em comparação com o presente trabalho. Onde, os maiores valores de atividade enzimática obtidos foram na faixa de pH 5,5 ao 7,0, indicando uma diferença de pHs que possuem as melhores condições para a reação enzimática de cada enzima (ARAÚJO *et al.*, 2022).

#### Ensaio de estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos

Por meio dos ensaios produzidos, é possível observar que a Figura 2 mostra a atividade enzimática de cada temperatura, após a incubação no tampão tris-acetato e durante cada tempo analisado.

Figura 2 – Estabilidade enzimática térmica



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Observando o Figura 2 é possível perceber que, os maiores valores de atividade enzimática obtidos foram na temperatura de 40 °C. Já as temperaturas de 50 °C e 60 °C obtiveram valores bem similares. Esses resultados mostram que o processo estando na temperatura de 40 °C, resultou em uma maior atividade enzimática, já a temperatura de 60 °C obteve uma redução expressiva ao longo do tempo, a temperatura de 30 °C teve uma estabilidade em sua atividade enzimática, porém muito menor comparando com as outras, podendo analisar e planejar para que ocorra uma redução de gastos futuros de uma empresa.

Diante de uma regressão linear, calculada pela curva de desnaturação térmica, resultou-se a constante de desnaturação térmica de primeira ordem ( $K_d$ ) e a energia de desativação térmica ( $E_d$ ) foi calculada diante da regressão linear da Equação de Arrhenius. Com isso, calculou-se os outros parâmetros termodinâmicos, que foram: o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), as variações de entalpia ( $\Delta H_d$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G_d$ ) e entropia ( $\Delta S_d$ ), assim como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros Termodinâmicos

Parâmetros	Temperaturas (°C)			
	30	40	50	60
$K_d$ (min <sup>-1</sup> )	0,0006	0,0004	0,0001	0,0005
$t_{1/2}$ (min)	1155,245	1732,868	6931,472	1386,294
$E_d$ (kJ/mol)	17,27			

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

$\Delta H_d$ (kJ/mol)	14,75	14,66	14,58	14,50
$\Delta G_d$ (kJ/mol)	103,30	107,85	115,10	114,29
$\Delta S_d$ (kJ/(mol*K))	-0,292	-0,298	-0,311	-0,300

Diante dos resultados apresentados pode-se observar que, o  $K_d$  teve uma queda significativa na temperatura de 50 °C e devido a isto, seu tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) foi bem elevado. Porém, o esperado era o  $K_d$  aumentar e o  $t_{1/2}$  diminuir com o aumento da temperatura, o que indicaria a desnaturação com o aumento da temperatura, devido não ter ocorrido desta forma, indica que não houve uma alta desnaturação com o aumento da temperatura. Pois segundo a literatura, o tempo de meia vida tem o significado de tempo necessário para que a enzima perca 50 % da sua atividade inicial e a constante de desativação seria os fatores irreversíveis para a desnaturação térmica da enzima, que resultaria em uma enzima estável, contrário ao apresentado no presente trabalho.

Além disso, as energias de entalpia, entropia e Gibbs não tiveram tanta variância nos resultados das temperaturas, mostrando assim que altos valores da variação de entalpia ( $\Delta H_d$ ) e baixos valores da variação de entropia ( $\Delta S_d$ ) estão associados a alta termoestabilidade da enzima. Ainda sobre os valores da variação de entropia, foram negativos em todas as temperaturas, indicando menor aleatoriedade causada pela desnaturação térmica. Já os valores da variação de energia de Gibbs ( $\Delta G_d$ ), foram todos positivos e teve um aumento diante do aumento de temperatura até certo ponto, mostrando uma resistência a desnaturação (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2022; BUSTAMANTE-VARGAS *et al.*, 2019).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imobilização da  $\beta$ -frutofuranosidase ou invertase da *Bacillus tequilensis* mostrou ser muito promissora para a produção de biocatalisadores estáveis para a produção do açúcar invertido. Onde, ela obteve um alto percentual de rendimento imobilizado e de atividade recuperada, mostrando ser uma boa alternativa para melhorar a estabilidade da enzima e aumentar o seu potencial de utilização industrial. Além de que, entre a faixa de pHs de 4,0 e 5,0, a enzima imobilizada em PHB mostrou estabilidade. Já nos ensaios de estabilidade térmica, a enzima imobilizada em PHB puro demonstrou essa condição na temperatura de 40 °C. Os parâmetros termodinâmicos indicaram que houve bons valores de variação de energia de Gibbs, de entropia e de entalpia, onde a enzima imobilizada apresentou ter uma resistência a desnaturação e indicou menor aleatoriedade causada pela desnaturação térmica. Esses dados ajudam em futuras pesquisas e para a indústria que for utilizar dessa enzima e suporte a reduzir gastos e tempo.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGEED, H.M.; NADA, D.; RADWAN, R.A.; MOHAMED, S. A.; GOHARY, N. A. E. L. Optimization of catalytic properties of *Mucor racemosus* lipase through immobilization in a biocompatible alginate gelatin hydrogel matrix for free fatty acid production: a sustainable robust biocatalyst for ultrasound-assisted olive oil hydrolysis. 3 Biotech, v. 12, p. 01-16, 2022.
- ANDJELKOVIĆ, U.; PIĆURIĆ, S.; VUJČIĆ, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. Food Chemistry, v. 120, p. 799-804, 2010.
- ARAÚJO, I. Imobilização de frutotransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em polihidroxibutirato e sua caracterização

bioquímica para a produção de frutooligossacarídeos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços de Caldas, 2021.

ARAÚJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; SILVA, E. S.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.; ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F. Enhancement of fructosyltransferase stability by immobilization on polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate for fructooligosaccharides production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 98, p. 419-430, 2022.

ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 168, p. 708-721, 2021.

BASTOS, L. T. A. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas 2022.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, v.90, p.66-80, 2020.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; JUNGES, A.; VENQUIARUTO, L. D.; ORO, C. E. D.; JULIO- OROZCO, D. J.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; PAROUL, N.; BACKES, G. T.; 65 DALLAGO, R. M. Thermal inactivation kinetics and thermodynamic properties of immobilised *Aspergillus niger* pectinase in rigid polyurethane foam. *International Food Research Journal*, v. 26, p. 1535 - 1545, 2019.

CABRERA, M. P.; ASSIS, C. R. D.; NERI, D. F. M.; PEREIRA, C. F.; SORIA, F.; CARVALHO, L. B. High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v. 14, p. 38–46, 2017.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Bacterial invertases: Occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 57, p. 803-813, 2017.

MANOOCHERI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F. A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 25, 2020.

MATOS, K. A. N.; LIMA, D. P.; BARBOSA, A. P. P.; MERCADANTE, A. Z.; CHISTÉ, R. C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. *Food Chemistry*, v. 272, p. 216-221, 2019.

MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes— Characterization, dividing, perspectives. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 244, p. 84-106, 2016.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, vol. 31, n. 3, 1959.

NAZAROVA, E. A.; YUSHKOVA, E. D.; IVANETS, A. I.; PROZOROVICH, V. G.; KRIVOSHAPKIN, P. V.; KRIVOSHAPKINA E. F.  $\alpha$ -Amylase Immobilization on Ceramic Membranes for Starch Hydrolysis. *Starch journal*, v. 74, p. 1-9, 2021.

NUNES, Y. L.; MENEZES, F. L.; SOUSA, I. G.; CAVALCANTE, A. L. G.; CAVALCANTE, F. T. T.; MOREIRA, K. S.; OLIVEIRA, A. L. B.; MOTA, G. F.; SOUZA, J. E. S.; FALCÃO, I. R. A.; ROCHA, T. G.; VALÉRIO, R. B. R.; FECHINE, P. B. A.; SOUZA, M. C. M.; SANTOS, J. C. S. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalyst: How to choose the best strategy?. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 1124- 1170, 2021.

ÖZTOP, H. N.; AKYILDIZ, F.; SARAYDIN, D. Poly (acrylamide/vinylsulfonic acid) hydrogel for invertase immobilization. *Microscopy Research and Technique*, v. 83, p. 1487-1498, 2020.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Current Opinion in Food Science*, v. 43, p. 27-35, 2022.

#### FINANCIAMENTO

CNPq e PROCAD-AM 1707/2018 - Processo nº 88887.666945/2022-00



## Capítulo 10

# Estudo da produção de açúcar invertido em biorreator batelada catalisada por invertase microbiana imobilizada em polihidroxibutirato

Joicy Silva e Silva

Sergio Andres Villalba Morales

Michelle da Cunha Abreu Xavier

### RESUMO

A invertase ( $\beta$ -frutofuranosidase) é importante para a indústria de alimentos já que catalisa a conversão da sacarose em açúcar invertido, que possui alto poder adoçante e não cristaliza durante diversas etapas de processamento. Recentemente, microrganismos produtores de invertase foram descobertos em frutos do bioma amazônico, como a pupunha (*Bactris gasipaes*). Porém, esta enzima solúvel apresenta baixa estabilidade, sendo necessária a sua imobilização em suportes. O polihidroxibutirato (PHB) é um suporte biodegradável considerado promissor para imobilização de enzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização da invertase produzida pela bactéria PP6, *Bacillus tequilensis*, em PHB, e estudar a cinética da produção de açúcar invertido em biorreator batelada. A enzima invertase foi produzida pela bactéria *Bacillus tequilensis* em condições específicas de cultivo. O sobrenadante foi utilizado para ensaios de imobilização, utilizando 1g de PHB e 20 mL de extrato enzimático. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de DNS. Foram determinados o rendimento de imobilização (RI) e a atividade recuperada (AR) e a influência da concentração de substrato na atividade enzimática. O RI e AR obtidos foram de 86,4% e 78 %, respectivamente, indicando alto potencial de aplicação do PHB para a imobilização da invertase bacteriana. A atividade enzimática teve redução com o aumento da concentração do substrato. A cinética da atividade enzimática da invertase em PHB foi ajustada ao modelo de Michaelis-Menten, obtendo valor de  $V_{max}$   $0,40 \pm 0,02$ . A imobilização da invertase bacteriana em PHB é uma estratégia promissora para a síntese de biocatalisadores estáveis e renováveis.

Palavras-chave: açúcar invertido, invertase, imobilização, polihidroxibutirato, estabilidade.

---

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia de Alimentos, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, joicy.silva@mail.uft.edu.bre-mail.

<sup>2</sup>Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, [sergio.morales@mail.uft.edu.br](mailto:sergio.morales@mail.uft.edu.br).

<sup>3</sup>Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, michellecax@mail.uft.edu.br.

### INTRODUÇÃO

As invertases, ou  $\beta$ -frutofuranosidases (FFases, EC 3.2.1.26), são enzimas que catalisam a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, resultando em uma solução equimolar com maior doçura conhecida como açúcar invertido, o qual é um produto de grande interesse industrial (ALMEIDA et al., 2018; MANOOCHEHRI et al., 2020). A utilização de enzimas mostra-se proveitosa, já que resulta em um produto incolor e livre de contaminantes (ALMEIDA et al., 2018).

O açúcar invertido também não cristaliza em processos industriais e, diferente da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da invertase, não apresenta formação de cores indesejáveis e subprodutos, podendo assim aplicar esse açúcar em balas, coberturas para bolo, bebidas alcoólicas, geléias e chocolates (CABRERA et al., 2017; LINCOLN e MORE, 2017). Além da utilização em ração animal e formulação de produtos na indústria farmacêutica (LINCOLN e MORE, 2017).

A invertase com melhores propriedades catalíticas para aplicação na indústria de alimentos pode ser produzida a partir de vegetais e microrganismos como fungos, leveduras e bactérias (NADEEM et al., 2015; ÖZTOP et al., 2020). Entretanto, essa enzima em sua forma livre apresenta baixa estabilidade diante de parâmetros como pH, temperatura e reutilização, limitando a aplicação em processos e aumentando custos de produção (ÖZTOP et al., 2020).

A imobilização consiste no processo de confinamento da proteína em uma estrutura sólida insolúvel que não se desfaça em meio aquoso ou solventes orgânicos. A imobilização permite o aumento da estabilidade operacional, uma maior possibilidade de separação, facilita a reutilização e evita a contaminação, tem se um aumento da

eficácia catalítica da enzima, formação de subprodutos e inibição enzimática durante a aplicação industrial (PRADO, 2021; ASHKAN et al., 2021). Mas para alcançar bons resultados nessa imobilização é necessária a escolha favorável do método e material de suporte a ser utilizado (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

Os métodos de imobilização são classificados de acordo com a ligação das enzimas, podendo ser químico como a ligação covalente e reticulação ou físico como a adsorção e aprisionamento. Os mais comuns são a adsorção e a ligação covalente. Pelo método físico, as enzimas são adsorvidas nas superfícies dos transportadores de suporte e se imobilizam nos poros destes, é considerado reversível, de baixo custo e acessível para manter a imobilização. No método por ligação covalente, ocorrem reações químicas entre os materiais de suporte e os aminoácidos das enzimas, estabelecendo um equilíbrio estável para impossibilitar a redução das enzimas no suporte. Deste modo, a estabilidade das enzimas imobilizadas é aprimorada. (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022; LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P., 2018).

Uma seleção adequada de suporte para a imobilização é crucial para que a ligação enzimática seja favorecida, atendendo a diversos critérios. O material mais aconselhável deve possibilitar uma alta atividade catalítica, ser resistente a diversas condições, facilitar a regeneração, ser atóxico, conter alta capacidade de ligação enzimática e a probabilidade de aplicação constante (EŞ, VIEIRA, AMARAL, 2015; LABUS, WOLANIN, RADOSÍŃSKI, 2020). O polihidroxibutirato (PHB) é um suporte orgânico que vem sendo utilizado com alto potencial na imobilização da enzima frutossiltransferase, para a produção de açúcares funcionais, visto assim, pode ser uma opção para imobilizar outras enzimas como a invertase (ARAUJO et al., 2021; FARIA et al., 2021).

O estudo da cinética enzimática destaca a influência da concentração do substrato na atividade da enzima. Esse fenômeno reflete a importância das enzimas no metabolismo, catalisando a

maioria das reações químicas nos organismos vivos. A compreensão dessas reações depende da cinética química e da termodinâmica, considerando fatores como concentração dos reagentes, temperatura e presença de catalisadores. Equações empíricas ou modelos matemáticos são desenvolvidos para descrever o comportamento enzimático. Por exemplo, uma equação de taxa mostra como a taxa de reação varia com a concentração dos reagentes, permitindo uma compreensão clara das interações (BARBOSA, 2022). Neste sentido, este projeto visou realizar o processo de imobilização da invertase no PHB, assim como o estudo cinético da hidrólise da sacarose catalisada pela enzima imobilização em PHB e PHB funcionalizado com glutaraldeído.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Pré-Tratamento do suporte

O polihidroxibutirato (PHB) foi fornecido gratuitamente pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), mediante parceria de pesquisa existente entre pesquisadores da UFT e estas Instituições. Foram colocados 10 g do suporte PHB em 50 mL de etanol anidro 99% PA, em frascos Erlenmeyer 125 mL, e levado ao shaker por 2 horas a 25 °C em 50 rpm. Após esse período, o PHB foi filtrado e lavado três vezes com água destilada, obtendo assim o PHB puro (ARAUJO et al., 2022). Esse suporte foi seco em estufa na temperatura de 80 °C por 24 horas. Para a funcionalização do suporte (GLU-PHB), adicionou-se 18 mL de glutaraldeído 25% (v/v) em 2 g de PHB utilizando frascos de Erlenmeyers (125 mL). O suporte foi colocado no shaker por 18 horas, a 50 rpm em 25 °C. Após esse tempo, o PHB foi filtrado a vácuo e secado em dessecador por 24 horas (PRADO, 2021; ARAUJO et al., 2022).

### Produção da invertase

A invertase foi produzida a partir da linhagem bacteriana *Bacillus tequilensis* (PP6) isolada dos frutos amazônicos da Pupunha, obtido por meio do projeto PROCAD-AM1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01). Essa bactéria foi preservada em tubos criogênicos contendo 50% de glicerol 40%, e 50% do meio de cultura, contendo 5 g/L de peptona de carne e 3 g/L de extrato de carne e armazenada a -80 °C até o momento da reativação. Para o repique em placas, foi utilizado o meio caldo nutriente com 20 g/L de ágar, 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne. O meio preparado e as placas foram esterilizados em autoclave, sendo feito em seguida as estrias utilizando alças de inóculo descartáveis estéreis e colocadas em incubadora Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) por 24 horas a 30 °C.

Após o crescimento do microrganismo em placas, foi preparado o pré-inóculo em frascos Erlenmeyer 125 mL, contendo 20 mL do meio basal, utilizando 5 g/L de peptona e 3 g/L de extrato de carne, sendo esterilizados a 121 °C por 15 minutos e inoculado a colônia do microrganismo com alças de inóculo descartáveis e estéreis. O pré-inóculo foi mantido em agitador tipo shaker a 150 rpm por 24 horas a 30 °C. Para o cultivo submerso, foram utilizados 2 mL do pré-inóculo em 18 mL de meio esterilizado, contendo cloreto de cálcio 0,01 g/L, cloreto de sódio 10,0 g/L, 0,1 g/L de fosfato monopotássio, 0,1 g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de sulfato de magnésio e 2% de sacarose. Esse cultivo foi mantido em agitador tipo shaker em 15 rpm, por 48 horas a 30 °C. Após esse tempo, as amostras foram colocadas em tubo falcon de 15 mL e centrifugadas a 3500 rpm, por 10 minutos a 10 °C, obtendo assim o sobrenadante para seguir com a imobilização (BASTOS, 2022).

Imobilização da invertase

A imobilização das enzimas nos suportes é realizada em um volume de 20 mL de amostra, contendo invertase extracelular, e misturado com 1,00 g de suporte (peso seco), em Erlenmeyer, mantido sob agitação de 150 rpm em shaker a temperatura constante de 30 °C. Foi retirado 1 mL do sobrenadante antes do início da imobilização e depois de finalizado o processo de imobilização para ensaios de atividade enzimática da invertase nesses momentos. Ao término da imobilização, foi realizado a filtração a vácuo, e a torta (suporte com a enzima imobilizada) armazenada sob refrigeração. Posteriormente, os ensaios de rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR).

#### Método para determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática (U/g) foi realizada pelo método Miller (1959), onde o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino, o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico. Durante essa reação o grupo aldeído é oxidado a ácido carboxílico, resultando em uma mudança de coloração da amostra de amarelo para vermelho marrom. Essa análise foi desenvolvida em triplicata, sendo preparado inicialmente o meio reacional com tampão McIlvain pH 5.0 e 2% de sacarose. 800 µL de meio reacional foi colocado em banho-maria a 50 °C por 5 minutos, após esse tempo foi adicionado 200 µL de amostra (ou 0,2 g do derivado imobilizado) nesse meio reacional.

Depois da homogeneização foram retirados 200 µL do meio reacional com a amostra e adicionado em 200 µL de DNS, sendo considerado o tempo zero. Após 5 minutos, outra alíquota de 200 µL da mesma amostra com meio reacional foi adicionada a solução de DNS. Essas amostras foram levadas para o banho-maria a 100 °C por 5 minutos e logo em seguida colocado no banho de gelo, adicionando 2 mL de água destilada. As leituras de absorbância foram realizadas em

espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm, com os valores, foi calculada a atividade enzimática (U/g) e a média das repetições.

#### Determinação dos parâmetros de imobilização

Após a determinação da atividade enzimática do sobrenadante antes e do final da imobilização do derivado imobilizado foi calculado o rendimento de imobilização (RI) pela Equação 1 e atividade recuperada (AR) pela Equação 2 (TARVENINI et al., 2021; PRADO, 2021). Este cálculo foi realizado para a invertase imobilizada em PHB.

$$RI \% = \frac{Ati}{(Ati - Atf)} \quad \text{Equação (1)}$$

$$AR \% = \frac{Ati}{Atd} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, *Atd* é a atividade enzimática (U) do derivado enzima-suporte, *Ati* representa a atividade enzimática do sobrenadante antes da imobilização e *Atf* a atividade enzimática após a imobilização. Estabilidade de armazenamento os ensaios da estabilidade de armazenamento prosseguiram durante 30 dias até o momento, sendo realizado com as enzimas imobilizadas em PBH e enzima livre como controle. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, determinando diariamente a atividade enzimática por 3 dias seguidos e esporadicamente completando os 30 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação da cinética de reação

Para análise da influência da concentração de substrato 1,0 g do biocatalisador imobilizado em PHB, foi colocado em 4.0 mL de meio reacional contendo tampão MClvaine pH 5,0 em diferentes concentrações de sacarose, sendo elas 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 50 g/L e 100 g/L, a 50 °C. Foram retiradas alíquotas desse meio reacional com 5 min, 10 min, 60 min, 240 min e 480 min, para análise da concentração de açúcares redutores, determinando a cinética de reação. Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram definidos os parâmetros cinéticos  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  a partir de análises de regressão não linear pelos ajustes do modelo de Michaelis-Menten (PRADO, 2021).

$$V_0 = V_{m\acute{a}x} * \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo,  $V_0$  a velocidade inicial,  $V_{m\acute{a}x}$  a velocidade máxima de reação,  $[S]$  a concentração de substrato e  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten ou constante do substrato. A constante  $K_m$  pode ser uma indicação de uma medida da afinidade da enzima pelo substrato quando o equilíbrio entre eles é alcançado (PRADO, 2021).

## DADOS E DISCUSSÃO

### Determinação dos parâmetros de imobilização

A invertase imobilizada no PHB, pelo método de adsorção, por um período de 8 horas obteve, conforme os parâmetros de imobilização, resultados da atividade enzimática conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização da invertase em PHB.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Parâmetros de imobilização	GLU-PHB	PHB
Rendimento de Imobilização%	76,72 ± 3,10	86,4 ± 1,40
Atividade Recuperada%	60,67 ± 4,07	78 ± 3,7

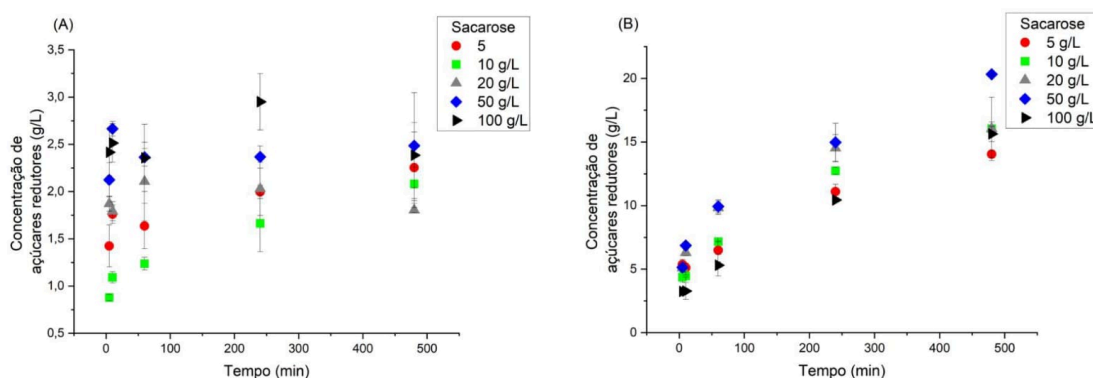
Fonte: Autora, 2024.

Os parâmetros de imobilização da invertase no PHB foram avaliados pelo cálculo do rendimento e da atividade recuperada da imobilização. Onde o rendimento de imobilização obtido foi de 86,4%, o que indica uma quantidade relativa da invertase no extrato enzimático que transmigra para o PHB, conforme estabelecido pela equação (1). Ao considerar a perda da atividade enzimática durante o processo no cálculo de rendimento, a equação (2), para confirmar a eficácia da reação catalítica, resultou num rendimento de 78% de atividade recuperada, evidenciando a efetiva imobilização das Enzimas no suporte (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020). Para a invertase imobilizada em GLU-PHB, o RI e AR foram de 76,72 ± 3,10 60,67 ± 4,07 respectivamente, constatando que em PHB puro houve êxito no processo de imobilização, como apresentados na Tabela 1.

### Influência da concentração de substrato na atividade enzimática e determinação da cinética de reação.

A análise da cinética de reação foi analisada durante o período de 8 horas, utilizando diferentes concentrações de substrato no meio reacional, analisando a influência do consumo da sacarose ao longo do tempo, como apresentado nas Figura 1 e 2, para o PHB tratado com glutaraldeído (GLU-PHB) e para o PHB puro.

Figura 1 – Concentração de açúcares redutores em função do tempo para as imobilizações em GLU-PHB (A) e PHB (B).



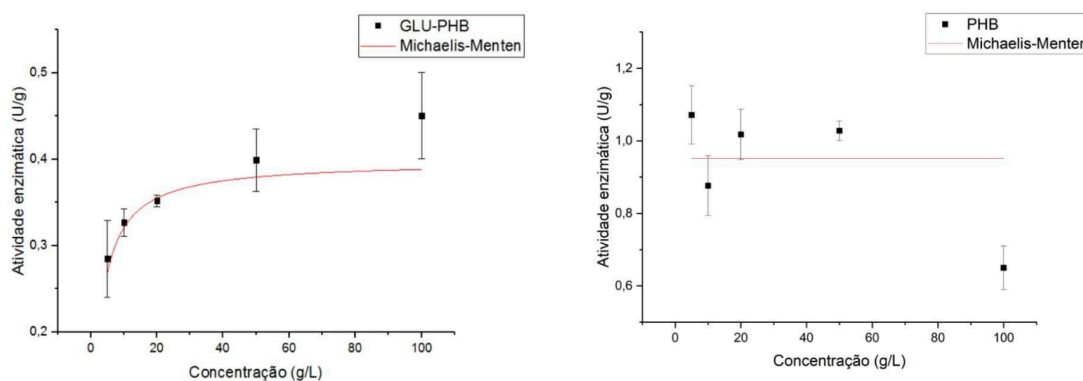
Fonte: Autora, 2024.

Para as amostras de GLU-PHB, observou-se um aumento constante na concentração de açúcares redutores após 1 hora de reação, tanto para 5 g/L quanto para 10 g/L de sacarose (análise estatística em Anexo, Tabela 03). A concentração de 20 g/L atingiu um valor da concentração de açúcares redutores alta com 10 minutos, porém após um período de 1 hora o valor diminui. A concentração de 50 g/L de sacarose manteve a produção constante após 1 hora.

Nas amostras de 100 g/L de sacarose, observou-se concentrações mais elevadas de açúcares redutores em comparação às outras concentrações, com um pico após 4 horas. Nas amostras contendo PHB puro, destacou-se o aumento constante em todas as concentrações (análise estatística em Anexo, Tabela 04). Evidenciando a concentração de 50 g/L que obteve o crescimento estável com o valor ideal da concentração de açúcares redutores após 1 hora, juntamente com a concentração de 20 g/L de açúcares redutores, entretanto para a amostra de 20 g/L houve uma queda após das 4 horas.

Para examinar a cinética enzimática através da análise da atividade enzimática para a imobilização GLU-PHB e para imobilização em PHB, onde se observa valores que variam em relação a concentração de substrato previamente utilizados, foi realizado um ajuste conforme o modelo de Michaelis-Menten, utilizando o software Origin Pro 2017, representado na Figura (2).

Figura 2 – Modelo de Michaelis-Menten para as imobilizações em GLU-PHB e PHB puro.



Fonte: Autora, 2024.

O gráfico com a imobilização em GLU-PBH indica um aumento na atividade enzimática à medida que a concentração de substrato aumenta, em um mesmo padrão consistente. Observa-se que os valores mais altos são nas concentrações de 50 g/L e 100 g/L de sacarose. Nas concentrações mais baixas, como 5 g/L e 10 g/L, parece que a quantidade de substrato foi insuficiente para a realização da reação enzimática. No gráfico da imobilização em PHB puro observa-se que o valor da concentração de 5 g/L é maior que o das demais concentrações, destacando a diferença entre o PHB tratado para o PHB puro. Nota-se também que a concentração de 100 g/L obteve um valor muito baixo, podendo indicar que a quantidade de substrato induz a

inibição da enzima imobilizada em PHB sem tratamento, com o aumento da concentração do substrato é em quantidade maior do que a de enzima, a velocidade de reação não aumenta mais atingindo um ponto de saturação, demonstrando que a enzima pode estar saturada (BARBOSA, 2022).

Os dados experimentais de concentração de açúcares redutores do biocatalisador GLU-PHB e PHB puro foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten para obtenção dos parâmetros cinéticos, conforme apresentado na Tabela 02, onde foi possível a determinação dos valores de  $V_{max}$  e  $K_m$ . No entanto, pode ser observado pelo valor de  $R^2$  que a cinética da reação catalisada pela invertase imobilizada em PHB não segue o comportamento descrito pela equação de Michaelis-Menten.

Tabela 02 – Parâmetros cinéticos obtidos para a invertase imobilizada em PHB funcionalizado com glutaraldeído e PHB puro.

Parâmetros cinéticos	Suporte	Michaelis-Menten
$V_{max}$ (U/g)	GLU-PHB	$0,40 \pm 0,02$
	PHB	$0,95 \pm 0,096$
$K_m$ (g/L)	GLU-PHB	$2,40 \pm 0,92$
	PHB	$1,62 \pm 1,61$
$R^2$	GLU-PHB	0,77
	PHB	-0,02626

As amostras GLU-PHB e PHB puro demonstraram valores distantes de  $V_{max}$ , indicando que a enzima imobilizada em PHB puro é mais

eficiente. As enzimas imobilizadas no suporte por ligação covalente tendem a sofrer restrições na capacidade de mudanças conformacionais inerentes às interações enzima-substrato. Causado possivelmente por excesso de ligações e junções de resíduos (RIBEIRO et al.; 2020). O  $V_{max}$  representa o ponto onde todos os sítios ativos da enzima estão saturados com substrato, não deixando enzima livre para se ligar a ele, evidenciando a velocidade com que a enzima pode hidrolisar um substrato.

Mas são valores relativos aproximados pelo modelo matemático, visto que, nem sempre ocorre uma ligação total ao substrato nas concentrações definidas (CASTRO et al., 2015).  $V_{max}$  com valores baixos tendem a significar que o agente modificador não fornecem resultados satisfatórios para uma boa ligação da enzima no suporte e altos valores indicam que a essencialidade de diminuição do substrato para a conversão do produto (CASTRO et al., 2015; RIBEIRO, 2016).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A invertase imobilizada em PHB e PHB funcionalizado com glutaraldeído mostrou-se capaz de produzir açúcares redutores, o que oferece uma série de vantagens em relação às enzimas livres. No entanto, a possibilidade de acoplar a invertase em um suporte sólido com e sem tratamentos mostra a diferença entre o potencial de reutilização, estabilidade operacional e desenvolvimentos de processos contínuos. A utilização do suporte polihidroxibutirato para imobilização da invertase em processos de ligações diferentes, ligação covalente e física, interferem consideravelmente na cinética enzimática, determinando a condição ideal para que os sítios ativos da enzima se encaixam no suporte e ocorra a conversão do substrato.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D.; CAMARGO, B. R.;  
FONTES-SAMANTA, G. C.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; REZENDE, S. T.

Purification and characterization of the invertase and a  
transfructosylase from *Aspergillus terreus*. *Journal of Food  
Biochemistry*, v. 42, n. 5, 2018.

ARAUJO, I. Imobilização de frutotransferase extracelular de  
*Aspergillus oryzae* IPT-301 em Polihidroxibutirato e sua caracterização  
bioquímica para a produção de frutooligossacarídeos. Dissertação  
(Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia,  
UNIFAL, Poços De Caldas, 2021.

ARAÚJO, I. M.; BECALETTE, P. C.; SILVA, E. S.; DIAS, G. S.; XAVIER, M. C. A.;  
ALMEIDA, A. F.; MAIORANO, A. E.; MORALES, S. A. V.; PERNA, R. F.  
Enhancement of fructotransferase stability by immobilization on  
polyhydroxybutyrate and glutaraldehyde-activated polyhydroxybutyrate  
for frutooligosaccharides production. *Journal of Chemical Technology  
and Biotechnology*, v. 98, p. 419-430, 2022.

ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOOST, M.;  
TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support  
materials: An update. *International Journal of Biological  
Macromolecules*, v. 168, p. 708-721, 2021.

BARBOSA, N. R. Imobilização de células de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em  
esponja de poliuretano para a produção enzimática de  
fruto-oligossacarídeos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)  
– Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFAL, Poços De Caldas, 2022.

BASTOS, L. T. A. Produção de invertases a partir de microrganismos isolados de frutos amazônicos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas 2022.

BAYRAMOĞLU, G.; KARAKIŞLA, M.; ALTINTAŞ, B.; METIN, A.U.; SAÇAK, M.; ARICA, M. Y. Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of Enzymes: Stability and catalytic properties of invertase, *Process Biochemistry*, v. 44, p. 880-885, 2009.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, v.90, p.66-80, 2020.

CABRERA, M. P.; ASSIS, C. R. D.; NERI, D. F. M.; PEREIRA, C. F.; SORIA, F.; CARVALHO, L. B. High sucrolytic activity by invertase immobilized onto magnetic diatomaceous earth nanoparticles. *Biotechnology Reports*, v. 14, p. 38–46, 2017.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4. P. 199-207, 2015.

EMREGUL, E.; SUNGAR, S.; AKBULUT, U. Polyacrylamide–gelatine carrier system used for Invertase immobilization. *Food Chemistry*, v. 97, p. 591-597, 2007.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, p. 2065–2082, 2015.

FARIA, L. L.; MORALES, S. A. V.; PRADO, J. P. Z.; DIAS, G.; SALMEIDA, A. F.; XAVIER, M. C. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; PERNA, R. F. Biochemical characterization of extracellular Fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of Fructooligosaccharides. *Biotechnol Lett* 43, 43–59, 2021.

KOTWAL, S. M.; SHANKAR, V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 311-322, 2009.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Bacterial invertases: Occurrence, production, biochemical Characterization, and significance of transfructosylation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 57, p. 803-813, 2017.

LABUS, K.; WOLANIN, K.; RADOSIŃSKI, Ł. Comparative Study on Enzyme Immobilization Using Natural Hydrogel Matrices—Experimental Studies Supported by Molecular Models Analysis. *Catalysts*, v. 10(5), p. 489, 2020.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 332-342, 2018.

MANOOCHERI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F. A Review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 25, 2020.

MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. Microfluidic reactors with immobilized enzymes—Characterization, dividing, perspectives. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 244, p. 84-106, 2016.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic Polymerizations: Possibilities, advantages, applications, *Bioresource Technology*, v. 115, p. 126-135, 2012.



NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial invertases: A review on kinetics, thermodynamics, Physiochemical properties. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 1202-1210, 2015.

ÖZTOP, H. N.; AKYILDIZ, F.; SARAYDIN, D. Poly (acrylamide/vinylsulfonic acid) hydrogel for Invertase immobilization. *Microscopy Research and Technique*, v. 83, p. 1487-1498, 2020.

PRADO, J. P. Z. Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em sílica gel pura e funcionalizada para produção de frutooligossacarídeos. 2021. 104 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2021.

RIBEIRO, L. M. O. Imobilização da enzima invertase em material mesoporoso SBA-15 com superfícies funcionalizadas por diferentes compostos orgânicos. 106 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Materiais) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

ROCHA, R. J. Imobilização de frutossiltransferase extracelular de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de fruto-oligossacarídeos. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2021.

TAVERNINI, L.; ROMERO, O.; ABURTO, C.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; ILLANES, A.; WILSON, L. Development of a hybrid bioinorganic nanobiocatalyst: Remarkable impact of the immobilization conditions on activity and stability of  $\beta$ -Galactosidase. *Molecules*, v. 26, p. 4152, 2021.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and Applications. *Current Opinion in Food Science*, v. 43, p. 27-35, 2022.

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e PROCAD-AM 1707/2018 - Processo nº 88887.666945/2022-00

## Capítulo 11

### Produção de lipídio microbiano a partir de vinhaça e melaço visando a produção de alimentos e biocombustíveis

Marciel Brito de Oliveira Silva

Michelle da Cunha Abreu Xavier

Sergio Andres Villalba Morales

#### RESUMO

A produção sustentável de lipídios é essencial para atender às necessidades energéticas e alimentares da sociedade. A levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 mostra-se promissora na produção de óleos microbianos, adaptando-se a diversos substratos sustentáveis. Métodos alternativos são necessários para atender à crescente demanda por lipídios. A utilização de substratos sintéticos pode aumentar os custos de produção de óleos microbianos, enquanto resíduos agroindustriais como vinhaça e melaço podem ser alternativas de baixo custo. O objetivo foi utilizar a vinhaça e melaço como fontes de carbono para a produção de lipídios microbianos. As fermentações foram realizadas utilizando vinhaça (V) e melaço (M), na proporção 95:05 (V/M), como meio de cultura, incubado a 28 °C e 200 rpm por 120 horas. A levedura foi capaz de utilizar o melaço e a vinhaça, como fontes únicas de carbono, atingindo crescimento máximo de 15,63 g/L de biomassa microbiana e 22,8 % (m/m) de conteúdo lipídico, tendo esgotado seus açúcares entre 72 h e 96 h. A *L. starkeyi* foi capaz de utilizar V:M, sem suplementação de sais, para crescimento celular e acúmulo de lipídios, demonstrando que estes subprodutos são promissores para exploração na obtenção de produtos de alto valor agregado.

**Palavras-chave:** Lipídio; *L. starkeyi*; Vinhaça; Melaço.

---

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia de Alimentos, Pibiti/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, marciel.oliveira@mail.uft.edu.br.

<sup>2</sup> Doutora em Engenharia Química, Universidade Federal do Tocantins, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins, michellecax@mail.uft.edu.br.

<sup>3</sup>Doutor em Engenharia Química, Universidade Federal do Tocantins, Curso de Engenharia de Alimentos, [sergio.morales@mail.uft.edu.br](mailto:sergio.morales@mail.uft.edu.br).

### INTRODUÇÃO

Com a preocupação do esgotamento de recursos naturais aliada aos desafios da mudança climática e à escassez de recursos fósseis, as reservas energéticas e abastecimento de alimentos tem se tornado uma preocupação nos últimos anos devido ao grande crescimento populacional (PATEL *et al.*, 2020; TAKAKU *et al.*, 2020; MARTINEZ-BURGOS *et al.*, 2023). Os lipídios são amplamente utilizados na produção de alimentos, suplementos nutricionais, detergentes, lubrificantes e biocombustíveis. Embora sejam obtidos principalmente de sementes oleaginosas, os métodos convencionais de produção de lipídios se mostram insuficientes para suprir a demanda atual. Os lipídios produzidos a partir de diferentes fontes microbianas, como leveduras, fungos e bactérias, são considerados uma alternativa sustentável aos lipídios derivados de plantas. O perfil de ácidos graxos dos lipídios microbianos é semelhante ao de óleos de culturas oleaginosas o que os torna excelentes candidatos para substituição em diversos produtos, devido à sua ampla gama de aplicações (JONES *et al.*, 2019; JUANSSILFERO *et al.* 2019).

Os óleos microbianos são utilizados na indústria alimentícia devido à presença de ácidos graxos essenciais para a saúde humana, como o ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenóico, que são essenciais para a saúde humana. Podem substituir a manteiga de cacau, ser usados como emulsificantes e na produção de biossurfactantes e outros produtos bioativos. Sua versatilidade permite sua aplicação em diversos setores, promovendo inovação e sustentabilidade na indústria (GHAZNI; MARANGO, 2022).

Diferente dos combustíveis fósseis, o biodiesel é um combustível renovável e menos poluente que os combustíveis comuns, causando pouco dano ambiental na combustão, uma forma inteligente de

reduzir os gases do efeito estufa (WANG *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). A utilização de microrganismos para a produção de óleos para biodiesel pode ser realizada de maneira sustentável, utilizando resíduos agrícolas e industriais como fontes de carbono, o que contribui para a redução de desperdícios. Os óleos microbianos podem ser projetados para ter características específicas que atendem aos requisitos de qualidade do biodiesel (GHAZNI; MARANGO, 2022).

*Lipomyces starkeyi* é uma levedura oleosa que tem a capacidade de produzir altos níveis de lipídios, chegando a atingir até 70 % do seu peso seco. (TAKAKU *et al.*, 2020). É um microrganismo que apresenta crescimento celular e conteúdo lipídico em diversos substratos, como xilose, glicose e hidrolisado hemicelulósico (HH) do bagaço e do melaço da cana-de-açúcar (ANSCHAU *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2014). Além de apresentar certa tolerância à presença de potenciais inibidores do processo fermentativo (OLIVEIRA *et al.*; 2021, ZHANG *et al.*, 2022). Utilizar substratos sintéticos pode elevar o custo de produção dos óleos microbianos, já o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substrato de baixo custo, como a vinhaça e o melaço, subprodutos da usina sucroalcooleira de etanol e vem sendo utilizado na fertirrigação de solo de modo exacerbado.

A vinhaça é um efluente da indústria do bioetanol, onde 13 L de vinhaça é gerado a cada 1 L de etanol, normalmente é utilizado como fertilizante do solo para o replantio da cana-de-açúcar no entanto a grande quantidade produzida acaba por gerar uma contaminação no solo, o que se tornando um problema ambiental. A vinhaça é composta por 93 % de água, 7 % de sólidos, sal em altos níveis com potássio, fenóis e melanoidinas; cerca de 40 % de matéria orgânica, principalmente ácidos orgânicos e rica em compostos nitrogenados (TORRES *et al.*, 2023; ALAMDARI *et al.*, 2023). O melaço, por sua vez, é um

subproduto gerado da indústria sucroalcooleira, gerado a partir do processamento de açúcar. O melaço é rico em açúcares como sacarose, glicose e frutose, possui pouca quantidade de nitrogênio e vitaminas, usualmente é utilizado para consumo humano mas também é utilizado em dietas animais não nutritivas e dietéticas (RAHMAN; PASUPATHI; KARUPPIAH, 2022; PALMONARI *et al.*, 2020).

Esses produtos úteis podem ser usados como fonte de carbono de baixo custo para o crescimento e síntese lipídica de *Lipomyces starkeyi*, ao mesmo tempo em que promovem um sítio alternativo para a vinhaça e gerando um produto de valor agregado. A *L. starkeyi* tem sido reportada na obtenção de lipídios a partir de melaço (VIEIRA *et al.*, 2014) e da mistura de vinhaça e melaço (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Assim, mais estudos são necessários visando melhorar a assimilação destas fontes de carbono e nutrientes pela *L. starkeyi* e a sua produtividade lipídica. Portanto, o objetivo deste trabalho é utilizar a vinhaça e melaço como fontes de carbono de baixo custo para a produção de lipídios microbianos avaliando o cultivo visando maior rendimento e produtividade em óleos.

## MÉTODO E MATERIAIS

### Reativação da Levedura

Para a reativação da levedura, foi coletada uma colônia do microrganismo *Lipomyces starkeyi* com o auxílio de uma alça e inoculada em um meio de cultura líquido YM, contendo extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de soja 5,0 g/L e glicose 10,0 g/L. O cultivo foi incubado numa incubadora orbital do tipo shaker (incubadora com agitação orbital TE-4200) a 28 °C e 200 rpm. Foram realizadas transferências consecutivas para novos meios de cultura para obtenção de maior quantidade de biomassa e, por fim,

foram criopreservadas em 10 % (v/v) de glicerol e armazenadas em freezer a - 4 °C.

### Pré-inóculo e inóculo

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado uma cepa estoque da levedura *L. starkeyi*. O pré- inóculo foi preparado um meio líquido YM em um Erlenmeyer (250 mL) contendo 45 mL de meio esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. Logo em seguida, inoculou-se assepticamente a cepa da levedura, incubada em a 28 °C, 200 rpm por 72 h. O inóculo foi preparado pela transferência de 10 % (v/v) do pré-inóculo para o meio líquido YM com volume final de trabalho de 50 mL, em frasco Erlenmeyer (250 mL), incubados a 28 ° C, 200 rpm durante 24 h.

### Fermentação

Para a fermentação em meio V:M, foram utilizados a vinhaça e melaço na proporção de 95:05 (v/v), 10 % (v/v) do inóculo e incubados a 28 °C, 200 rpm, pH 5,5. Alíquotas de amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### Determinação da biomassa microbiana

A biomassa microbiana foi determinada pelo método gravimétrico, através da massa seca obtida durante o processo fermentativo. Amostras de 1,5 mL foram centrifugadas a 3600 rpm por 5 minutos (Centrífuga excelsa II - Fanem 206 BL), lavadas com água destilada e os pellets foram secos a 60 °C (Nova Etica - 402/311) por 24 h, até atingir peso constante. A fermentação foi acompanhada pela determinação da absorbância em espectrofotômetro (METASH, UV-5100 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER) a 600 nm, relacionando com a curva padrão de biomassa microbiana. O meio composto por vinhaça

e melaço foi utilizado como branco para a fermentação. As análises foram realizadas em triplicata.

#### **Determinação do teor de sólidos solúveis totais**

O teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando um refratômetro de bancada (Refratômetro Abbe 13000-17000 Nd C/termômetro Digital S/atc BIOBRIX) em temperatura ambiente previamente calibrado com água destilada.

#### **Determinação de nitrogênio amoniacal**

O nitrogênio amoniacal foi determinado pela reação de Berthelot de acordo com o protocolo descrito por Srienc *et al.*, (1984) a 37 °C durante 30 minutos e a absorbância determinada a 630 nm. A curva de calibração foi construída com uma solução de 20 mg/L de N-NH<sub>3</sub> em diferentes diluições utilizando água deionizada.

#### **Determinação de açúcares**

A quantificação dos açúcares presentes no meio V:M 95:05 foi realizada por cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10 Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,4 mL/min, a 60 °C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 40 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-10A). Uma alíquota de 20,0 µl da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H<sup>+</sup> (300 x 7,8 mm) com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.



### Determinação do lipídio microbiano

A biomassa microbiana foi liofilizada a 400 mmHg e -40 °C utilizando um liofilizador condensador em Inox - L101. Logo em seguida a determinação dos lipídeos de origem microbiana foi realizada pelo método Bligh-Dyer utilizando metanol (CH<sub>3</sub>OH) e clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) como solventes para extração dos lipídios presentes nas células previamente tratadas com HCl 2M a 80 °C por 1 h e quantificados gravimetricamente pelo método BLIGH-DYER, (1959) modificado por Manirakiza *et al.*, (2001).

### DADOS E DISCUSSÃO

A escala °Brix é utilizada para medir a quantidade de sólidos solúveis em líquidos, tais como caldo de cana-de-açúcar, melaço e vinhaça. A maioria dos sólidos solúveis em sua grande parte são utilizados para quantificar açúcares totais, onde se mede um valor estimado (ALMEIDA *et al.*, 2018). O melaço apresentou uma alta concentração de teor de sólidos solúveis e baixa concentração na vinhaça, como observado na Tabela 1. Isso ocorre devido à grande quantidade de açúcares presentes no melaço. Esses dados são similares aos obtidos por Dantas, (2020), para o melaço de cana-de-açúcar que foi de 82,92 °Brix.

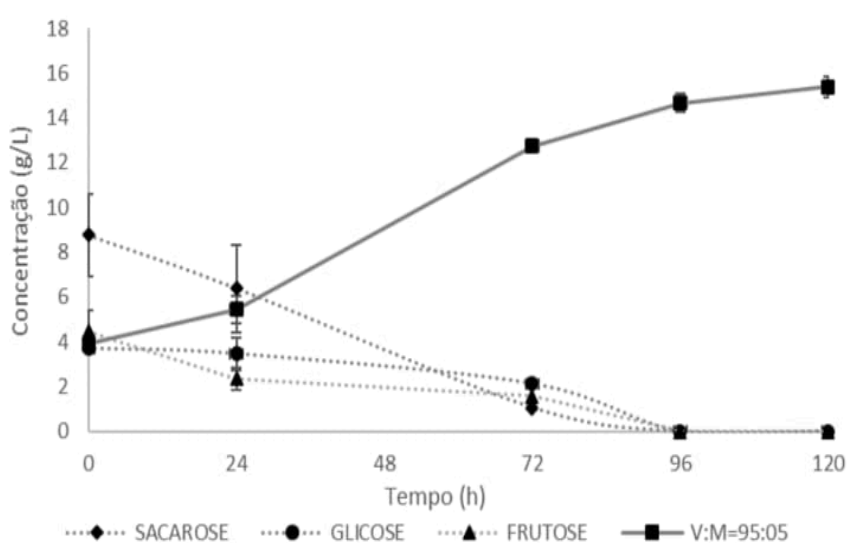
Tabela 1 – Determinação de sólidos solúveis (°Brix).

	Melaço	Vinhaça
°Brix	73,93 ± 0,42	2,95 ± 0,15

Fonte: Autor, 2024.

Para análise do perfil cinético de crescimento, foi avaliado o aumento do peso seco em função do tempo de incubação. A *L. starkeyi*

apresentou crescimento máximo em 120 horas em meio V:M=95:05 com a ausência da fase lag (Figura 1). A concentração de biomassa microbiana foi de  $15,38 \pm 0,48$  g/L, superior para essa proporção, uma vez que Cazetta; Celligoi, (2006) encontraram 7 g/L e 7,56 g/L em cultivo de V:M=75:25 com os microrganismos *Candida lipolytica* e *Rhodotorula mucilaginosa*, respectivamente.



Fonte: Autor, 2024.

**Figura 1** – Perfil cinético de crescimento celular e consumo de açúcares (determinados por HPLC) disponíveis em meio V:M = 95:05.

É notável observar que o microrganismo aparentemente não enfrentou dificuldades ao se adaptar ao meio V:M, predominantemente composto de vinhaça, a qual comumente contém compostos fenólicos. Esses compostos têm origem na reação de Maillard, que resulta da interação entre açúcares e grupos amino das proteínas presentes na sua constituição (SEIXAS *et al.*, 2016). Tais compostos podem influenciar ou inibir o processo fermentativo. O

melaço também contém alta carga de compostos orgânicos que são inibitórios dependendo de sua quantidade utilizada (NETO, 2022), sendo potenciais inibidores da fermentação. No entanto, para este estudo foi utilizado em pequena quantidade apenas como forma de incrementar a fonte de carbono na vinhaça.

A caracterização do perfil de utilização de açúcares pela *L. starkeyi* é fundamental para otimizar processos fermentativos e biotecnológicos. Os dados apresentados na Tabela 1 revelam que a *L. starkeyi* demonstrou preferência inicial pela frutose e sacarose, consumindo-as simultaneamente, sem evidências de repressão catabólica induzida pela presença de glicose, sendo ela utilizada em um estágio posterior da fermentação. Os açúcares foram consumidos entre 72 h e 96 h. A maioria dos microrganismos preferem glicose a outros açúcares simples devido à repressão do catabólito de glicose (ZHOU *et al.*, 2021). Um mecanismo regulatório que inibe o metabolismo de outros açúcares quando a glicose está presente, o que não é observado neste estudo. Foi relatado esse comportamento semelhante em algumas leveduras oleaginosas como a *Trichosporon fermentans* em meio fermentativo de ácido acético (LIU *et al.*, 2015).

Quanto à quantidade de lipídios (Tabela 2), diante das condições, a *L. starkeyi* foi capaz de alcançar um teor maior que 20 % em relação ao seu peso seco. Nessas condições, a levedura apresentou um baixo acúmulo de lipídios quando comparado ao estudo de Oliveira *et al.* (2021), utilizando condições de V:M de 90:10 e 70:30 onde se obteve um teor de lipídios de 40,92 % e 37,89%, respectivamente, com a mesma cepa de levedura.

Já Reis *et al.* (2019), por outro lado, ao utilizar somente vinhaça industrial em sua forma bruta, foi possível obter um acúmulo de 23,11 % de lipídios pelo microrganismo *Mucor circinelloides*. A maior quantidade de vinhaça utilizada, rica em compostos fenólicos com potencial inibitório (REIS *et al.*, 2019), pode ter afetado

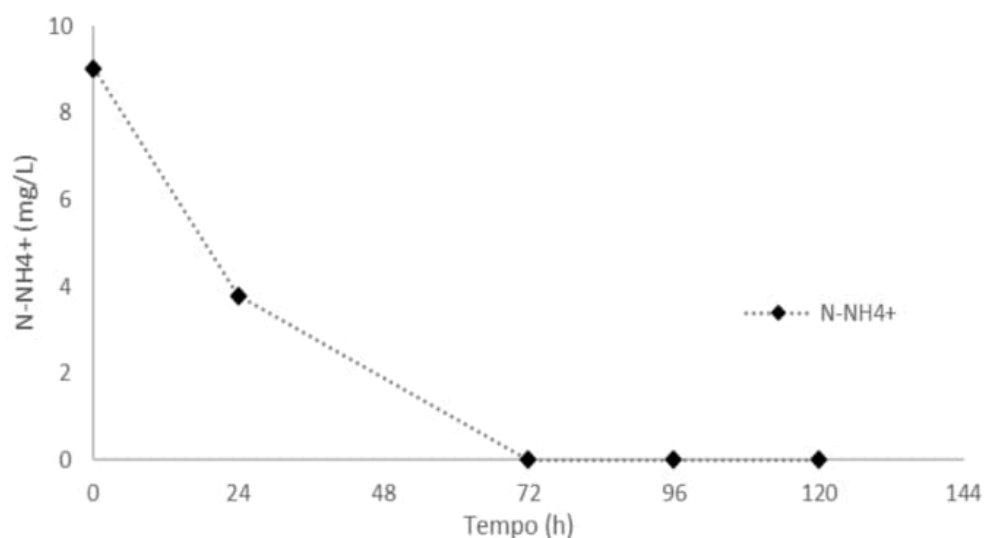
significativamente o processo fermentativo. Além disso, a baixa concentração de melaço, como principal fonte de carbono, pode ter sido limitante para o crescimento celular e a produção de lipídios.

Tabela 2 – Rendimento de lipídios totais em meio  
V:M=95:05.

V:M	B (g)	Lipídios (%)
95:05	$0,4273 \pm 0,003$	$22,8425 \pm 0,023$

B: biomassa celular; V:vinhaça; M: melaço.

Fonte: Autor, 2024.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 2 - Consumo de nitrogênio amoniacal em meio V:M=95:05.

O nitrogênio amoniacal foi consumido durante as fermentações do meio V:M=95:05, tendo-se esgotado pela *L. starkeyi* entre 48 h e 72 h de cultivo da fermentação (Figura 1). O processo de acúmulo de lipídios em microrganismos oleaginosos é favorecido quando o nitrogênio,

essencial para a síntese proteica e crescimento celular, é esgotado no meio e ainda há a presença de fonte de carbono (AZAMBUJA, 2016; CORADINI, 2014). Observa-se que após 24 h de fermentação a concentração da biomassa continua aumentando, o que sugere o acúmulo de lipídios a partir do carbono ainda disponível no meio de cultivo, após a baixa disponibilidade do nitrogênio (Figura 2).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concentrações de óleo microbiano foram detectados na utilização de vinhaça e melaço com meio de cultura sem suplementação com uma relação V:M=95:05, apresentando um acúmulo de 22,8% de lipídios, uma nova alternativa para o manejo da vinhaça é apresentada, demonstrando-se como um substrato potencial para produção de óleo microbiano. Dessa forma, a vinhaça e melaço se mostraram bastante promissores, caracterizando um novo fim sustentável da utilização da vinhaça, para produção de óleos de valor agregados.

## REFERÊNCIAS

- ALAMDARI, N.G.; ALMASI, H.; MORADI, M.; AKHGARI, M. Characterization of Carbon Quantum Dots Synthesized from Vinasse and Date Seeds as Agro-industrial Wastes. *Waste and Biomass Valorizations*, v. 14, p. 3689-3703, fevereiro de 2023.
- ALMEIDA, D. L.; SANTOS, C. S.; NUNES, P. S. O.; PAVAN, J. P. S.; SANTOS, L. G. A.; ALVES, M. C.; PEREIRA, V. P.; CARVALHO, W. S.; SILVA, V. A.; CARVALHO, S. P. Teor de grau brix em progênies de cafeeiros de grãos graúdos "Big Coffee VL". 2018.

AZAMBUJA, S. P. H. Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídeos de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. P. 174, 2016.

CAZETTA, L. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo de diferentes combinações de melaço/ vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por microrganismos. Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 27, n. 1, p. 03-10, Jan./Jun. 2006.

CORADINI, A. L. V. Domesticação genética da levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* e estudo da expressão de genes ligados ao metabolismo de xilose e lipídios durante fermentação em frascos agitados. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, p. 113, 2014

DANTAS, F. M. A. L. Utilização de melaço de cana-de-cana de açúcar em meio alternativo para crescimento de bactérias promotoras de crescimentos em plantas. 2020. 51 p. Trabalho de conclusão e curso – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

GHAZANI, S.M.; MARANGONI, A.G. Microbial lipids for foods. Trends in Food Science & Technology, v. 119, p. 593-607, janeiro de 2022.

JONES, A.D.; BOUNDY-MILLS, K.L.; BARLA, G.F.; KUMAR, S.; UBANWA, B.; BALAN, V. Microbial Lipid Alternatives to Plant Lipids. Microbial Lipid Production. v. 1995, p. 1-32, maio de 2019.

JUANSSILFERO, A.B.; KAHAR, J.; AMZA, R.L.; YOPI; SUDESH, K.; OGINO, C.; PRASETYA, B.; KONDO, A. Lipid production by *L. starkeyi* using sap squeezes from felled old oil palm trunks.

Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 127, n. 6, p. 276-731, junho de 2019. LIU, Z.; LIU, L.; WEN, P.; LI, N.; ZONG, M.; WU, H. Effects of Acetic Acid

and pH on the Growth and Lipid Accumulations of Oleaginous Yeast *Trichosporon fermentans*. BioResources, v. 10, n. 3, p. 4152-4166, 2015.

MARTINEZ-BURGOS, W.J.; VANDENBERGHE, L.P.S.; KARP, S.G.; MELLO, A.F.M.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Microbial lipid production from soybean hulls using *L. starkeyi* LPB53 in a circular economy. Bioresource Technology, v. 372, n. 128650, março de 2023.

NETO, L. T. Produção de metano a partir da codigestão anaeróbica de vinhaça e melaço. (Dissertação de Pós-Graduação) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, p. 55, 2022.

OLIVEIRA, M.C.C.; XAVIER, M.C.A.; MORALES, S.A.V.; DOMINICES, K.M.C. Produção de lipídio microbiano pela *Lipomyces starkeyi* a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira. XVI - Seminário de Iniciação Científica (SIC) - (UFT), 16, 2021, Palmas -TO. Anais (Anais do XVI Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Tocantins). Meio Digital: Even3, 23 de março de 2021. p. 1-10.

PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C.J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; BIAGI, G.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. Journal of Dairy Science, v. 103, n. 7, p. 6244-6249, julho de 2020.

PATEL. A.; GARAGEORGOU, D.; ROVA, E.; KATAPODIS, P.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MATSAKAS, L. An overview of potential oleaginous microorganismos and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. Microorganisms, v. 8, n. 434, p. 1-40, março de 2020.

REIS, C.E.R.; CARVALHO, A.K.F.; BENTO, H.B.S.; CASTRO, H.F.C. Integration of microbialbiodiesel and bioethanol industries through utilization of vinasse as substrate for oleaginous fungi. Bioresource Technology Reports. São Paulo, v. 6, p. 46-53, Junio de 2019.

SEIXAS, F. L.; GIMENES, M. L.; NÁDIA R. C. FERNANDES-MACHADO.

Treatment of vinasse by adsorption on carbon from sugar cane bagasse. *Química Nova*, Apucarana – PR, Vol. 39, No. 2, p. 172-179, 2016.

SRIENC, F.; ARNOLD, B.; BAILEY, J. E. Characterization of intracellular accumulation of poly- beta-hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, n. 8, p. 982-987, 1984 1984.

TAKAKU, H.; MATSUZAWA, T.; YAOI, K.; YAMAZIKI, H. Lipid metabolism of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 6141-6148, maio de 2020. TAKAKU, H.; MIYAJIMA, A.; KAZAMA, H.; SATO, R.; ARA, S.; MATSUZAWA, T.; YAOI, K.; ARAKI, H.; SHILDA, Y.; OGASAWARA, W.; YAMAZAKI, H. A novel electroporation procedure for highly efficient transformations of *L. starkeyi*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 169, n. 10586, fevereiro de 2020.

TORRES, M.A.; VALDEZ, A.L.; ANGELICOLA, M.V.; RAIMONDO, E.E.; PAJOT, H.F.;

NIETO-PENALVER. Vinasse as a substrate for inoculant culture and soil fertigation: Advancing the circular and green economy. *Science of The Total Environment*, v. 887, n. 164014, agosto de 2023.

VIEIRA, J. P. F.; IENCZAK, J. L.; ROSSELL, C. E. V.; PRADELLA, J. G. C; FRANCO, T. T.

Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology Letters*, v.36, p. 2433-2442, ago. 2014.

WANG, H.; PENG, X.; ZHANG, H.; YANG, S.. LI, H.

Microorganisms-promoted biodiesel productions from biomass: A review. *Energy Conversion and Management: X*, v. 12, n. 100137. dezembro de 2021.

ZHANG, L.; LEE, J.T.E.L.; OK, Y.S.; DAI, Y.; TONG, Y.W. Enhancing microbial lipids yield for biodiesel production by oleaginous yeast *Lipomyces*



*starkeyi* fermentation: A review. Bioresource Technology, v. 344/B, n. 126294, janeiro de 2022.

ZHANG, L.; LOH, K.C; KUROKI, A.; DAI, Y.; TONG, Y.W. Microbial biodiesel production from industrial organic wastes by oleaginous microorganisms: Current status and prospects. Journal of Hazardous Materials, v. 405, n. 123543, janeiro de 2021.

ZHOU, W.; WANG, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, M.; TANG, M.; ZHOU, W. A metabolic model of *Lipomyces starkeyi* for predicting lipogenesis potential from diverse low-cost substrates. Biotechnology for Biofuels, v. 14, n. 148, p. 1-17, julho de 2021.

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

## Capítulo 12

### Eficiência de *Bacillus subtilis* no biocontrole e promotor de crescimento vegetal na cultura do arroz

Nathália Santos Hoffmeister <sup>1</sup>

Aloisio Freitas Chagas Junior <sup>2</sup>

#### RESUMO

O gênero *Bacillus*, composto por bactérias formadoras de endósporos, é valorizado na agricultura devido à sua diversidade e abundância. Essas cepas são investigadas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e agentes biocontroladores de fitopatógenos. As espécies de *Bacillus* produzem metabólitos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas, além de promoverem o crescimento vegetal por meio de diversos mecanismos, como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo, produção de fitohormônios e resistência a estresses. Em particular, o arroz irrigado é vulnerável a várias doenças, exigindo métodos de controle alternativos, como o biológico. O uso de *Bacillus* para esse fim é vantajoso devido à sua eficácia, custo baixo e impacto ambiental positivo. No entanto, cepas comerciais de *B. subtilis* podem não persistir em certos solos, justificando a necessidade de selecionar linhagens nativas. Dessa forma, a seleção de isolados de *B. subtilis* de solos do cerrado para desenvolver inoculantes com potencial biocontrolador e promotor de crescimento é essencial. No experimento, estes inoculantes mostraram eficácia na solubilização de fosfato, promovendo o crescimento e a produtividade do arroz, além de apresentarem potencial para o controle de fitopatógenos. O tratamento de sementes com esses isolados demonstrou redução do crescimento fúngico e melhor absorção de nutrientes, resultando em plantas mais saudáveis e produtivas.

Palavras-chave: Microbiologia Agrícola; Fitopatógenos; Biomassa; Produtividade.

---

1 Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, [nathalia.hoffmeister@mail.uft.edu.br](mailto:nathalia.hoffmeister@mail.uft.edu.br).

2 Doutor em Biotecnologia, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, [chagasjraf@mail.uft.edu.br](mailto:chagasjraf@mail.uft.edu.br).

## INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus*, composto por bactérias formadoras de endósporos, desperta considerável interesse na agricultura devido à sua ampla diversidade e abundância (VILLARREAL-DELGADO, et al., 2017). Cepas pertencentes a esse gênero são frequentemente estudadas como rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e têm demonstrado potencial biocontrolador contra diversos fitopatógenos (LI, Y., et al., 2015; DE OLIVEIRA NASCIMENTO, et al., 2020; ARGUELLES-ARIAS, et al., 2009).

As espécies de *Bacillus* têm mostrado capacidade de sintetizar metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e antifúngica contra microrganismos fitopatogênicos. Além disso, apresentam diversos mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento vegetal, como fixação de nitrogênio, solubilização e mineralização de fósforo, ciclagem de matéria orgânica, produção de fitohormônios, sideróforos, compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas, resistência sistêmica induzida (ISR) e tolerância a estresses abióticos (SAXENA, et al., 2019; KALAM, et al., 2020; CHAGAS JUNIOR et al., 2022a,b).

A cultura do arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) é suscetível a diversas doenças, com ataques endêmicos frequentes resultando em perdas na produção e na qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Portanto, torna-se essencial a busca por métodos alternativos de controle, sendo o controle biológico uma alternativa viável.

O uso de espécies de *Bacillus* no controle de doenças oferece vantagens significativas devido à sua eficácia, praticidade, custo relativamente baixo e impacto sustentável no ambiente (SHAFLI, et al., 2017). Todos esses atributos fazem do gênero *Bacillus*, o ingrediente ativo da maioria dos produtos biológicos comerciais recentes (DORIGHELLO, 2017), sendo indicado para o tratamento sanitário de sementes, que são consideradas um dos mais importantes insumos agrícolas, e aplicação foliar de diversas culturas.

Porém, espécies de *B. subtilis* que compõem inoculantes comerciais podem não sobreviver em solos locais devido as variações nas condições edáficas e climáticas, sendo possíveis de serem superadas por bactérias nativas mais bem adaptadas durante a colonização vegetal, o que pode resultar em um desempenho insatisfatório das rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (RPCPs). Portanto, a justificativa para o isolamento e seleção de linhagens nativas de *B. subtilis* é notória.

Assim, a discussão sobre o isolamento e seleção de cepas nativas de *B. subtilis* é importante, considerando o impacto econômico da adoção da tecnologia de inoculantes para o controle biológico e como promotores do crescimento vegetal, que englobam benefícios como o incremento do desenvolvimento vegetal, aumento da produtividade e facilitação da absorção de nutrientes (MANJULA; PODILE, 2005). Dessa forma, a geração de novos inoculantes isolados de regiões específicas é fundamental para promover o uso de inoculantes produzidos com isolados de *B. subtilis* como promotores de crescimento em culturas estratégicas para o Cerrado.

O objetivo do trabalho foi avaliar a promoção de crescimento vegetal e solubilização de fosfato por *Bacillus subtilis* na cultura do arroz em casa de vegetação; determinar a eficiência desse microrganismo na biomassa e produtividade do arroz nessas condições, e investigar seu potencial de controle biológico de fitopatógenos do solo.

## MÉTODO E MATERIAIS

O objetivo do estudo foi avaliar o impacto de três isolados bacterianos de *Bacillus subtilis* (UFT-Bs10, UFT-Bs08 e Bs-PANTA) da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT, localizado no Campus de Gurupi. Os isolados UFT-Bs10 e UFT-Bs08 foram originários de solos de cerrado em áreas de cultivo no Estado do Tocantins. Uma identificação preliminar foi conduzida com base em características

morfológicas e referências bibliográficas especializadas (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Os isolados foram mantidos em meio à cultura de estoque LB (Luria-Bertani) e foram subcultivados em meios de cultura LB e BDA. OBs-Panta é um produto comercial registrado como promotor de crescimento vegetal.

### Teste de antagonismo

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium*, *Macrophomina* e *Rhizoctonia*, provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFT, Campus de Gurupi, foram utilizados nos experimentos. Para iniciar os estudos in vitro, os patógenos foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata- Dextrose-Ágar) por sete dias de incubação, em uma câmara de crescimento B.O.D, sob um fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $25 \pm 2$  °C (SALGADO, et al., 2003). Os três isolados de *Bacillus subtilis* (antagonistas) foram cultivados em meio BDA sólido por três dias. A atividade antagônica desses isolados foi avaliada por meio de dois métodos.

No método 1, foi empregada a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista. Após os três dias de crescimento dos isolados de *B. subtilis*, inóculos foram propagados em placas contendo meio BDA utilizando uma alça de platina. Posteriormente, discos de 7 mm com colônias de cada fungo fitopatogênico, cultivados por sete dias, foram colocados no centro das placas.

No método 2, foi adotada a técnica de cultura pareada, em que o isolado de *B. subtilis* foi repicado circularmente em uma extremidade da placa contendo meio BDA, a 1,5 cm da borda, e após o crescimento dos fungos fitopatogênicos por sete dias, um disco de 7 mm contendo a cultura foi colocado na outra extremidade (MELO; VALARINI, 1995). Placas contendo apenas o fungo foram utilizadas como controle (testemunha). Para a avaliação, foram realizadas medições diárias do diâmetro das colônias após a repicagem, utilizando um paquímetro, para obter uma média para cada colônia. A porcentagem de inibição do crescimento

micelial (PIC) foi calculada conforme a fórmula proposta por Menten et al. (1976), em que:  $PIC = [(Crescimento\ da\ testemunha - Crescimento\ tratamento) / Crescimento\ da\ testemunha] \times 100$  Os tratamentos que não apresentaram inibição de crescimento foram atribuídos com nota zero. O experimento foi conduzido em triplicata.

#### Capacidade de solubilização de fosfatos pelos isolados dos *B. subtilis*.

O meio LB foi preparado adicionando 250 mL em erlenmeyers, e em seguida transferido para a capela de fluxo laminar para a inoculação dos microrganismos isolados, individualmente. Posteriormente, foi colocado na Shake durante 3 dias a 130 rpm. Sequencialmente, foi feita a assepsia superficial da semente onde, utilizou-se uma solução de álcool 70% (v v-1) por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2% (v v-1) por 5 minutos e, então, seis banhos em água destilada esterilizada.

As sementes foram deixadas sobre papel toalha esterilizado a fim de secar, e em seguida, foram submersas por 10 minutos na matriz para melhor aderência das bactérias. Após isso, as sementes foram inseridas em tubos de ensaio contendo o meio NBRIP modificado (anexo 1) (pH ajustado para 6,5), conforme descrito por Sylvester-Bradley et al. (1982). Os experimentos foram realizados em ambiente com fotoperíodo de 12/12 horas de luz, em triplicata, incluindo um controle negativo com o meio NBRIP e meio Ágar-Ágar.

Adicionalmente, foi conduzido um teste de solubilização dos *Bacillus* em placas de Petri com meio NBRIP, onde foram repicados circularmente em três pontos em placas e incubados à temperatura ambiente para avaliar o potencial de solubilização de fosfato in vitro. As medições dos diâmetros do halo de solubilização e da colônia foram realizadas diariamente com um paquímetro manual ao longo de 8 dias. Com base nessas medidas, os índices de solubilização (IS) foram calculados pela fórmula:  $IS = \text{diâmetro do halo} / \text{diâmetro da colônia}$ . Com base nos valores dos índices, as bactérias foram classificadas

como cepas com baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 4$ ) e alta solubilização ( $IS > 4$ ).

### Inoculação de *Bacillus subtilis* em solo em casa de vegetação

Para a preparação do inoculante, o meio de cultura LB líquido foi cultivado em Erlenmeyer com 250 mL, onde as três espécies de *Bacillus* foram cultivadas, individualmente, e agitadas na Shake durante três dias a 130 rpm.

O experimento foi realizado em tubetes, utilizando uma mistura de solo e areia com o substrato Ouro Negro, composto por casca de pinus, pó de coco, fibra de coco e carvão vegetal. Foram realizadas duas avaliações, uma sem fosfato natural e a outra com adubação de fosfato natural, contendo KCl e NPK, a fim de auxiliar na germinação. Seis sementes foram semeadas por tubete em casa de vegetação, sendo os isolados de *Bacillus subtilis* inoculados diretamente na cova sobre as sementes no momento do plantio com 1 mL/tubete de uma suspensão bacteriana de água destilada e 0,5 de NaCl obtido da raspagem de células, contendo uma concentração média de  $1 \times 10^9$  UFC por mL, conforme Braga Júnior (2015). Cada tratamento foi repetido seis vezes, incluindo testemunhas, em condições de temperatura ambiente, com irrigação diária por meio de uma barra fixa de microaspersores. Nestes dois ensaios, após o aparecimento da segunda folha, as plantas foram desbastadas, deixando-se apenas uma por tubete.

As avaliações biométricas foram feitas 40 dias após o plantio. Foram obtidos o comprimento aéreo (CA), comprimento da raiz (CR), a massa fresca da raiz (MFR), massa fresca total (MFT), massa seca de raiz (MSR) e massa seca total (MST) dos cultivares. A eficiência relativa de cada tratamento para cada cultura foi determinada a partir dos dados de biomassa.

## DADOS E DISCUSSÃO

### Antagonismo

Para o no método 1, foi empregada a técnica de cultura fúngica sobre cultura antagonista (Figuras 1 – A1, B1, C1, D1, E1 e F1). Nesta técnica, foi possível verificar que todos os isolados de *Bacillus* inibiram o crescimento dos patógenos, exceto o UFT-Bs08 que não conseguiu se sobrepor ao crescimento da *Macrophomina* (Figuras 1 - E e F). Já no método 2, de pareamento de colônias, a inibição dos fitopatógenos pelo antagonista é observada pela formação do halo de inibição, que se manifesta como uma limitação do crescimento micelial. Para o *Fusarium* (Figura 1 – A e B), foi observado a formação de halo de inibição ao utilizar UFT-Bs08 e BsPanta. Para a *Rhizoctonia* (Figura 1 – C e D), o único tratamento efetivo foi ao utilizar UFT-BsPanta. Por fim, ao avaliar o crescimento da *Macrophomina* (Figura 1 – E e F), foi possível notar que houve a formação de halo de inibição ao utilizar UFT-Bs08 e Bs-Panta.

Desse modo, os resultados deste estudo indicam que as cepas UFT-Bs08 e Bs-Panta demonstram atividade antagônica contra os fitopatógenos *Fusarium* e *Macrophomina*, diferindo da testemunha. Este efeito antagônico resultou em uma notável inibição do crescimento micelial dos fungos quando comparado com o controle. Esses achados corroboram a eficácia promissora dessas cepas no controle biológico de patógenos radiculares. Essa observação está alinhada com o estudo de Bautista et al. (2016), que investigou diferentes linhagens de *Bacillus* spp. e constatou sua capacidade de inibir o crescimento micelial in vitro de patógenos do gênero *Fusarium* isolados de *Capsicum* chinês. Em contrapartida, na utilização de UFT-Bs10 não houve inibição em nenhum dos casos. A porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada e dada conforme a Tabela 1.

Assim, observa-se que as cepas de *Bacillus subtilis* desempenharam um papel eficaz no controle dos fitopatógenos. No entanto, a eficácia desse controle varia consideravelmente, dependendo das características do isolado e de sua adaptação às condições específicas do ambiente, tanto bióticas quanto abióticas, dentro e entre as espécies. Essa variabilidade ocorre devido à capacidade dos isolados de *Bacillus subtilis* de sintetizar uma ampla



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

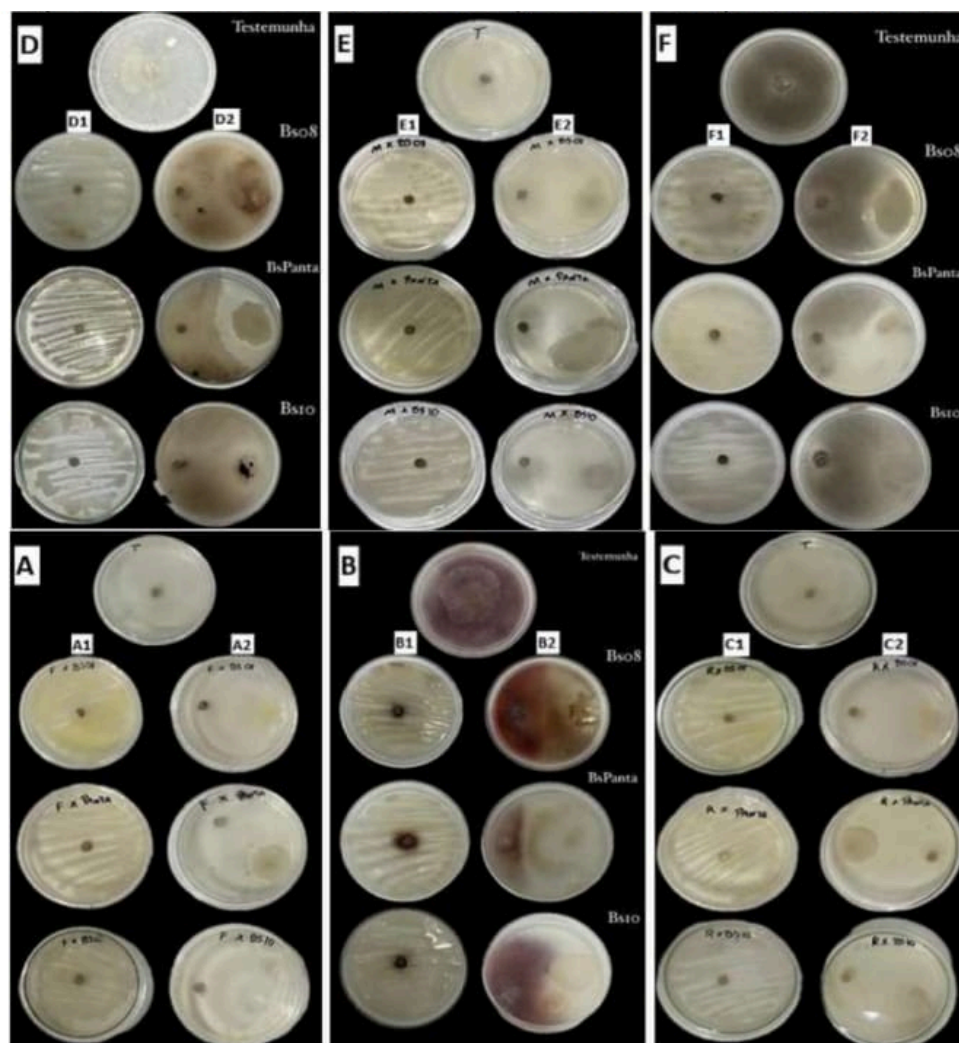
gama de metabólitos antifúngicos, conforme descrito por Lanna Filho; Ferro; De Pinho (2010).

Tabela 1. Porcentagem de inibição micelial (PIC)

PIC (%)	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Macrophomina</i>
UFT-Bs08	27	0	28
UFT-Bs10	15.3	0	24
Bs-Panta	30.6	7.5	21

Fonte: Autores, 2024.

**Figura 1:** Teste de antagonismos (pareamento) de *Bacillus subtilis* isolados UFT-Bs08, UFT-Bs10 e Bs-Panta contra *Fusarium* sp. após quatro dias (A1, método 1 e A2, método 2) e oito dias (B1, método 1 e B2, método 2), contra *Fusarium* (A, B), contra *Rhizoctonia* sp. após quatro dias (C1, método 1 e C2, método 2) e oito dias (D1, método 1 e D2, método 2) e contra *Macrophomina* sp. após quatro dias (E1, método 1 e E2, método 2) e oito dias (F1, método 1 e F2, método 2).



Fonte: Autores, 2024.

### Solubilização de fosfatos e produção dos isolados *B. subtilis* e das sementes de arroz inoculadas

Todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfatos, sendo considerados de alta capacidade de solubilização (Tabela 2).

Tabela 2: Capacidade de solubilização de fosfato por isolados de *Bacillus subtilis*.

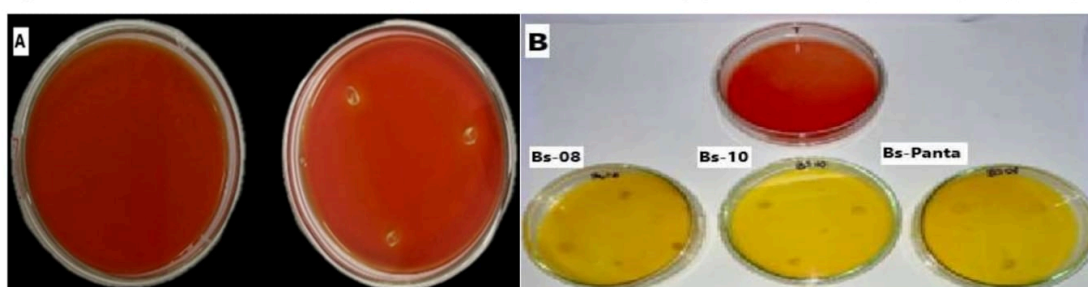
## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

UFT-Bs08	+++	Alto
UFT-Bs10	+++	Alto
Bs-Panta	+++	Alto

\* Índice de solubilização de fosfato (IS): +,  $IS < 2$  (baixo); ++,  $2 < IS < 4$  (médio); +++,  $IS > 4$  (alto)

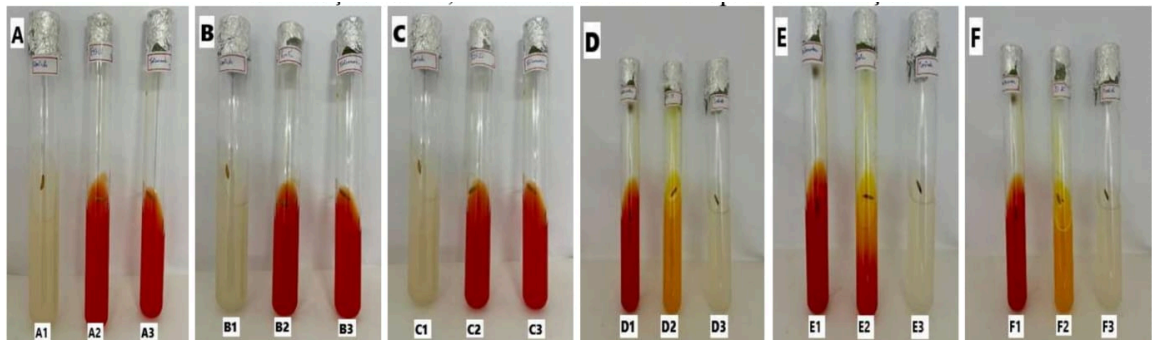
Conforme a Figura 2, pode-se notar que após os 8 dias de observações, todos os *Bacillus* foram capazes de solubilizar a placa por completo.

Figura 2: Solubilização de fosfato por *Bacillus*, no dia 0 (A) e oito dias após a repicagem (B).



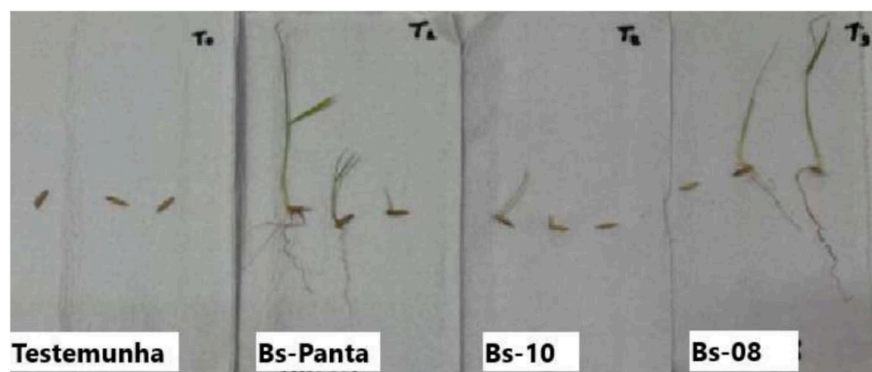
Na Figura 3, tem-se o resultado do teste de solubilização em tubos de ensaio. Neste, em todos os tratamentos foram possíveis de observar a solubilização do meio. Desse modo, o resultado da solubilização de fosfato no arroz em tubos de ensaio, após 8 dias, mostrou a capacidade de solubilização pelos isolados.

Figura 3: Solubilização de fosfato por UFT-Bs08, UFT-Bs10 e Bs-Panta inoculados em sementes de arroz. A e D, UFT-Bs08 a 0 e 8 dias após a inoculação. B e E, UFT-Bs10 a 0 e 8 dias após a inoculação. C e F, Bs-Panta a 0 e 8 dias após a inoculação



Houve germinação das sementes de arroz no período do experimento nos tratamentos com a inoculação dos isolados de *Bacillus subtilis*, evidenciando o efeito dos microrganismos na germinação de sementes.

Figura 4: Germinação de sementes inoculadas com *Bacillus subtilis*.



### Inoculação em casa de vegetação

Aos 20 dias após o plantio (DAP), a inoculação com os diferentes isolados de *B. subtilis* foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) para as características de altura de plantas (altura), massa seca da raiz (MSR) e massa seca tota (MST) (Tabela 3) em relação a testemunha sem inoculação. Para o comprimento de raiz (CR) o tratamento com Bs-Panta foi superior ( $p < 0,05$ ). Aos 40 DAP, para o CR todos os isolados foram superiores a testemunha e, entres estes, os isolados Bs-08 e Bs-10 foram superiores ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). Para a altura, MSR e MST, os isolados Bs-08

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

e Bs-10 foram superiores ( $p < 0,05$ ) em relação a testemunha e ao isolado Bs-Panta (Figura 3).

**Tabela 3.** Biomassa de plantas de arroz inoculadas com *Bacillus subtilis*, aos 20 e 40 dias após o plantio.

Isolados	Altura (cm)	CR (cm)	MSR (mg)	MST (mg)	Altura (cm)	CR (cm)	MSR (mg)	MST (mg)
Bs-08	16,3 a	18,9 b	72 a	77 a	30,2 a	28,0 a	320 a	691 a
Bs-10	15,5 a	19,2 b	76 a	83 a	32,0 a	27,8 a	328 a	680 a
Bs-Panta	16,3 a	24,3 a	70 a	76 a	27,8 b	27,5 a	274 b	562 b
Testemunha	13,8 b	19,9 b	42 b	58 b	26,5 c	23,2 b	185 c	450 c
C.V.	6,5	5,4	4,5	4,4	4,2	4,1	4,8	5,1

O efeito in vivo pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole (MOHAMED et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2021). Araujo et al. (2012) reportaram em seu trabalho utilizando o feijão caupi cultivar BRS Guariba, que a inoculação de *B. subtilis* (PRBS-1) proporcionou o maior aumento no crescimento da planta, maior fixação de N não afetou a nodulação, aos 40 e 55 dias após a semeadura. Resultados semelhantes também foram reportados por Mohamed et al. (2018) e Kalam et al. (2020) para o tomate, Guimarães et al. (2021) para a cultura do milho, Santos et al. (2021) para a cultura da aveia branca e Rezende et al. (2021) para o feijão.

Os isolados de *B. subtilis* Bs-08 e Bs-10 mostraram-se eficiente nas variáveis analisadas em relação ao isolado comercial Bs-Panta e a testemunha sem inoculação. A eficiência do uso de *B. subtilis* no crescimento de plantas está relacionado com as características biológicas deste micro-organismo que expressa facilidades para a manutenção de sua viabilidade em bioformulados e com isso a potencialidade para promover o crescimento vegetal.

A utilização de bactérias que possuam capacidade de solubilização de fósforo, em meio líquido em um intervalo de tempo reduzido, é uma característica essencial para a seleção de isolados

para a produção de inoculantes, mostrando a capacidade dos isolados testados no presente estudo como possíveis microrganismos de bioprodutos como promotor de crescimento vegetal de plantas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de sementes com isolados de *Bacillus* é uma alternativa promissora para o controle de fungos fitopatogênicos do solo, devido a redução do crescimento micelial dos fungos testados, e na promoção do crescimento vegetal, visto que os *Bacillus subtilis* apresentaram capacidade de solubilizar fosfato e as sementes de arroz, que foram inoculadas, resultaram em plantas com maior acúmulo de biomassa devido a melhor absorção de nutrientes essenciais pelas plantas.

## REFERÊNCIAS

ARGUELLES-ARIAS, A., ONGENA, M., HALIMI, B., LARA, Y., BRANS, A., JORIS, B., & FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, v. 8, p. 1-12, 2009.

MEJÍA-BAUTISTA, M. Á., REYES-RAMÍREZ, A., CRISTÓBAL-ALEJO, J., TUN-SUÁREZ, JM, BORGES-GÓMEZ, LDC, & PACHECO-AGUILAR, JR. *Bacillus* spp. no controle da marcha causada por *Fusarium* spp. em *Capsicum chinense*. *Revista mexicana de fitopatologia*, v. 3, pág. 208-222, 2016.

BRAGA JÚNIOR, Gaspar Moreira. Eficiência de *Bacillus subtilis* no biocontrole de fitopatógenos e promotor de crescimento vegetal. 2015.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; BRAGA JUNIOR, G. M.; LIMA, C. A.; MARTINS, A. L. L.; SOUZA, M. C.; CHAGAS, L. F. B. *Bacillus subtilis* as a vegetable growth promoter inoculant in soybean. *Diversitas Journal*, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2022a.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; BRAGA JUNIOR, G. M.; MARTINS, A. L. L.; CHAGAS, L. F. B.; MILLER, L. O.; BEZERRA, A. C. C. *Bacillus subtilis* Bs10 as an efficient inoculant for growth promotion in soybean plants. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v. 43, n. 4, p. 1769-1786, jul./ago. 2022b.

DORIGHELLO, D. V. Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja. 2017. 135p. (Tese de Doutorado). Programa de Pós Graduação em Agronomia / Proteção de Plantas. Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCA). Botucatu.

GUIMARÃES, V. F. et al. Eficiência de inoculante contendo *Bacillus megaterium* (B119) e *Bacillus subtilis* (B2084) para a cultura do milho, associado à fertilização fosfatada. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. 1-28, 2021.

KALAM, S.; BASU, A.; PODILE, A. R. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon*, v. 6: e04734, 2020.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LI YUNLONG, LY, GU YILIN, GY, LI JUAN, LJ, XU MINGZHU, XM, WEI QING, WQ, & WANG YUANHONG, WY. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*, v. 6, n. 883, p. 1-15, 2015.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p.1057-1062, 2005.

MELO, I. S. de; VALARINI, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in cucumber (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola*, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MENTEN, J. O. M; MACHADO, C. C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MOHAMED, EMAN A. H. et al. Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, v. 9, n. 03, p. 266-277, 2018.

DE OLIVEIRA NASCIMENTO, I., RODRIGUES, A. A. C., ANDRADE, K. S. P., CUNHA, W. L., MORAES, F. H. R., & DE SOUSA, F. A. Microbiolização de sementes de arroz com *Bacillus* spp. na redução de patógenos. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 10, p. e189108138- e189108138, 2020.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p.

REZENDE, C. C. et al. Physiological and agronomic characteristics of the common bean as affected by multifunctional microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 42, n. 2, p. 599-618, 2021.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

RIBEIRO, A.S. Avaliação crítica dos projetos do PNP- Arroz na área de fitopatologia, no período de 1980 a 1990 - Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Anais, 4º. Reunião Nacional de Pesquisa do Arroz Irrigado, Goiânia GO. 1994. pp. 177-213.

SALGADO, A. P. S. P., CARDOSO, M. D. G., SOUZA, P. E. D., SOUZA, J. A. D., ABREU, C. M. P.; PINTO, J. E. B. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de Eucalyptus sobre Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea e Bipolaris sorokiniana. Ciência e Agrotecnologia, v. 27, p. 249-254, 2003.

SANTOS, A. F. et al. Biometria e estado nutricional da cultura da aveia branca (Avena sativa L.) sob inoculação com Bacillus subtilis e B. megaterium. Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e53410515270, 2021.

SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. Journal of Applied Microbiology, v. 128, p. 1583-1594, 2019.

SHAFI, J., TIAN, H., & JI, M. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A. & PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amazon., v. 12, p. 15-22, 1982.

VILLARREAL-DELGADO, M. F., VILLA-RODRÍGUEZ, E. D., CIRA-CHÁVEZ, L. A., ESTRADA-ALVARADO, M. I., PARRA-COTA, F. I., & SANTOS-VILLALOBOS, S. D. L. The genus Bacillus as a biological control agent

and its implications in the agricultural biosecurity. Revista mexicana de fitopatología, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2017.

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

## Capítulo 13

### Qualidade de mudas de *Magonia pubescens* em diferentes composições de substratos

Joene de Nazaré Barros de Sousa <sup>1</sup>

Thais Ribeiro Costa <sup>2</sup>

Cristiano Bueno de Moraes<sup>3</sup>

#### RESUMO

O Cerrado é um dos biomas mais singulares do Brasil sendo reconhecido como importante hotspot, pela diversidade de espécies com grande potencial de utilização, tanto econômicas quanto ecológicas. Dentre elas destaca-se a *Magonia pubescens* A. St.-Hil, conhecida como Tingui. É uma árvore que possui altas taxas de sobrevivência em diferentes solos, muito utilizada para a implantação em arborização urbana, restauração de áreas degradadas e outros usos múltiplos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência técnica de diferentes substratos para a obtenção de mudas da espécie. O experimento foi instalado e conduzido no viveiro do Centro de Monitoramento e Manejo do Fogo – CEMAF- Universidade Federal do Tocantins – UFT - campus de Gurupi. Os compostos orgânicos utilizados para a formação do substrato alternativos, foram a cama de frango e o resíduo frigorífico, misturados ao Latossolo e Plintossolo em diferentes proporções. Os frutos foram coletados em diferentes árvores pré-matrizes, beneficiados, e as sementes imersas em água (24h) para superação da dormência. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, dispostos em 3 blocos e 7 tratamentos com 15 repetições totalizando 315 mudas. A partir das análises ao longo de 90 dias de avaliação, observou-se que para a 90% das variáveis, o tratamento mais adequado foi do T6 (Plintossolo 50% e resíduo frigorífico 50). Concluiu-se que as mudas de tingui apresentaram crescimento inicial adequado no substrato que consistiu na mistura de solo típico do Cerrado e resíduo frigorífico.

Palavras-chave: Substrato alternativo, espécie nativa, viveiro

---

<sup>1</sup> Graduanda de Engenharia Florestal, PIBIC/ UFT, Universidade Federal do Tocantins, joene.barros@mail.uft.edu.br

<sup>2</sup> Doutora em Ciência Florestal, Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Tocantins, ribeiro.thais@mail.uft.edu.br

<sup>3</sup> Doutor em Ciência Florestal, Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Tocantins, bmoraes@uft.edu.br

## INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos biomas mais singulares do Brasil cobrindo, aproximadamente, 23% do território brasileiro (1,8 milhões de km<sup>2</sup>), sendo o segundo maior bioma Neotropical e reconhecido como um importante hotspot (Cerqueira, et al., 2023), devido a sua singularidade biológica, especialmente da flora. Há uma diversidade de espécies arbóreas representativas deste bioma, entre as inúmeras espécies com potencial científico, econômico, cultural e ecológico destaca-se a *Magonia pubescens* – Sapindaceae, também conhecida como tingui (REFLORA).

*M. pubescens* é uma arbórea de ocorrência natural de áreas com solos secos e com variável status nutricional, considerada de ampla distribuição geográfica, desde o Norte (Rondônia, Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), típico do bioma Cerrado latu sensu e Floresta Estacional Semidecidual (REFLORA). Sua madeira é utilizada em carvoarias e na construção de casas, enquanto seus frutos são utilizados para a produção de sabão e artesanato e pode é empregada na composição de jardins, praças e ruas estreitas, além de ser indicada para plantio em áreas degradadas e de preservação permanente (Sousa, 2023).

Por se tratar de uma espécie nativa, o tingui sofre com a expansão da exploração das formações florestais e savânicas nativas do cerrado, seja pelas queimadas, degradação, supressão ecológica para a pecuária extensiva ou produção agrícola (Caldeira, et al., 2013). Assim a produção de mudas em viveiro é uma alternativa viável para a recuperação de áreas degradadas e conservação ex situ da espécie, sendo o principal objetivo a produção de plantas saudáveis que apresentem características importantes como resistência as adversidades do meio ambiente, crescimento rápido, elevada taxa de sobrevivência entre outros aspectos (Viana, 2022).

A escolha do substrato é um fator de extrema importância para as mudas na sua fase inicial, por ser o primeiro contato da semente com o solo, este deve apresentar boa drenagem, elevada capacidade de retenção de água, pH neutro, uniformidade, e permitir as trocas gasosas, além de oferecer um baixo custo (Santos, 2021). A utilização de substratos alternativos com a misturas de dois ou três insumos orgânicos tem se tornado uma alternativa economicamente viável e ecologicamente sustentável, uma vez que, esses materiais seriam descartados no meio ambiente, podem ser fontes nutritivas para o crescimento inicial de mudas florestais (Da Silva, et al., 2022).

Deste modo o presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficiência técnica de substratos compostos de terra de subsolo de diferentes texturas, de solos representativos do bioma Cerrado, misturada a proporções variáveis de resíduos orgânicos disponíveis na região sul do estado Tocantins, para a obtenção de mudas de boa qualidade.

Para isto, foram levantadas as seguintes questões: a) os substratos influenciarão a capacidade germinativa da espécie? b) haverá diferença nas características morfológicas e fisiológicas das mudas? A principal hipótese levantada é que os substratos alternativos influenciarão positivamente as taxas de germinação e desenvolvimento inicial das mudas.

### MÉTODO E MATERIAIS

O experimento foi instalado e conduzido no viveiro do Centro de Monitoramento e Manejo do Fogo – CEMAF- situado na Universidade Federal do Tocantins – UFT - do campus de Gurupi, localizado nas coordenadas com latitude a 11°44'47.9"S e longitude a 49°02'56.5"W, com precipitação média anual de 1500 mm e clima tropical.

Os tipos de compostos orgânicos utilizados para a formação do substrato alternativos, foram a cama de frango e o resíduo frigorífico (Figura1) misturados ao latossolo e o plintossolo. A cama de frango foi

doadas pela granja Martinha e o resíduo frigorífico pelo matadouro municipal, ambos da cidade de Gurupi. Os solos foram coletados em dois lugares diferentes dentro da UFT (Figura 2).

Os insumos foram triturados e peneirados para serem utilizados como substratos alternativos (Figura 2), o recipiente utilizado neste estudo, foi o saco de polipropileno medindo 13x20 cm. As sementes foram coletadas entre os meses de setembro e outubro de 2023, em matrizes localizadas na Universidade Federal do Tocantins - UFT, no Instituto Federal do Tocantins - IFTO - e na Universidade de Gurupi - UNIRG- ambas situadas no município de Gurupi.

O processo de semeadura teve início em meados do mês de outubro de 2023, obedecendo o delineamento em blocos casualizados (DBC) com 7 tratamentos, 15 repetições e 3 blocos totalizando 315 sacos de mudas. Foram feitas as proporções de 45 litros de substrato, misturados manualmente e levemente umedecidos e colocados em sacos disposto obedecendo a ordem do delineamento. As sementes ficaram 24h imersas em água para a superação de dormência e foram colocadas 2 em cada saco. (Figura 2). A irrigação foi realizada de forma automatizada, 4 vezes ao dia, 7h, 11h, 14h e 17h.

Para a análise da taxa de germinação, foram realizadas contagens diárias da quantidade de sementes que apresentaram emergência de plântulas. Esse processo foi conduzido até o décimo dia, quando as sementes germinaram completamente. As variáveis morfológicas foram avaliadas com 30, 45, 60, 75 e 90 dias, utilizando um paquímetro e régua, medindo diâmetro do coleto, altura e número de folhas. Em fevereiro de 2024, realizou-se a determinação dos teores de clorofila A e B com o auxílio de um clorofilometro.

As análises destrutivas de biomassa foram realizadas em março de 2024, a partir da separação de cinco mudas de cada tratamento. Usando o método de pesagem do sistema radicular e da parte aérea, resultou as variáveis de massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR), e após serem levadas para a estufa, obteve-se a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) (Figura 3).

Figura 1: Resíduos orgânicos



Fonte: autoria própria (2024)

a) resíduo de frigorífico; b) cama de frango

Figura 2: Coleta de solo, trituração dos resíduos orgânicos e instalação do experimento



Fonte: autoria própria (2024)

Figura 3: Variáveis morfológicas

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)



Fonte: autoria própria (2024)

a) Bloco 1: massa fresca da parte aérea (MFP) e massa fresca da raiz (MFR); b) Bloco 2: massa fresca da parte aérea (MFP) e massa fresca da raiz (MFR); c) Bloco 3: massa fresca da parte aérea (MFP) e massa fresca da raiz (MFR); d) Bloco 1: massa seca da parte aérea (MSP) e massa seca da raiz (MSR); e) Bloco 2: massa seca da parte aérea (MSP) e massa seca da raiz (MSR); f) Bloco 3: massa seca da parte aérea (MSP) e massa seca da raiz (MSR).

A tabela 1 descreve as combinações e proporções de materiais adotados para compor os substratos.

Tabela 1. Proporção do solo Latossolo, Plintossolo e materiais orgânicos utilizados para a composição dos substratos.

Identificação dos tratamentos                      Proporção de solos e materiais orgânicos

Identificação dos tratamentos	Proporção de solos e materiais orgânicos			
	Substrato florestal comercial			
T1	LV	PS	CF	RF
T2	100	0	0	0
T3	70	0	15	15
T4	40	0	30	30
T5	0	40	30	30
T6	50	0	0	50
T7	0	50	0	50

\*LV: Latossolo Vermelho; PS: Plintosso; CF: Cama de Frango; RF: Resíduo Frigorífico.

## DADOS E DISCUSSÃO



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Ao analisar a emergência de plântulas das sementes de *M. pubescens* (tabela 2), não foi identificado diferenças significativas nos diferentes substratos. Isso pode ser justificado pela superação da dormência tegumentar realizada pela imersão das sementes em água com temperatura ambiente durante 24h, segundo Sousa Filho, et al. (2011), isso contribui para acelerar o processo metabólico, levando ao aumento de emissão da radícula e consequentemente a alta germinabilidade desta espécie.

Tabela 2: Germinabilidade das sementes de Tingui

Tratamentos	G (%)	IVG (%)	TMG (%)
T1	100 a	6,678 a	8,583 a
T2	97,77 a	6,465 a	8,595 a
T3	100 a	6,458 a	8,615 a
T4	100 a	6,857 a	8,555 a
T5	100 a	6,959 a	8,532 a
T6	100 a	6,774 a	8,562 a
T7	100 a	6,547 a	8,601 a
Média	100	6.678	8.583
CV%	0.000	2.940	0.340

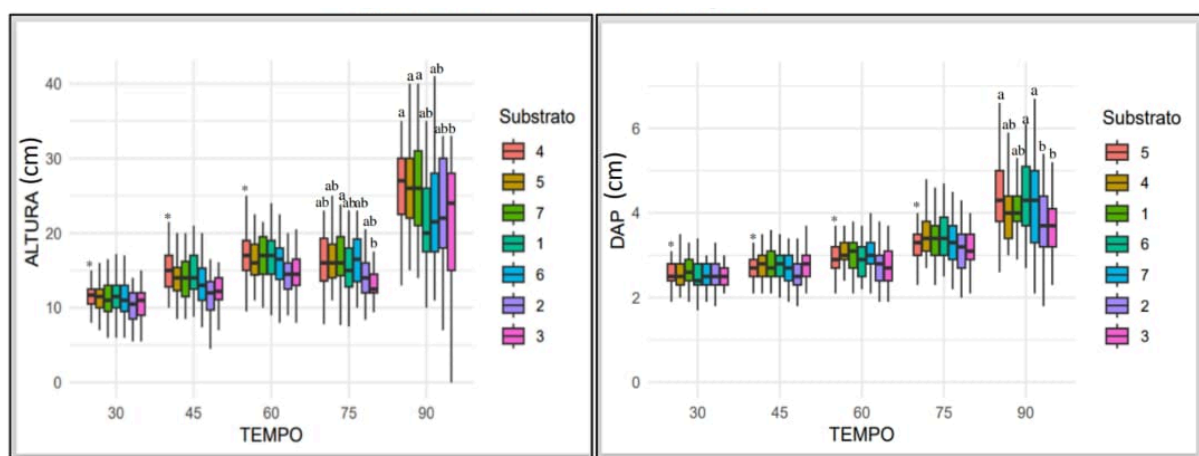
Fonte: autoria própria (2024)

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si significativamente. Porcentagem de germinação (G%); Velocidade de germinação (VG) e Tempo médio de germinação (TMG) A germinação (G) das sementes de *M. pubescens*, começou no sétimo dia após a semeadura. Em alguns tratamentos, as primeiras plântulas emergiram totalmente neste mesmo dia. Até o décimo dia, todas as sementes em todos os tratamentos já haviam germinado, resultado semelhantes foram encontrados por Silva (2019) em sua pesquisa sobre a morfologia da *Magonia pubescens*, obtendo a germinação a partir do quarto dia de semeadura. Portanto, a germinação das sementes de tingui provou ser eficaz em todos os substratos, conforme evidenciado pela média de 100% de germinação observada na tabela.

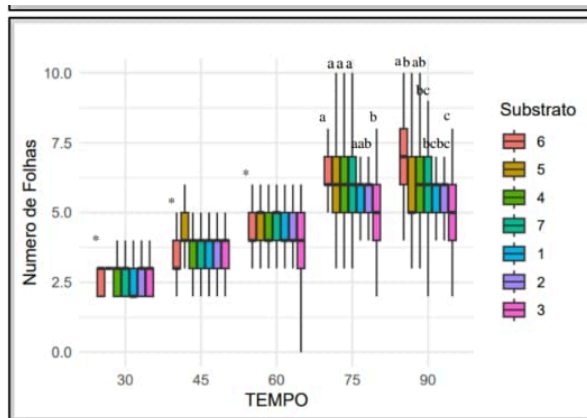
Além disso, obtive-se bons valores na velocidade de germinação (IVG) com média de 6,678 e no tempo médio (TMG) de 8,583. Isso se explica que, devido ao tamanho da semente da espécie. Geralmente sementes grandes possuem reservas suficientes para o seu crescimento inicial, oferecendo a plântula os nutrientes necessários para a sua germinação (Queiroz; Dias, 2023). Deste modo, o substrato pouco influenciou nos primeiros dias de emergência da espécie *M. pubescens*, assim como observado por Santos Junior, et al., (2023) testando a influência da luminosidade e do corte do tegumento desta espécie, onde constatou que os maiores valores de velocidade germinativa são com a presença de luz, condição importante para a germinação da semente.

Para isso, foi avaliado o desenvolvimento inicial das mudas nos diferentes tipos de substratos. A avaliação por meio da análise de variância revelou que os substratos empregados e suas respectivas combinações exercem um impacto significativo nos parâmetros morfológicos estudados (figura 4). Os dados obtidos demonstram diferenças significativas em relação à altura (ALT), diâmetro do coleto (DC) e número de folhas (NF).

Figura 4: Variáveis morfológicas



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)



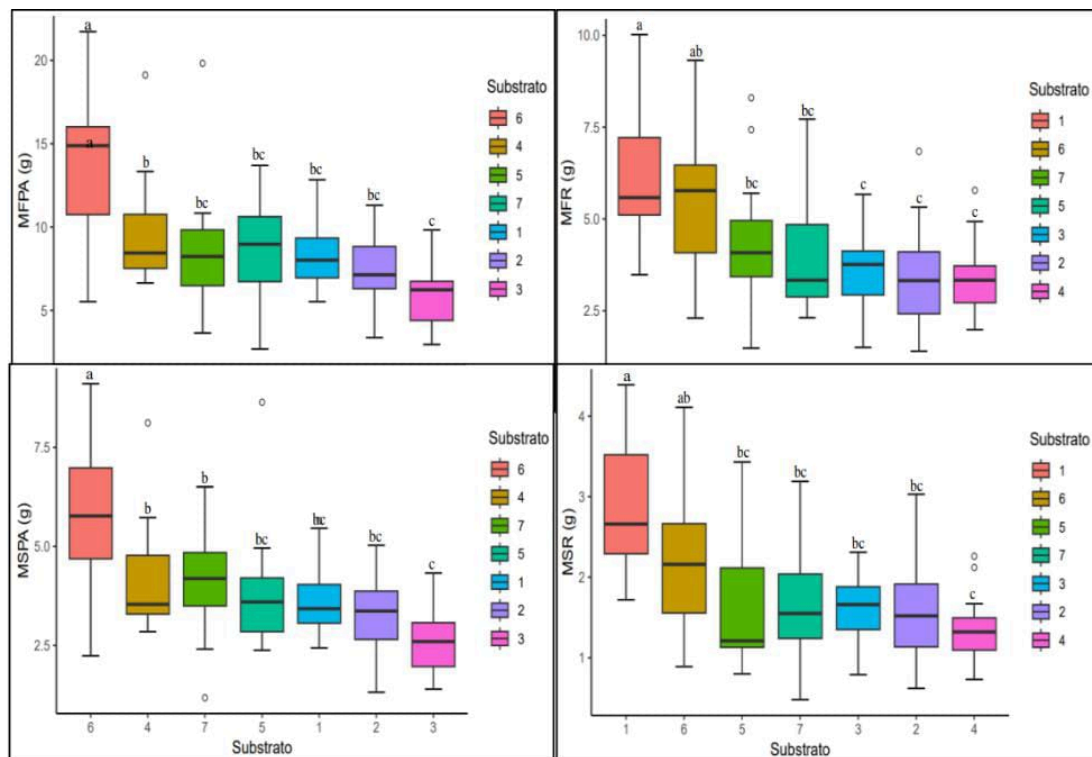
Fonte: autoria própria (2024)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Para as variáveis morfológicas de ALT e NF, observou-se que entre os 30 e 60 dias, não houve diferença significativa para a análise de variância, os tratamentos são estatisticamente iguais, somente a partir dos 75 dias é perceptível a diferença entre os tratamentos. No entanto, para o DC somente nos 90 dias as mudas apresentaram diferenças nos diversos tratamentos.

Os resultados apresentados, demonstram a eficiência do T5 (40% Plintossolo + 30% Cama de Frango + 30% Resíduo Frigorífico) com médias significativamente maiores para ALT (26,1 cm) e DC (4,44 cm). Já para NF, observamos que o T6 (50% Latossolo Vermelho + 50% Resíduo Frigorífico), resultado semelhante obteve Silva (2019) com mudas de cajueiro e a utilização de substrato de resíduo frigorífico. Contudo, a combinação de resíduos do T3 (70% Latossolo Vermelho + 15% Cama de Frango + 15% Resíduo Frigorífico), apresentou menores valores, em todas os parâmetros morfológicos, em relação aos demais tratamentos analisados.

Figura 5: Biomassas



Fonte: autoria própria (2024)

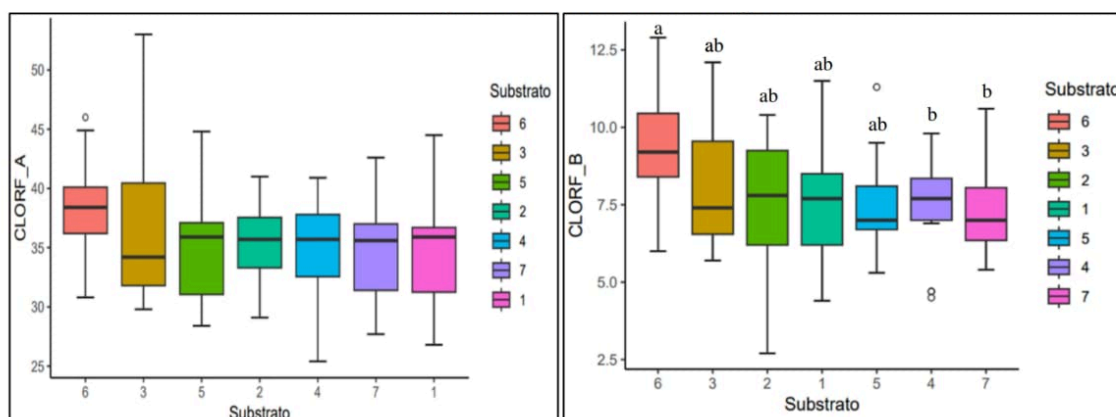
Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Conforme a análise de variância ( $p \leq 0,05$ ), todos os tratamentos influenciaram a massa fresca da parte aérea (MFPA), a massa fresca da raiz (MFR), a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca de raiz (MSR) e das mudas de *M. pubescens* (figura 5).

É perceptível a eficácia do T6 para as variáveis de MFPA e MSPA, obtendo as maiores médias, (13.616 e 5.787). Isso indica que a combinação de 50% Latossolo Vermelho e 50% Resíduo Frigorífico, foi a mais eficaz para estas variáveis, e assim como nas análises morfológicas a mistura do T3 foi o menos eficaz, indicando que não foi ideal para o crescimento das mudas.

Enquanto para a MFR e MSR, observou-se uma alteração, onde o T1 (100% substrato comercial florestal) se destacou com valores maiores (6.135 e 2.911. Isso sugere que o substrato florestal comercial possui características que favorecem a absorção de nutrientes e água, promovendo um crescimento radicular mais robusto e saudável de mudas de *M. pubescens* em comparação com os outros tratamentos. A clorofila é um componente celular essencial, desempenhando um papel crucial não apenas na fotossíntese, mas também influenciando diretamente a respiração das plantas (Sousa, et al., 2015). Por isso foi realizado a medição de clorofila A e B nas mudas de *M. pubescens* (figura 6).

Figura 6: Variáveis Fisiológicas



Fonte: autoria própria (2024)

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

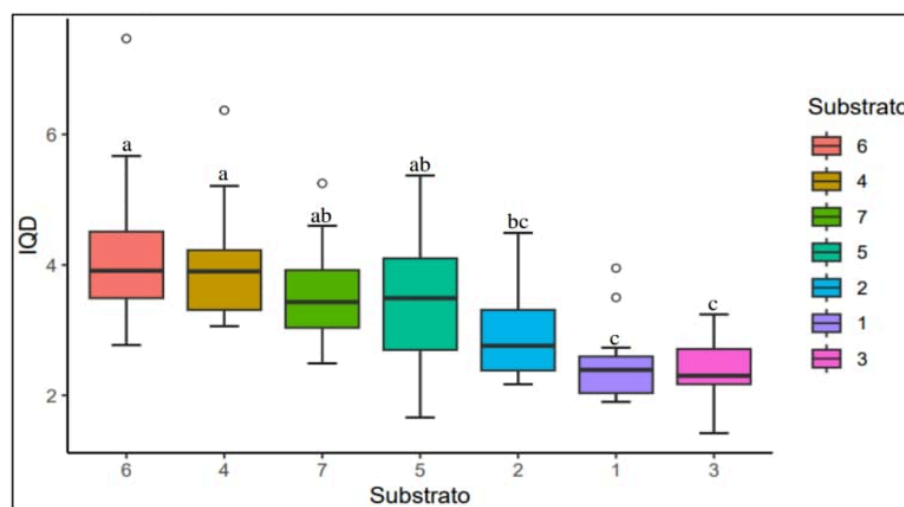
Os valores encontrados para os parâmetros de clorofila A e B apresentam algumas diferenças. Para a clorofila A análise de variância as medidas não podem ser consideradas diferentes, indicando que, independentemente da composição do substrato, os níveis de clorofila A nas mudas não variaram significativamente. Para a variável clorofila B, a análise indicou um comportamento de maior valor nos teores de clorofila foliar (9.37) para o T6, assim como nos parâmetros anteriores.

Estes resultados se assemelham aos de Souza (2019), quando avaliou os teores de clorofilas em plantas de *Dipteryx alata*, *Enterolobium gummiferum* e *Magonia pusbecens* sob diferentes níveis de sombreamento, onde obteve a percepção que a clorofila A é extremamente sensível à diminuição da intensidade luminosa, quando a quantidade de luz disponível é reduzida, a eficiência da clorofila A em capturar e converter energia solar em energia química diminui significativamente.

Em contraste, a clorofila B consegue captar a energia solar mesmo com sombreamento. Isso explica o motivo dos tratamentos da clorofila A corresponderem a médias iguais para todos os tratamentos, enquanto a clorofila B indicou resultados diferentes para os substratos avaliados, uma vez que, o experimento foi conduzido em casa de vegetação com sombreamento.

O Índice de Qualidade de Dickson é um parâmetro muito importante para a averiguação da qualidade das mudas, é uma medida utilizada para avaliar a relação entre a robustez (ALT e DC) e a biomassa (MFPA, MFR, MSPA e MSR) (figura 7)

Figura 7: Índice de Qualidade de Dickson



Fonte: autoria própria (2024)

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Assim como nas demais análises realizadas para a *M. pubescens*, o T6 indicou ser a mistura de substrato alternativo mais eficiente entre os demais tratamentos, propiciando mudas com qualidade superiores. É importante observar que o T3 e o T1, se mostraram inferiores dentre todas as misturas orgânicas. Não foi encontrado na literatura resultados do índice de qualidade de dickson para esta espécie, demonstrando a relevância deste estudo.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação do insumo alternativos de resíduo frigorífico e o plintossolo se mostrou uma alternativa eficaz para a produção de mudas de qualidade da *M. pubescens*, quimicamente este substrato apresenta características comuns a áreas naturais de ocorrência do tingui (pH ácido, níveis baixos de P, K, Ca e outros nutrientes). Deste modo a utilização de fontes alternativas para a produção de um substrato orgânico se torna sustentável e economicamente viável, sendo um ponto positivo para a redução de custos em viveiros florestais. Isto sugere que a espécie possui boa aptidão silvicultural, podendo ser implementada em projetos de restauração, reflorestamento, dentre outros.

### REFERÊNCIAS

CERQUEIRA, Eduardo Bahia et al. O Cerrado e suas comunidades tradicionais: Impactos e a percepção estudantil relacionada a esses aspectos. 2023. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/3940/1/Disserta%3%a7%c3%a3o%20atualizad>

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

o%20Eduardo%20%20PPG-CRENAC%20outubro.pdf. Acesso em 09 mar 2024

FERRUCCI, M.S.; Somner, G.V. Magonia in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB20906>. Acesso em: 23 ago. 2024

QUERIOZ, T. A. F.; DIAS, D. P. Efeito do tamanho das sementes sobre a emergência e morfofisiologia de mudas de mama cadela. *Nativa*, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 260-265, 2023. DOI: 10.31413/nativa.v9i3.10161. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/10161>. Acesso em: 20 ago. 2024.

SANTOS, Natan Brito. Utilização de substrato comercial na produção de mudas florestais nativas. 2021. 31 f. – Faculdade Pitágoras, Teixeira de Freitas, 2021. Disponível em: [https://repositorio.pgsscogna.com.br/bitstream/123456789/46987/1/NATAN\\_BRITO\\_SANTOS.pdf](https://repositorio.pgsscogna.com.br/bitstream/123456789/46987/1/NATAN_BRITO_SANTOS.pdf) Acesso em: 19 ago. 2024.

SILVA, Evaldo Moraes da. et al. Produção de mudas de Cajueiro Anão-precoce em substratos de resíduos orgânico. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, v. 9, n. 1, p. 90-96, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Mariana-Parreira/publication/333998477>. Acesso em: 22 ago. 2024.

SILVA, Sávio Rocha Barreto da et al. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Magonia pubescens* a. St. Hil. (Sapindaceae) - CRUZ DAS ALMAS, BA, 2019. Disponível em: <http://ri.ufrb.edu.br/jspui/handle/123456789/3066>. Acesso em: 22 ago. 2024.

SOUSA, Marcelo Borges de. Estudo fitoquímico e avaliação de propriedades biológicas de extrato da semente de *Magonia pubescens*



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

A. St.-Hil. UFMA: São Luiz, 2023. Disponível em: [https://rosario.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/7104/1/Marcelo\\_Borges\\_TCC.pdf](https://rosario.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/7104/1/Marcelo_Borges_TCC.pdf). Acesso em 09 mar 2024

SOUZA, Maíra Jéssica de. Biometria de sementes e desenvolvimento pós seminal de *Dipteryx alata*, *Enterolobium gummiferum* *Magonia pubescens*, e influência dos extratos de *Parkia platycephala* e do sombreamento na germinação e/ou desenvolvimento inicial dessas espécies – Porto Nacional, TO, 2019. Disponível em: <https://repositorio.uft.edu.br/bitstream/11612/1401/1/Ma%3Dadra%20J%3Da9ssica%20Gomes%20de%20Souza%20-%20Disserta%3Da7%3Da3o.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2024.

SOUZA FILHO, Jose Cesar et al. Emergência de plântulas de *Magonia pubescens* St. Hil. "Sapindaceae" em função da temperatura. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 54, n. 2, p. 137-143, 2011. Disponível em: <https://ajaes.ufra.edu.br/index.php/ajaes/article/view/316/191>. Acesso em: 10 ago. 2024.

### FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Tocantins"

## Capítulo 14

### Produção de enzimas fibrolíticas, açúcares fermentescíveis utilizando cogumelos comestíveis produzidos com resíduos agroindustriais

Pedro Petterson Ferreira Santana <sup>1</sup>

Gessiel Newton Scheidt <sup>2</sup>

Augustus Caesar Franke Portella<sup>3</sup>

#### RESUMO

Estudou-se a produção das enzimas lacase e celulase, produzidas pelo *Pleurotus* sp em diferentes fontes de carbono (bagaço de cana de açúcar e feno de capim coast cross) em função do tempo de cultivo (0 a 10 dias). O isolado de *Pleurotus* sp foi propagado em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). A atividade de lacase foi determinada através da oxidação de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) - ABTS em solução tampão McIlvaine. A atividade da celulase foi determinada através da produção de açúcar redutor oxidado pela utilização de ácido dinitrosalicílico (DNS). O valor médio para atividade específica da lacase foi 19,33 U mL<sup>-1</sup> de proteína durante os 10 dias de incubação. Para celulase o valor médio de atividade enzimática foi 61,6 U mL<sup>-1</sup> de proteína nos 10 dias de cultivo. Ambas as atividades enzimáticas se estabilizaram após atingir o melhor valor de produção.

**Palavras-chave:** Resíduos enzimáticos e lignocelulolíticos, lipases; enzimas do complexo fibrolítico; sacarificação *Pleurotus* spp.

---

<sup>1</sup> Aluno Graduação em Engenharia Biotecnológica e Bioprocesso da Universidade Federal Tocantins [pedro.petterson@uft.edu.br](mailto:pedro.petterson@uft.edu.br);

<sup>2</sup> Professor, Doutor Universidade Federal do Tocantins; [scheidt@uft.edu.br](mailto:scheidt@uft.edu.br)

<sup>3</sup> Professor, Doutor Universidade Federal do Tocantins; [portello@uft.edu.br](mailto:portello@uft.edu.br);

## INTRODUÇÃO

O uso de resíduos agroindustriais é comumente utilizado na alimentação dos ruminantes ou servindo de adubação do solo para as culturas. Entretanto, barreiras físicas aos processos fibrolíticos podem limitar a extensão da digestão no rúmen (Martins et al., 2006) e até mesmo causar um desequilíbrio no ambiente. A utilização de enzimas fibrolíticas promove um aumento da digestibilidade da matéria seca e da fibra mostrando bons resultados na alimentação de ruminantes (HUNT et al., 1995).

## MÉTODO E MATERIAIS

O desenvolvimento da pesquisa até o momento, se deu por conta da replicação das cepas dos fungos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* provenientes da coleção de cepas do Laboratório de Compostos Bioativos, LACOMB, da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, as cepas a serem reativadas foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio de cultivo BDA (batata, dextrose e ágar) previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Posteriormente as placas foram incubadas em ambiente axênico a 28°C com fotoperíodo de doze horas, para o crescimento dos fungos e a cada sete dias foram realizadas repicagens destes fungos para novas placas contendo meio BDA para utilização nos experimentos.

As enzimas lacase por suas características possuem diversas aplicações biotecnológicas sendo muito promissoras na degradação de corantes de indústrias têxtil em conjunto com polissacarídeos, onde alcançaram 53% de degradação (VALADARES et al., 2013). Kumar et al. (2016) realizou a degradação de alguns importantes fármacos, como anti-inflamatórios e hormônios estrogênicos, utilizando a enzima lacase do fungo *Myceliophthora thermophila*, onde possibilitou remoções entre 80 e 100%. Assim como, outros autores (CHEN, J. et al,

2018) que também alcançaram eficientes degradações de fármacos utilizando esta enzima

As lacases corroboram para a degradação de lignina e são comumente encontradas em fungos, principalmente em *Pleurotus* sp. As celulasas são enzimas responsáveis pela degradação de celulose, principal composto presente nas células vegetais. A procura dessas enzimas com o objetivo de quebrar as fibras dos alimentos é cada vez maior, e elas podem ser utilizadas de várias formas. Diante do exposto, objetiva-se avaliar e quantificar a atividade das enzimas lacase e celulase produzidas pelo *Pleurotus* sp cultivados em diferentes fontes de carbono em função do tempo de cultivo.

## Materiais e Métodos

### Origem e manutenção do fungo

O fungo utilizado no presente trabalho foi do filo Basidiomycota causador de podridão branca do gênero *P. ostreatus*, mantido na coleção de cultura existente no Laboratório de Compostos Bioativo da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi. O fungo foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), no escuro, à 28 °C, armazenados a 4 °C e repicados mensalmente para a manutenção das culturas.

O meio de cultura utilizado é composto de 5,0 g de dextrose, 3,750 g de ágar, 50 mL do caldo batata e água destilada completando 250 mL. O caldo da batata foi obtido a partir do cozimento de 1 kg de batata em 1 litro de água mineral.

Procedeu-se a autoclavagem do meio a 1 atm 120 °C por 20 min e em seguida distribuído cerca de 20 mL nas placas de Petri (10 cm de diâmetro). Depois da solidificação do meio, foi adicionado 5 mm de diâmetro do fungo. A placa com o fungo foi incubada e em estufa BOD

a 28 °C em torno de 8º dias até a completa colonização do meio (Figura 1).

Figura 1 – *Pleurotus ostreatus* após o 4 dia de crescimento



Fonte: O autor.

Os cultivos foram em triplicata e realizados em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo e 0,5 g das fontes de carbonos, em seguida, foram inoculados com um disco de 10 mm de fungo PL crescidos em BDA. Os meios de cultivo inoculados foram incubados sem iluminação, em agitação orbital a 120 rpm min<sup>-1</sup>, em estufa agitadora com temperatura controlada em 28°C nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias.

#### Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi efetuada junto ao Laboratório de Química analítica da Universidade Federal do Paraná. Uma Unidade Internacional (UI) é definida como sendo: µmol de produto produzido por minuto de reação e pode ser determinada com a utilização de um espectrofotômetro. A atividade da lacase foi avaliada a cada 24 horas. Utilizou-se a siringaldazina como substrato.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

A metodologia utilizada para determinação da enzima lacase foi a descrita por Brijwani et al. (2010 - modificado). Foram utilizados 10 µL de extrato bruto, 890 µL de tampão acetato de sódio 50 molL<sup>-1</sup> (pH 5,0) e 100 µL de siringaldazina.

Após a adição da siringaldazina deu-se início a reação e foi acompanhada a cada minuto por 5 minutos a 525 nm em espectrofotômetro à temperatura ambiente como mostra a Tabela 1. O branco constitui-se de 10 µL do extrato bruto e 990 µL do tampão acetato de sódio 50 molL<sup>-1</sup> pH 5,0, sem adição de siringaldazina. A atividade enzimática foi determinada em triplicata.

Tabela 1 - Solução para análise de atividade da lacase

Solução	Volume (µL)
Tampão de fosfato 50 mmL <sup>-1</sup>	850
Solução siringaldazina	100
Caldo enzimático	50

Para determinação do cálculo de atividade enzimática foi utilizada a equação representada logo abaixo descrita por Leonowicz e Grzywnowicz (1981) com modificações:

$$u = 10^6 x + \frac{|Abs|}{ExRxt}$$

Onde:

Abs = Absorbância no comprimento de onda específico (nm);

E = Coeficiente de extinção molar para cada  
substrato ( $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); R = Quantidade de  
extrato bruto (mL);

T = Tempo de reação (min).

Sendo o Coeficiente de extinção molar em 525 nm =  $65000 \text{ molL}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade U é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar  $1 \mu\text{molL}^{-1}$  de substrato por minuto. O resultado é expresso em  $\text{UmL}^{-1}$ .

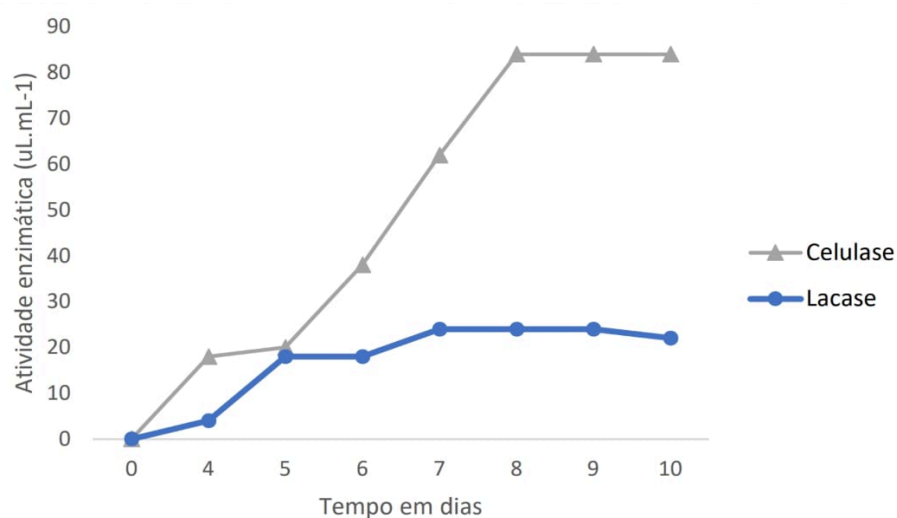
A atividade Celulase foi determinada através da quantidade de oxidação do açúcar redutor produzido a partir do ácido dinitrosalicílico (DNS). Para cada 0,250 mL de amostra foi utilizado 0,250 mL de carboximetilcelulose (0,5% em solução tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,8) em 50°C por 30 minutos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além da lacase, os fungos de podridão branca podem produzir outras enzimas extracelulares, como o grupo das peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase versátil). As peroxidases necessitam do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para catalisar a oxidação, sendo necessário como substrato na reação enzimática (DATTA et al., 2017).

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---



Os resultados obtidos para a produção de lacases, demonstram que a produção de enzima é eficiente mesmo em caldo pobre de nutrientes, sendo que o microrganismo ainda possui reservas da biomassa residual adicionada ao meio de cultura.

A produção de lacase pelo microrganismo *P. ostreatus*, demonstrou capacidade adsortiva, significando que existe possibilidade de desenvolver um novo insumo para ser utilizado na purificação de efluentes residuais, já que se apresentou como sendo um material adsortivo de baixo custo e de fácil aplicabilidade, não necessitando de mão de obra especializada.

O comportamento da lacase e da celulase foram similares sendo que o crescimento linear ocorreu até atingir o ponto máximo de atividade enzimática mantendo-se estável posteriormente. Este fato pode estar associado com a escassez nutricional e a produção de biomassa fúngica.

As variações na atividade lignolítica e de biossíntese de lacase pelos fungos, durante o cultivo em estado sólido, dependem do tipo de substrato utilizado. A restrição nutricional do bagaço pode explicar o comportamento da atividade enzimática da celulase e da lacase serem menores nesta fonte.



Uma alternativa poderia ser consorciar outros nutrientes, de forma a favorecer o desenvolvimento micelial fúngico. Soden & Dobson (2001), sugerem que o nitrogênio também pode regular a expressão de genes de lacase por meio de proteínas do tipo NIT2.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado a dificuldade para obter métodos mais eficazes para identificação destas enzimas presentes na biomassa do fungo, e na contaminação das cepas nas placas de Petri, não obtive resultados suficientes e efetivos para complementação do fim deste estudo científico.

## REFERENCIAS

- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, v. 2010, p. 1-10, 2010.
- CHEN, Z.; WAN, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 610-621, 2017.
- DATTA, R. et al. Enzymatic degradation of lignin in soil: a review. *Sustainability*, v. 9, n. 7, p. 1163, 2017.
- HUNT, C. W. et al. Effect of fibrolytic enzyme additives on in vitro degradability of alfalfa and tall rescue. In: *Proceedings-american Society of Animal Science Western Section*, p. 349-352, 1995.
- KUMAR, A.; GAUTAM, A.; DUTT, D. Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 07, n. 03, p. 149-168, 2016.

LEONOWICZ, A, GRZYWNOWICZ K Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme. Microbial Technol* 3, 55-58, 1981.

MARTINS, A. S. et al. Passage rate and ruminal parameters in cattle supplemented with fibrolytic enzymes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 3, p. 1186-1193, 2006.

SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, v. 147, n. 7, p. 1755-1763, 2001.

VALADARES, F. de L. et al. Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré tratado por processo quimiotermomecânico. *Dissertação/USP*.2013.

## FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil"

## Capítulo 15

### Substratos na produção de cogumelos

#### *Pleurotus ostreatus.*

Ana Luiza Santiago Pereira <sup>1</sup>

Augustus Caesar Franke Portella <sup>2</sup>

#### RESUMO

O presente estudo investigou a eficiência biológica e a composição nutricional de cogumelos *Pleurotus ostreatus* cultivados em substratos diversos, compreendendo bagaço de cana de açúcar (BCA) sabugo de milho triturado (SMT) e serapilheira (SPR), todos enriquecidos com gesso agrícola (GA). Os resultados demonstraram que o substrato contendo uma mistura de bagaço de cana e outros resíduos agrícolas (T02) apresentou maior eficiência biológica (34,5%) e produtividade (10,2%). Os cogumelos cultivados mostraram-se fontes significativas de micronutrientes, especialmente ferro e zinco, e apresentaram teores baixos de lipídios e carboidratos, com alto teor de fibra bruta. O teor de proteína encontrado (1,18%) foi inferior ao reportado na literatura, o que pode estar relacionado à composição do substrato utilizado. Este trabalho destaca o potencial dos cogumelos analisados para a formulação de suplementos alimentares ricos em ferro, zinco e fibras, além de reforçar a importância do cultivo de cogumelos para a promoção de práticas agrícolas sustentáveis e para a melhoria da nutrição humana.

**Palavras-chave:** Aproveitamento de resíduos agroindustriais, Cogumelo comestível, Eficiência biológica.

---

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, bolsista Pibic, Universidade Federal do Tocantins, [luiza.santiago@mail.uft.edu.br](mailto:luiza.santiago@mail.uft.edu.br)

<sup>2</sup> Doutor em biotecnologia, professor no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, [portella@mail.uft.edu.br](mailto:portella@mail.uft.edu.br)

## INTRODUÇÃO

Os cogumelos são consumidos por vários povos em diferentes culturas desde os primórdios da humanidade (ALEXOPOULOS; MIMS, 1979). A China, Alemanha, França e Itália são atualmente os maiores consumidores, cujo consumo anual tem valores de 8, 4, 2 e 1,3 kg/ano, respectivamente (URBEN, 2017). Primeiramente os seres humanos coletavam na natureza o cogumelo em troncos de árvores, bosques, cavernas e ambientes naturalmente propícios para o seu desenvolvimento, com o passar dos anos e através da observação dos processos naturais começaram a cultivar de forma parcialmente artificial (URBEN, 2017). Os primeiros cultivos de cogumelo foram feitos na China no século VI, com as espécies *Auricularia auricula*, *Flamulina velutipes*, e *Lentinula edodes*, ou Shiitake, eles utilizavam troncos de árvores caídas e deixavam próximos a troncos de árvores com cogumelos frutificados, esta técnica para o cultivo de Shiitake foi mantida até o ano de 1930 (URBEN, 2004).

Nos Estados Unidos, no ano de 1894 foi desenvolvida a primeira estufa feita especificamente para o cultivo de cogumelos (BEYER, 2017); no ano de 1970 o desenvolvimento de substrato a base de compostos advindos da exploração agrícola, como farelo de trigo, farelo de arroz e serragem e utilizando sacos plásticos como embalagem foi fundamental para aumentar a produção, diminuir o tempo do cultivo, aumentar a sanidade do substrato, modernizar o cultivo, e diminuir o impacto ambiental causado pela retirada de árvores das florestas. O cultivo de cogumelos em substrato feito a partir de mix com gramíneas e outros materiais ricos em nutrientes veio através da técnica Jun-Cao, desenvolvida na China em 1980 e trouxe benefícios para os agricultores da época, pois além dos benefícios citados acima, as gramíneas eram diversas e diminuiu os custos de produção da época.

A técnica foi trazida e adaptada para o Brasil pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnológicos em 1995, e é utilizada até hoje para o cultivo de várias espécies de cogumelos como *Agaricus*

*bisporus*, *Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Auricularia auricula*, *Flammulina velutipes*, e várias espécies do gênero *Pleurotus spp.* (URBEN, 2017).

Os fungos, em particular os do filo *Basidiomycota*, em nível macroscópicos, são diferenciados pelos seu tamanho, forma, cor, textura, habitats, substratos, e tipos de agrupamento; a nível microscópico são observadas as estruturas reprodutivas e estruturais como os basídios e tramas das lamelas, hifas e conídios. Essas informações são usadas para a identificação imediata e classificação das espécies de cogumelos, posteriormente é feita a análise genética.

Os cogumelos pertencentes à ordem *Agaricales* são os de maior importância no filo, pois nesta ordem encontramos gêneros alimentícios, medicinais, alucinógenos, venenosos, habitando substratos a base de folhas, humos, madeira, ou até fezes de animais. Os cogumelos do gênero *Pleurotus spp* são macrofungos que possuem estipe com crescimento lateral e cilíndrico e formam grandes grupos de cogumelos que se sobrepõem; o chapéu ou píleo tem cores variadas como cinza, rosa, verde ou marrom, a textura é lisa e brilhosa, o formato é de concha ou espátula; na parte inferior do píleo encontramos lamelas altas, juntas e desuniformes (HONRUBIA, et.al, 2010).

A reprodução sexuada ocorre quando os basidiósporos liberados do basídio encontram outro geneticamente compatível, formando hifas septadas e posteriormente o micélio primário, em condições ideais para o desenvolvimento ocorre a fusão dos zigotos, formação do micélio secundário e o crescimento de um novo cogumelo (URBEN, 2017).

A reprodução assexuada, ou vegetativa, é usada para a multiplicação de micélio com o mesmo material genético, ideal para a produção comercial, entretanto quando repetido várias vezes perde-se o vigor micelial, e a produção pode cair (URBEN, 2017). Este micélio

proveniente da colonização do cogumelo maduro em meio de cultura é colocado em grãos ou cereais como trigo, milho e arroz, expande-se pelo grão e ganha o nome de 'semente' ou 'spawn' e são usados posteriormente para a inoculação do substrato rico em lignina, celulose e hemicelulose, normalmente serragem, bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, capim andropogon, brachiaria entre outros (ALCALDE; SALGADO, 2002). Dado visto que os basidiomicetos são conhecidos como 'fungo de podridão branca', decompositores primários de moléculas orgânicas recalcitrantes, como a lignina, vê-se a necessidade de buscar substratos ricos em carbono, entretanto, segundo Pedra e Marino (2006) a relação entre a velocidade do crescimento micelial e produção de cogumelos é inversamente proporcional, e denuncia um desbalanço na relação C/N do substrato, sendo necessário a suplementação dos substratos com fonte de N.

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são amplamente consumidos no mundo, ficando atrás dos cogumelos paris (*Agaricus blazei*), e Shiitake (*Lentinula edodes*). Sua facilidade no cultivo, baixa demanda tecnológica, seu sabor e textura juntamente com suas propriedades medicinais e nutricionais fazem deste um alimento muito rico e promissor. Os cogumelos desse gênero são ricos em vitaminas do complexo B, em proteínas e fibras, possuem alto teor de carboidratos e lipídeos, como ômega; seus constituintes celulares são fontes importantes de moléculas bioativas, como as

$\beta$ -glucanas, proteínas, lectinas, compostos fenólicos e triterpenos, que contribuem com as atividades antioxidante, anticoagulante, antibacteriana, antifúngica e antiviral, antiinflamatória, antitumoral, diurética, e normalizadora da pressão sanguínea.

A composição nutricional e o teor de micro e macronutrientes nos cogumelos podem variar em função da espécie do cogumelo, fatores genéticos, substratos e condição química do mesmo, fatores

ambientais, condições do cultivo, armazenamento e processamento pós-colheita (EMBRAPA, 2009). Os fungos têm uma notável capacidade de assimilar moléculas e convertê-las em massa micelial, o que ressalta a importância da escolha de um substrato nutricionalmente rico e livre de contaminantes tóxicos, pois isso culminará na produção de cogumelos saudáveis e nutritivos (SCHEID, et al., 2020).

*P. ostreatus* é considerável (EFFIONG; UMEOKWOCHI, 2023), e demonstra a capacidade desses fungos de assimilar uma ampla gama de nutrientes a partir dos substratos em que crescem, incorporando-os ao seu corpo frutífero e biomassa micelial (UMEO, et al., 2020).

Segundo a APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), o consumo de cogumelos no Brasil é de 160 g/pessoa/ano, este valor em 1996 era de 30 g/pessoa/ano, e subiu devido a influência da culinária oriental no sudeste do Brasil, principalmente em São Paulo, onde se concentra 80% da produção nacional de cogumelos. O mercado está crescendo com produção em pequena escala, destinada à venda em feiras e para consumidores primários da região, assim como para restaurantes locais (ZAMPIERI, 2023), (TABA, et. al., 2018). O mercado emprega mais de 3 mil pessoas, produz 12 mil toneladas e conta com 300 produtores de cogumelos reconhecidos pela ABPC (Associação Brasileira de Produtores de Cogumelos).

A composição nutricional do substrato exaurido (sms) é variável em função do material lignocelulósico e da espécie de cogumelo cultivado (WEI; GELADI ; XIONG, 2017) e é resultado da extração dos nutrientes pela degradação enzimática dos fungos, juntamente com lignina, celulose e hemicelulose, carboidratos e proteínas e alguns minerais não pertencentes a parede celular

(MARTÍN, et al., 2023).A utilização do substrato gasto de cogumelo, resultante do cultivo em resíduos agroindustriais, apresenta um imenso potencial na melhoria da qualidade nutricional desses resíduos. Além de produzir alimento de alto valor, a fermentação sólida dos fungos enriquece o substrato com uma variedade de nutrientes e compostos benéficos, tornando-o uma rica fonte de alimento para humanos e animais. Essa prática não só otimiza a gestão de resíduos, mas também promove a sustentabilidade e a economia circular, ao transformar o que seria descartado em um recurso valioso.

Dado sua importância ambiental, na utilização de material orgânico potencializado em alimento sem a necessidade de grandes áreas, ou energia; sua função nutricional, disponibilizando nutrientes e metabólitos importantes para a saúde humana; e na geração de empregos e renda a micro e pequenos produtores, buscamos neste trabalho avaliar a eficiência biológica (%), produtividade (g/dia) e o teor de micronutrientes, fibras, proteínas, lipídios e carboidratos no cogumelo e no substrato exaurido (SMS).

## MÉTODO E MATERIAIS

### Fungo

Os experimentos foram desenvolvidos em casa de cultivo no Laboratório de Compostos Bioativos da Universidade Federal do Tocantins, na cidade de Gurupi. O fungo *Pleurotus ostreatus* faz parte da micoteca do laboratório, e era mantido em meio BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petri devidamente esterilizadas.

### Spawn

Foi utilizado grãos de milho cozidos por 1h e deixados de molho por 24h, depois foram transferidos para potes de vidro com tampas modificadas previamente esterilizados, os grãos preencheram até 70%



do volume do pote, e foram autoclavados por 1h a 121°C. No outro dia, em temperatura ambiente, foram inoculados com discos de até 2cm de micélio e placas de petri e meio BDA. Os potes foram mantidos na ausência de luz, com temperatura e umidade ambiente até a completa micelização do fungo, que durou em média 12 dias.

### Substrato

Os substratos utilizados foram selecionados através da disponibilidade dos mesmos na cidade e no campus. Os resíduos utilizados foram bagaço de cana de açúcar (BCA), sabugo de milho triturado (SMT) e serapilheira (SPR), todos foram suplementados com gesso agrícola (GA)

### Tratamento térmico

O material foi pesado e sofreu tratamento térmico, onde na literatura sugere imersão do material em água e gesso agrícola por 10 min, entretanto deixamos por 3h, tal como a pasteurização (URBEN, 2017). Depois escorremos a água até que o substrato ficasse apenas úmido, e não encharcado; o material foi ensacado em sacos de polipropileno de 1 kg, e autoclavados.

### Inoculação

No outro dia e em temperatura ambiente foram inoculados com  $\frac{1}{3}$  do pote de spawn para cada substrato, e sequencialmente colocados em sala de cultivo para a incubação do fungo, os substratos estão descritos na Quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos substratos, sua composição, peso seco e peso úmido, e quantidades de repetições de cada tratamento.

Substra- tos	Composiç ão	Peso seco total (g)	Peso úmido	Peso úmido por	Repetiçõ es
-----------------	----------------	---------------------------	---------------	----------------------	----------------

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

			total (g)	substrato (g)	
T01	BCA 100% + 2% GA	2 000 + 40 =2 040	6 092	468	12
T02	BCA 43%+SMT  43%+ SPR  14%+ 2%  GA	701+701+181 +31,6=  1 614,6	5 917	591,7	12

### Incubação

Na etapa de incubação os substratos foram mantidos na ausência de luz, com temperatura em 27°C, e umidade em 70%, até que ficassem totalmente brancos e prontos para a frutificação, aproximadamente 20 dias.

### Frutificação

Para a frutificação dos cogumelos a temperatura inicial foi diminuída 5°C, a umidade foi aumentada chegando em 80%, presença de luz artificial por 12h/dia, e abertura dos sacos expondo- os ao ar fresco. A data de frutificação e o peso dos cogumelos colhidos são detalhados na figura 1 abaixo:

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

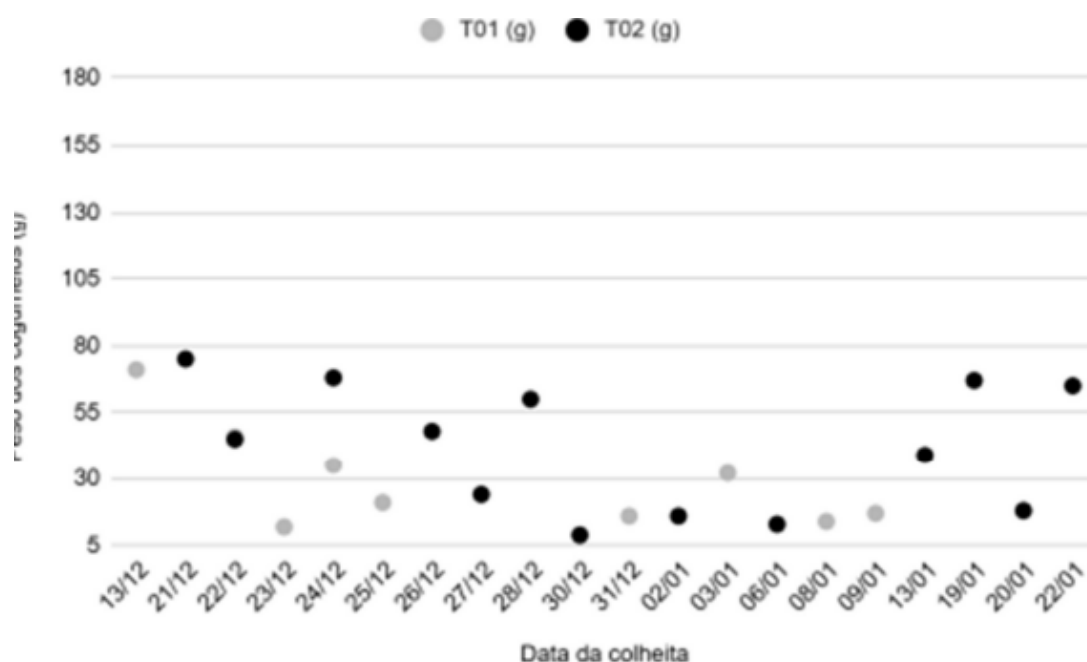


Figura 1: Datas e peso de cogumelos colhidos nos tratamentos T01 e T02.

### Parâmetros analisados

Segundo Urban (2017) a produtividade depende das propriedades genéticas do fungo, da qualidade e composição do substrato e das condições de cultivo, e é expressa em eficiência biológica (EB %) pela equação abaixo.

$$EB = \frac{\text{peso fresco de cogumelos}}{\text{peso seco do substrato inicial}} \times 100$$

Royse e Chalupa (2009) e Costa *et al.* (2022) descreveram produtividade (Pr) como sendo o peso fresco de cogumelos (g) pelo tempo total do cultivo (dia), da data da inoculação até a última frutificação, totalizando 59 dias.

$$Pr(g/dia) = \frac{\text{peso fresco de cogumelos}}{\text{tempo total do cultivo}}$$

As análises químicas foram realizadas em triplicatas verdadeiras, pesando 0,100g cada, seguindo o mesmo procedimento utilizado para análise de solos e plantas descrito por Malavolta, Vitti e Oliveira (1989) e Malavolta (1992).

As análises químicas para a determinação de micronutrientes bem como a quantificação do teor de proteína bruta foram realizadas tanto nos cogumelos quanto em seus respectivos substratos, utilizando a metodologia de digestão de Kjeldahl. Por outro lado, as análises de fibras e lipídios (A.O.A.C, 2011), e carboidratos (DUBOIS et al., 1951) foram conduzidas exclusivamente nos cogumelos, uma vez que o foco do estudo é a avaliação da qualidade nutricional dos cogumelos em si.

## DADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para EB dos tratamentos T01 e T02 foram de 13,2% e 34,5%. A produtividade (g/dia) foi de 4,47 e 10,2, respectivamente.

De acordo com Urben (2017), a EB mínima encontrada em substratos com bagaço de cana de açúcar é de 30%, sendo o tratamento T01 majoritariamente deste material, o resultado de 13,2% foi inferior ao reportado na literatura e demonstra que outros fatores podem ter afetado a produção, tais como temperatura e umidade na fase de frutificação.

Os micronutrientes analisados nos cogumelos e em seus respectivos substratos foram o cobre, zinco, ferro e manganês. Nos cogumelos, o tratamento T01 obteve um aporte significativo de Fe e Zn, 65,51 mg/100 e 20,20 mg/100g, respectivamente. Em seus sms o teor para

os mesmos nutrientes foram de 16,21 mg/100g e 5,47 mg/100g, demonstrando que os cogumelos foram capazes de armazenar em sua biomassa um teor elevado dos micronutrientes em comparação com o substrato exaurido (sms).

Os resultados de Fe e Zn encontrado nos cogumelos do tratamento T02 foram inferiores ao de T01, com 26,04 mg/100g e 17,65 mg/100g, respectivamente. A composição do substrato T02, acrescido de outros materiais como SBT e SRP podem ter diminuído o aporte dos nutrientes, evidenciando que em substratos majoritariamente compostos por BCA são mais eficientes no aporte de Fe e Zn.

Nos sms do tratamento T02 observamos que o teor dos nutrientes Fe e Zn foi superior ao encontrado nos sms do tratamento T01, com 68,29 mg/100g e 6,81 mg/100g, respectivamente.

Estes resultados corroboram para que a composição do substrato possa afetar na capacidade de armazenar nutrientes no corpo de frutificação dos cogumelos, ou seja sua capacidade de bioacumular nutrientes advindos do substrato de crescimento do fungo.

Para os micronutrientes Cu e Mn, nos cogumelos do tratamento T01 os resultados foram 1,94 mg/100g e 1,69 mg/100g, em seus sms os resultados foram de 1,30 mg/100g e 2,17 mg/100g.

Nos cogumelos do tratamento T02 os resultados obtidos para Cu e Mn são 3,15 mg/100g e 1,94 mg/100g, enquanto que nos sms o resultado foi de 3,48 e 1,29 mg/100g.

Entre os cogumelos e seus respectivos sms do tratamento T01 e T02, para o teor de Cu, o tratamento T02 foi mais eficiente no aporte do nutriente tanto nos cogumelos quanto nos sms; para o Mn, os cogumelos e os sms dos tratamentos T01 e T02 e não demonstraram diferença no aporte. Sendo o maior teor encontrado no sms do tratamento do tratamento T01.

O teor de fibra bruta nos cogumelos não diferiu entre os tratamentos, com 8,24% e 8,28%, em T01 e T02. O teor de fibra bruta nos cogumelos está relacionado a fatores como falta de umidade e composição química do substrato.

O teor de proteína bruta (PB) encontrado nos cogumelos dos dois tratamentos foi de 1,18%. Os resultados reportados na literatura indicam que o teor de proteína em cogumelos *P. ostreatus* é elevado, e pode variar de 3,8 a 39 mg/100g ; Os dados reportados na literatura explicitam a relação entre o teor de nitrogênio e o aumento na proteína acumulada no cogumelo (ELKANAH et al., 2022; OFODILE et al., 2020, EFFIONG et al., 2024).

O teor de lipídios nos cogumelos do presente estudo foi de 0,79% e 0,47%, para T01 e T02, respectivamente. Os teores de lipídios em cogumelos são baixo, e foi reportado por revisão literária, com várias espécies do gênero *Pleurotus* spp. em diversos substratos, comerciais e experimentais (SANDE et al., 2019 e IRSHAD, 2023); os estudos demonstram que a composição dos ácidos graxos não é significativamente afetada pelas espécies de cogumelos ou seus substratos, sendo então os cogumelos caracterizados como alimentos com baixo teor de gordura.

A concentração de carboidratos diferiu estatisticamente entre os cogumelos dos tratamentos T01 e T02, com 15,21% e 10,08% respectivamente, Effiong et al. (2024) obtiveram 43,42% de carboidratos totais, e concluíram que estes resultados são alterados principalmente em função do teor de nutrientes encontrados nos substratos e condições ambientais de cultivo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cogumelos foram caracterizados como fontes de micronutrientes, principalmente Fe e Z e demonstrou teores de

proteínas abaixo dos resultados encontrados na literatura; Os resultados para o teor de lípidos corroboram com os resultados da literatura que afirmam que os cogumelos são alimentos com baixo teor de gordura; Os teores de carboidratos encontrados classificam os cogumelos do presente estudo como alimentos com baixo teor de carboidratos; e o teor de fibras classificam os cogumelos como alimentos rico em fibras.

Assim, os cogumelos do presente estudo possuem potencial para produção de suplementos de Fe e Zn e fibras alimentares.

## REFERÊNCIAS

ALCALDE T; SALGADO S.E. Manual para la producción de hongos comestibles del género *Pleurotus* spp. Manual para produção de fungos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp. . Bogotá D.C, 32p. 2001.

ALEXOPOULOS C.J; MIMS C.W. Introductory mycology. New York: John Wiley & Sons: 632p. 1979.

A.O.A.C. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of AOAC International, 2011.

BEYER D.M. Basic procedures for *Agaricus* mushroom growing. Procedimentos básicos para o cultivo de cogumelos *Agaricus*. College of Agricultural Sciences. p1-16, 2017.

COSTA A.L; LOPES C.F; FERRAZ K.R; FERRAZ J.S; PUTZKE J. Produção do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatoroseus* sing a partir de serapilheira de *Eucalyptus grandis* w.hill e *Pinus elliottii* engelm. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.12, n.1, p.164-173, 2022. <https://doi.org/10.21206/rbas.v12i1.13837>

DUBOIS, M. et al. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, v. 168, n. 4265, p. 167-167, 1951.

EFFIONG, Magdalene Eno et al. Assessing the nutritional quality of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Frontiers in Nutrition*, v. 10, p. 1279208, 2024.

ELKANAH, F. A.; OKE, M. A.; ADEBAYO, E. A. Substrate composition effect on the nutritional quality of *Pleurotus ostreatus* (MK751847) fruiting body. *Heliyon*, v. 8, n. 11, 2022.

HONRUBIA M; FIGUEROA V; FAJARDO J; VERDE A; BLANCO D; SANCHEZ F. *Guía de hongos micodes*. Micodes (micología, conservación y desarrollo). Murcia: ESP, 142p. 2010.

IRSHAD, Asma et al. Determination of Nutritional and Biochemical Composition of Selected *Pleurotus* spp. *BioMed Research International*, v. 2023, n. 1, p. 8150909, 2023.

MALAVOLTA, E. e VITTI, G C e OLIVEIRA, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas ; princípios e aplicações*. . Piracicaba: Potafos. . Acesso em: 13 set. 2024. , 1989

MARTÍN, Carlos et al. Spent substrate from mushroom cultivation: exploitation potential toward various applications and value-added products. *Bioengineered*, v. 14, n. 1, p. 2252138, 2023.

OFODILE, Laretta Nwanneka et al. Production and nutritional composition of juice powder from oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer. *Functional Foods in Health and Disease*, v. 10, n. 11, p. 482-492, 2020.



PEDRA W.N; MARINO R.H. Cultivo axênico de *pleurotus spp* em serragem da casca de coco (*cocos nucifera linn.*) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arquivo do Instituto Biológico* v.73, n.2, p. 219-225, 2006  
<https://doi.org/10.1590/1808-1657v73p2192006>

ROYSE D.J; CHALUPA W. Effects of spawn, supplement and phase II compost additions and time of re-casing second break compost on mushroom (*Agaricus bisporus*) yield and biological efficiency. *Bioresource Technology*, v.100, n.21, p.5277-5282, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.074>

SANDE, Denise et al. Edible mushrooms as a ubiquitous source of essential fatty acids. *Food Research International*, v. 125, p. 108524, 2019.

UMEO, Suzana H. et al. Iron or zinc bioaccumulated in mycelial biomass of edible basidiomycetes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 92, n. suppl 2, p. e20191350, 2020.

URBEN, A.F. *Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada*. 3. Ed. Embrapa. Brasília: DF, 276p. 2017.

URBEN A.F; OLIVEIRA H.C.B; VIEIRA W, CORREIA M.J; URIARTT H.A; SANTOS J.K.P; RIBEIRO V.L. *Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada*. 2. Ed. Embrapa. Brasília: DF, 187p. 2004.

WEI, Maogui; GELADI, Paul; XIONG, Shaojun. NIR hyperspectral imaging and multivariate image analysis to characterize spent mushroom substrate: a preliminary study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, p. 2449-2460, 2017.

ZAMPIERI M.E. Cogumelo ganha espaço no prato e cultivo cresce no Brasil. Globo.com, Vinhedo:SP. Globo Rural, 2023.

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Tocantins.

## Capítulo 16

### Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* por cruzamento multispóricos visando a obtenção de isolados resistentes ao calor

Enzo de Almeida Sbroglia <sup>1</sup>

Augustus Caesar Franke Portella <sup>2</sup>

#### RESUMO

O cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus ostreatus* surge como uma opção viável para a transformação de resíduos agroindustriais em alimentos, sendo economicamente benéfico e ambientalmente sustentável. Este trabalho objetiva o melhoramento genético de *P. ostreatus* por meio de cruzamentos multispóricos, com foco na obtenção de isolados resistentes ao calor, que apresentem píleo na coloração cinza a cinza-chumbo, preferida comercialmente, e que possam frutificar em temperaturas superiores a 25°C. O estudo foi realizado no Laboratório de Compostos Bioativos da Universidade Federal do Tocantins, onde foram adquiridos isolados parentais de diferentes produtores. A produção de basidiomas ocorreu em condições controladas, seguida pela coleta de esporos para o desenvolvimento de culturas monospóricas. Os cruzamentos foram efetuados através da mistura de suspensões de esporos dos isolados selecionados, e os setores resultantes foram avaliados em condições de laboratório e em câmaras climatizadas de produção quanto ao crescimento e capacidade de frutificação. Os isolados que apresentaram melhor desempenho em condições de calor foram selecionados para avaliação em um ambiente de produção simulado. A metodologia empregada incluiu a técnica de matriz Spawn e a indução de frutificação em caixas organizadoras esterilizadas, mantidas a uma temperatura controlada de aproximadamente 30°C e umidade relativa de 75%. Os resultados deste estudo podem impulsionar a produção de cogumelos em regiões mais quentes do Brasil, reduzir custos com climatização e aumentar a oferta de um alimento rico em proteínas, beneficiando pequenos produtores e contribuindo para a segurança alimentar nacional.

Palavras-chave: Cogumelos comestíveis, melhoramento genético, *Pleurotus ostreatus*, resistência ao calor, produção sustentável.

---

<sup>1</sup> Graduando em Agronomia, Pibic/CNPQ, enzo.sbroglia@mail.uft.edu.br.

<sup>2</sup> Professor Associado, Doutor em Biotecnologia e Meio Ambiente curso Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, [portella@uft.edu.br](mailto:portella@uft.edu.br).

## INTRODUÇÃO

O cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus* sp, é uma alternativa economicamente viável para conversão de resíduos agroindustriais em alimento, são cultivados no mundo inteiro e representam 27% da produção global de cogumelos comestíveis (ROYSE, 2014). Anualmente, cerca de 998 toneladas de resíduos agrônômicos são produzidos, principalmente substâncias de origem vegetal, os *Pleurotus* utilizam-se desse tipo de resíduo, que pode ser remanejado, para seu desenvolvimento e produção, ajudando a reaproveitar esses resíduos, produzindo alimento e aliviando a carência nutricional de populações em países como a China, Índia e África que possuem o consumo desse tipo de alimento arraigado culturalmente, além disso, os resíduos resultantes dessa produção podem ser utilizados como fertilizante, alimento animal e para produção de biogás (KAKON; CHOUDHURY; SAHA, 2012). Por causa disso, o cultivo desse fungo, tem sido uma das principais fontes de renda para pequenos produtores no sudeste da Ásia (ADEBAYO; MARTINEZ, 2015).

No Brasil, o consumo e a produção desse produto não se comparam com o dos outros países citados acima, o país produz cerca de 22.000 toneladas ao ano, sendo a maior parte dessa produção advinda de pequenos produtores da região sudeste/sul, o que não supre a demanda nacional, de cerca de 42 mil toneladas (Embrapa Balanço Social, 2017), havendo então a importação de cerca de 20 mil toneladas para suprir a demanda nacional. A importação advém principalmente da China, que produz 5.008.850 toneladas ao ano (ANPC, 2013). No entanto, a procura por esses alimentos no Brasil tem aumentado no decorrer dos anos, sendo que o consumo per capita em 1990 era de 30g/habitante (Embrapa Balanço Social, 2017) e em 2017 era de 288g/habitante, com projeção de crescimento de até 9% até o ano de 2021 (URBEN; ARAILDES FONTES URBEN, 2017).

Um dos maiores motivadores desse aumento no consumo se deve ao fato deste alimento possuir altas concentrações de proteínas que variam de 28.6-15.4%, 84.1-61.3% carboidratos e 33.3% de fibra (VALVERDE; HERNANDEZ-PÉREZ; PAREDES-LOPEZ, 2015). Eles possuem mais proteína do que muitos vegetais, mas em menor quantidade se comparado ao leite e carne. Além disso, são uma fonte de minerais (Na, Ca, P, Fe e K) e vitaminas (vitamina C e complexo B) (BANO; RAJARATHNAM; STEINKRAUS, 1988) e (Lee et al., 2018) sendo considerados fontes alternativas ao consumo de peixe, carnes e vegetais (KAKON; CHOUDHURY; SAHA, 2012) e (RAMAN et al., 2020).

Tendo em vista as problemáticas apresentadas e levando-se em consideração o tempo de prateleira relativamente curto desse alimento (SINGH. et al., 2011) objetiva-se o melhoramento genético através do cruzamento multispórico de uma variedade de *P. ostreatus* resistente ao calor, a var. Flórida, capaz de frutificar em temperaturas acima de 25°C (EGER; EDEN; WISSIG, 1976) que apresenta píleo branco, com variedades comercialmente aceitas pelos principais consumidores deste produto no Brasil, que apresentam píleo cinza a cinza chumbo e que não frutificam em temperaturas de 15+-5 °C.

Dessa forma, o melhoramento genético visa a obtenção de isolados de *P. ostreatus* resistentes ao calor, com píleo cinza à cinza-chumbo, podendo viabilizar o cultivo em regiões mais quentes ao norte do país, diminuindo custos onerosos com a climatização das casas de cultivo e possibilitando o cultivo para pequenos produtores, aos consumidores, uma maior oferta desse alimento rico em proteínas, com maior acessibilidade logística, representando um avanço na produção e comercialização desse tipo de cogumelo.

## MÉTODO E MATERIAIS

O estudo foi realizado no Laboratório de Compostos Bioativos - LABCOMBI da Universidade Federal do Tocantins - UFT, no Campus Universitário de Gurupi (11°43' S e 49°04' O 284 m de altitude) e os

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

experimentos foram realizados no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

Origem dos isolados parentais – Os isolados usados neste estudo foram adquiridos de diferentes produtores, o isolado da variante florida (branco) foi adquirido de um cultivador em MG, e o isolado da variedade comercial (preto) foi adquirido de um produtor comercial em SP.

Tabela 1 – Caracterização dos isolados de *Pleurotus ostreatus* usados nos cruzamentos conforme temperatura de frutificação.

Código	Temperatura de frutificação	
	20±4 °C	25±4 °C
A	Pileo cinza chumbo, encorpado	n.f
B	Pileo branco, denso	f

Legenda: n.f não frutificou

Produção de basidiomas dos isolados parentais – Os isolados foram multiplicados em meio BDA (marca do fabricante), e incubados a 25 ±1°C por uma semana. Em seguida, foram cultivados em substrato lignificado baseado na técnica JunCao (40% bagaço de cana, 38% *Brachiaria decumbens*, 20% farelo de arroz, 2% gesso agrícola) segundo as metodologias da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A produção foi realizada em câmara climatizada, à temperatura de 20 +- 1 °C, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85-90%. A indução de primórdios foi realizada após a completa colonização do substrato (45 dias), pela retirada da tampa e acréscimo de uma lâmina d'água de 2 a 3 cm de espessura durante 4 horas. Em seguida, foi retirado o excesso de água e os frascos transferidos para câmaras de frutificação, após a formação dos basidiomas, e maturação dos mesmos, foi realizada a colheita para a condução de extração dos esporos.

Desenvolvimento de culturas monospóricas - Para o desenvolvimento de culturas monospóricas, os basidiomas

desenvolvidos foram transferidos individualmente para placas de Petri previamente autoclavadas. Posteriormente, em condições assépticas, os esporos foram coletados segundo a metodologia de Urben (2004), para isso foi utilizado um apoio tripé feito de arame liso, onde o basidioma ficou apoiado sobre uma placa de petri previamente esterilizada, coberto por um erlenmeyer, e deixado em repouso por 24 horas para formação do carimbo de esporos, resultado da precipitação dos esporos. A partir dos esporos obtidos, foram feitas suspensões, utilizando-se 2 ml de água destilada autoclavada onde se diluiu os esporos, foi realizada uma segunda diluição para reduzir a densidade esporica para uma média de 10 esporos por campo microscópico no aumento de 10x, e, em seguida, foram realizados os cruzamentos (URBEN, 2004).

Cruzamentos multispóricos – Na reprodução sexual dos fungos do filo Basidiomycota, a fusão de hifas monospóricas (n) geneticamente compatíveis, originárias de esporos com diversidade genética, culmina na geração de um zigoto. Este zigoto, sob condições ambientais apropriadas, desenvolve-se em um micélio secundário, o qual possui núcleos derivados de dois esporos com variação genética (2n). Esse micélio, ao expandir-se e ramificar-se, resulta na formação de um novo corpo de frutificação, conhecido como cogumelo (LIN; LIN, 1995; URBEN, 2004). Em etapas subsequentes, quando o ambiente favorece, forma-se o micélio terciário, que é essencial para a produção das basídias, onde acontecem a união dos núcleos e a meiose, levando à formação dos basidiósporos e completando o ciclo de vida do fungo.

Os cruzamentos foram realizados através da mistura de 1ml da suspensão de esporos do isolado F com 1ml da suspensão de esporos do isolado que frutifica em baixas temperaturas a ser cruzado e, com um auxílio de uma seringa, foi transferida uma gota dessa suspensão mista para o centro de uma placa de Petri com meio de cultura BDA e incubados por uma semana a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro. Durante o período de colonização foram feitas avaliações quanto ao crescimento da colônia (diâmetro médio), velocidade de desenvolvimento e a formação de

setores, estes setores foram isolados em novas placas e identificados por um número que identificava o cruzamento e outro sequencial que representava o número do isolado, separados por duas barras.

Avaliação dos cruzamentos em condições de laboratório – Os cruzamentos foram avaliados quanto à velocidade de colonização, tipo de crescimento (tomentoso ou rizomórfico), estabilidade, e indução de primórdios, em câmaras de crescimento com temperatura de  $28 \pm 1$  °C, durante até 7 dias, com três repetições. Para tanto, as colônias foram fotografadas com a câmera do iPhone 11, com 12 megapixels e resolução de 1280x960 pixels.

Avaliação dos setores selecionados em condições de produção – Os isolados que apresentaram colônias de crescimento acelerado em condições de calor, foram selecionados e avaliados em câmaras climatizadas de produção. Primeiramente, foi realizada a multiplicação micelial através da técnica de matriz, ou Spawn, para isso, os grãos foram lavados em água corrente até a remoção completa da goma resultante do cozimento e foram bem escorridos. Aos grãos de milho cozidos, foi adicionado 20 g de gesso agrícola (2%) para cada quilo de grãos secos, com o propósito de ajustar o pH e evitar a aderência entre os grãos.

Os grãos de milho foram então agitados e acondicionados em sacos de polipropileno de alta densidade, resistentes a altas temperaturas. Por fim, o material foi submetido à esterilização em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Os sacos de polipropileno foram preenchidos com 120 gramas de milho e inoculados com 1/3 de meio de cultura colonizado em placas de petri de 10cm de diâmetro, em seguida foram vedados com fita microporosa para permitir as trocas gasosas (URBEN et al., 2004) foram feitas três repetições de cada isolado.

Os sacos inoculados e lacrados eram conservados em prateleiras, em um ambiente limpo, com temperatura controlada em torno de 28 °C e livre de luz, permitindo que a colonização pelo fungo ocorresse após aproximadamente 15 dias, conferindo aos grãos uma aparência cotonosa. Em seguida, foi misturado aos grãos colonizados 230 gramas



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

de serragem suplementada nas mesmas proporções descritas para o meio de cultivo dos parentais (40% bagaço de cana, 38% *Brachiaria decumbens*, 20% farelo de arroz, 2% gesso agrícola). O cultivo foi realizado à temperatura de  $28\pm 5^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85-90%, com 3 repetições.

Após a completa colonização do substrato, foi realizado a indução a frutificação, adaptando-se caixas organizadoras de plástico, esterilizadas e devidamente seladas, foram feitas entradas de ar para trocas gasosas onde foi instalado fitas microporosa para prevenir contaminações externas, nessa caixa, foi adicionado uma garrafa d'água onde foi instalado um termostato de aquário de 50V que ficou submerso em água e configurado para manter a temperatura interna em  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , de modo a manter altas umidades e uma temperatura no ar ligeiramente menor que da água, além disso, um termo higrômetro foi instalado para o monitoramento dos parâmetros no interior da câmara, foi mantido uma média de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa média de 85%.

### DADOS E DISCUSSÃO

Os parentais frutificaram, foram colhidas as amostras de esporos e os basidiomas secos na estufa para análise genética posteriormente. Após a realização dos cruzamentos foram selecionados 50 isolados que apresentavam as características fenotípicas desejadas e conduzidos para avaliação, desses, 12 apresentaram contaminação, restando 38 isolados com características desejáveis para uma boa produção.

Tabela 2 – Uniformidade das colônias repicadas por cruzamento multispóricos de *Pleurotus ostreatus* em câmara de crescimento.

Cruzamento	Isolados	Estável e Circular (%)	Estável e Irregular (%)	Instável e Circular (%)	Instável e Irregular (%)
AxB	38	55,26	28,95	8,52	7,89

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Dentre os isolados que apresentavam os aspectos mais desejáveis (colônia circular e estabilidade) os isolados: 3/1, 4/1, 8/1, 20/3, 21/4, 28/2, 31/2 e 32/1 apresentaram melhor desenvolvimento micelial em temperaturas altas, completando a sua colonização à frente dos demais, no entanto, apenas após os 7 dias de avaliação. Dentro do período de 7 dias, o isolado que apresentou crescimento micelial recorde foi o isolado 16/2 na terceira repetição com 9 mm de diâmetro, sendo que este isolado foi considerado instável devido ao alto valor de desvio padrão entre as repetições.

Tabela 3 – Crescimento micelial dentro das características desejáveis.

Tabela 3 – Crescimento micelial dentro das características desejáveis.

Isolados (Placa/Setor)	Crescimento micelial médio (mm $\pm$ dp)
3/1	8,47 $\pm$ 0,12
4/1	6,63 $\pm$ 0,82
8/1	8,00 $\pm$ 0,51
20/3	7,37 $\pm$ 0,90
21/4	7,17 $\pm$ 0,74
28/2	7,47 $\pm$ 0,76
31/2	6,63 $\pm$ 0,82
32/1	6,33 $\pm$ 0,85

Figura 01: Exemplo de colônias circulares e estáveis (7 dias).

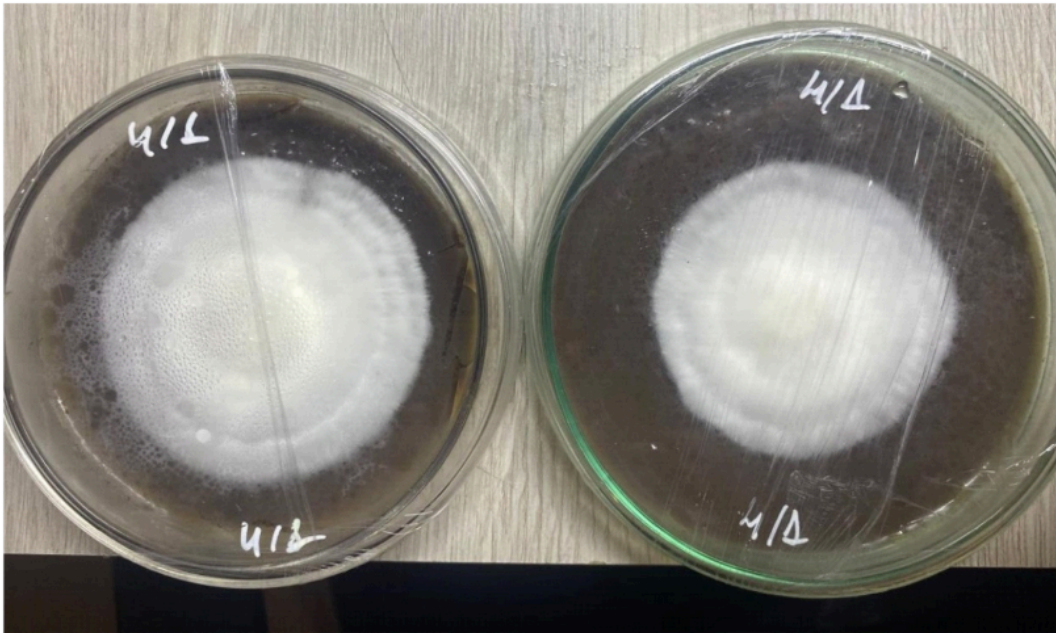


Figura 02: Exemplo de colônia estável e circular (4 dias).

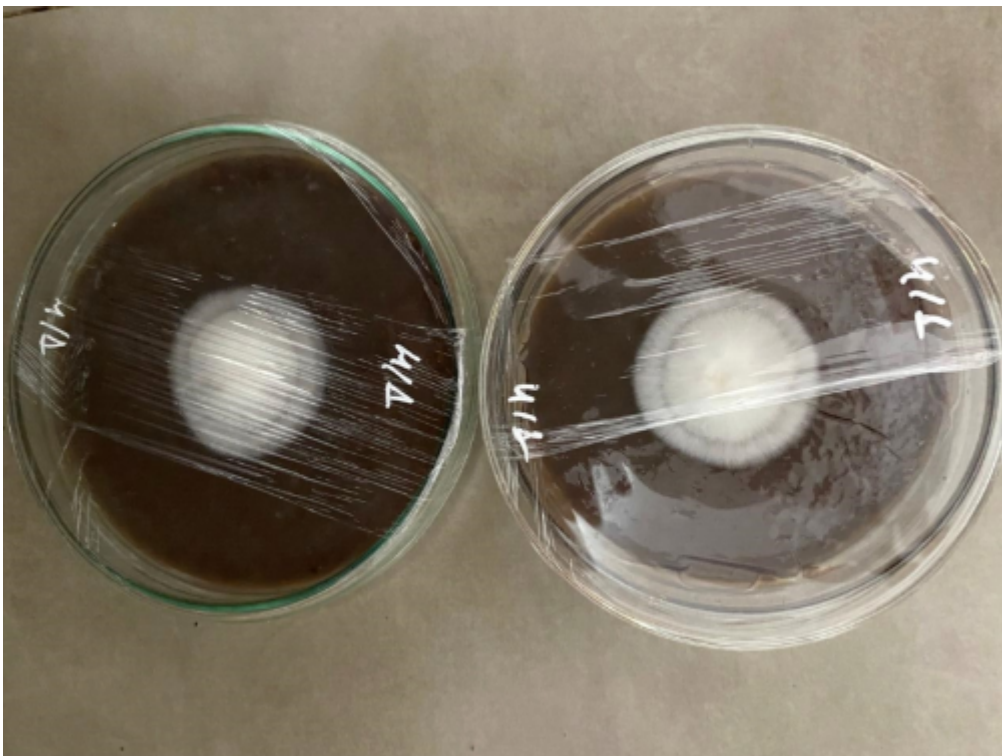
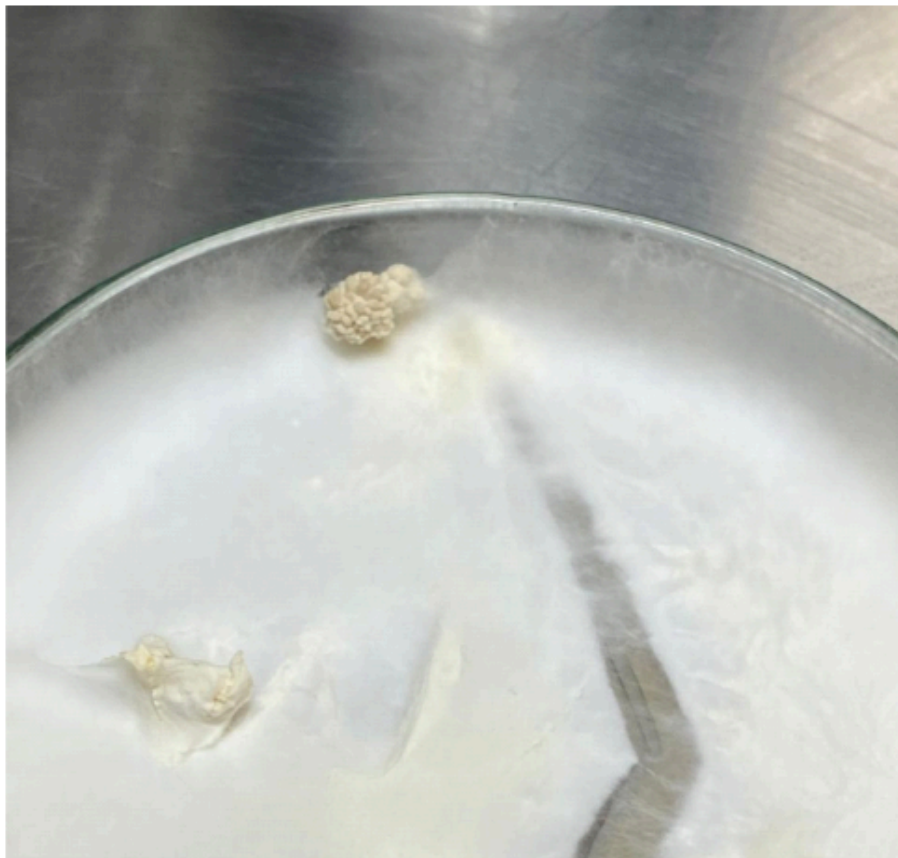


Figura 03: Exemplo de colônia Irregular.



Rajaratnam e Bano (1987) observaram que, em cruzamentos monospóricos, apenas cerca de 25% são sexualmente compatíveis e têm a capacidade de induzir a formação de primórdios. Isso se aplica a espécies de basidiomicetos que possuem herança sexual tetrapolar, como é o caso de *P. ostreatus*. Com relação aos isolados analisados, apenas o isolado 32/1 apresentou capacidade de produção de primórdios na temperatura de cultivo utilizado, tendo feito isso em 2 das 3 tentativas, sendo que este não foi capaz de se desenvolver completamente e abortou. Outro aspecto relevante a ser avaliado é a influência da temperatura sobre a gênese e crescimento dos primórdios, já que cepas não aclimatadas ao cultivo em condições de alta temperatura podem sofrer interrupção ou estagnação em seu processo de desenvolvimento, conforme observado neste estudo e relatado por Chang et al. (1995) em suas investigações com *Lentinula edodes*.

Figura 04: Formação de primórdio do isolado 32/1.



Elliott e Langton (1981) destacaram que a comercialização de novos isolados não deve ser feita de forma precipitada com base apenas em resultados obtidos em placas de Petri, uma vez que o crescimento micelial nessa etapa não é indicativo do potencial produtivo. Entretanto, monitorar o desenvolvimento micelial em placas de Petri é essencial para selecionar isolados que não exibam setores, o que poderia comprometer a produtividade e a morfologia dos cogumelos devido a processos como recombinação somática (Li et al., 1994), herança extracromossômica (Matsumoto & Nakai, 1996), perda de alelos ou polimorfismo genético (Labarère et al., 1991; Chen et al., 1996).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo visou o melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* por meio de cruzamentos multispóricos, com o objetivo de obter isolados resistentes ao calor que apresentassem características comerciais desejáveis, como a coloração do píleo entre cinza e cinza-chumbo, e que fossem capazes de frutificar em temperaturas superiores a 25°C.

Os resultados obtidos permitiram a seleção de 38 isolados com potencial para o cultivo em temperaturas elevadas, dos quais apenas o isolado 32/1 demonstrou capacidade de produção de primórdios na temperatura de cultivo utilizada. No entanto, este isolado não conseguiu completar o desenvolvimento dos basidiomas, o que indica a necessidade de mais estudos para a obtenção de isolados que atendam plenamente aos critérios estabelecidos.

As análises realizadas destacaram a importância de considerar não apenas o crescimento micelial em placas de Petri, mas também a estabilidade dos setores e a capacidade de frutificação sob condições de alta temperatura. A metodologia empregada, incluindo a técnica de matriz Spawn e a indução de frutificação em caixas organizadoras esterilizadas, mostrou-se promissora para a avaliação do potencial de produção dos isolados selecionados.

Este trabalho contribui para o avanço no cultivo de cogumelos em regiões mais quentes do Brasil, com possíveis impactos positivos na redução de custos com climatização e no aumento da oferta de alimentos ricos em proteínas. Contudo, são necessárias pesquisas adicionais para otimizar as técnicas de cultivo e garantir a viabilidade comercial dos isolados selecionados, com foco na produção sustentável e na segurança alimentar nacional.

## REFERÊNCIAS

Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC). Disponível em:  
<<https://www.anpccogumelos.org/>>. Acesso em 10 mar 2024.

URBEN, A. F.; ARAILDE FONTES URBEN, C. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. [s.l.] Brasília, DF: Embrapa, 2017.

ELLIOTT, T.J.; LANGTON, E.A. Strain improvement in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Euphytica*, v. 30, p. 175-182, 1981.

MATSUMOTO, T.; NAKAI, Y.F. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics*, v. 30, p. 549-552, 1996.

Balanco Social 2017. Disponível em: <<https://bs.sede.embrapa.br/2017/>>. Acesso em: 10 mar. 2024.

LABARÈRE, J.; DEL, T.; HUYNH, T.D.H. Variability of the incompatibility alleles of the tetrapolar heterothallic basidiomycete *Agrocybe aegerita*: a survey of recent experiments. *Mushroom Science*, v. I, p. 23-29, 1991.

CHEN, M.J.; WANG, Z.Y.; HE, D.M.; PAN, Y.J.; CHEN, M.J. Biochemical analysis of hybrid shiitake (*Lentinus edodes*) strains resulting from di-mono mating. *Acta Agriculture Shanghai*, v. 12, p. 19-22, 1996.

RAMAN, J. et al. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. *Mycobiology*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 2 nov. 2020.

LI, A.; BEGIN, M.; KOKUREWICZ, K.; BOWDEN, C.; HORGAN, P.A. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 2384-2388, 1994.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

ROYSE, D., A global perspective on the high five: Agaricus, Pleurotus, Lentinula auricularia & Flammulina undecimspora, 2014.

KAKON, A.; CHOUDHURY, M. B. K.; SAHA, S. Mushroom is an Ideal Food Supplement. Journal of Dhaka National Medical College & Hospital, v. 18, n. 1, p. 58-62, 19 out. 2012.

ADEBAYO, E. A.; MARTINEZ D., Oyster mushrooms (Pleurotus) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. African Journal of Biotechnology, v. 14, n. 1, p. 52-67, 7 jan. 2015.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. International Journal of Microbiology, v. 2015, n. 376387, p. 1-14, 2015.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S.; STEINKRAUS, K. H. Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 27, n. 2, p. 87-158, jan. 1988.

LEE, K. et al. Nutritional Compositions and Antioxidant Activities of Frequently Consumed Mushrooms in Korea. Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition, v. 47, n. 11, p. 1178-1184, 30 nov. 2018.

EIRA, A.F.; MINHONI, M.T.A. Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2 ed. Fundação de Pesquisa Agropecuária e Florestais, Botucatu. 1997.

FRISTCHE, G. Breeding Work. In: J.T. Chang & W.A. Hayes (eds.). The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, New York, pp.239-249. 1978.



KURAMAE-IZIOKA E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista Unimar* 19: 683-689. 1997.

LARRAYA L., PENAS, M.M., PEREZ, G., SANTOS, C., RITTER, E., PISABARRO, A.G.;

RAMIREZ, L. Identification of incompatibility alleles and characterization of molecular markers genetically to the A incompatibility locus in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetic* 24: 486-493. 1999.

MARINO, R. H. Melhoramento genetico de *Pleurotus ostreatus* visando o cultivo axenico de isolados resistentes ao calor. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2002

MARINO, R. H., EIRA A. F., KURAMAE, E. E.; QUEIROZ, E. c.

Morphomolecular

characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer strains in relation to luminosity and temperature of fructification. *Scientia Agricola* 60: 5332-5335. 2003

MATSUMOTO, T.; NAKAI, Y. F. Mitochondrial DNA inheritance in sexual crosses of *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetic* 30: 549-552. 1996.

SUNAGAWA, M.; MAGAE, Y. Isolation of genes differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 246: 279-284. 2005.

SUGUIMOTO, H. H., BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F. H.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

Yeratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Federation European Microbiological Societies Microbiology Letters 194: 235-238. 2001.

WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R, LIVAK , K. J., RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. Y. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535. 1990.

SINGH, M. et al. Mushrooms: cultivation, marketing and consumption. 1 jan. 2011.

EGER, G.; EDEN, G.; WISSIG, E. *Pleurotus ostreatus*? Breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 47, n. 4, p. 155-163, 1976.

LI, A.; BEGIN, M.; KOKUREWICZ, K.; BOWDEN, C.; HORGAN, P.A. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 2384-2388, 1994.

### FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil”

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Tocantins”

## Capítulo 17

### *Bacillus Subtilis* no biocontrole de nematóides na cultura de alface

Bruna Marques de Souza <sup>1</sup>

Aloisio Freitas Chagas Junior <sup>2</sup>

#### RESUMO

A bactéria do gênero *Bacillus*, da espécie *Bacillus subtilis*, se tornou nos últimos anos um organismo modelo para o estudo de processos das bactérias gram positivas, por características como esporulação, competências genéticas e formação de biofilmes. A mesma, possui um alto potencial comercial na área da agricultura devido a sua eficiência como promotora de crescimento (RCPC), controle de patógenos e nematóides, pois age interferindo na aderência do patógeno nas folhas e no seu desenvolvimento posterior, inibe a germinação dos conídios, destruindo assim o crescimento dos patógenos, perfurando as membranas do tubo germinativo e micélio, além da formação de biofilmes nas raízes das plantas, as defendendo assim, de ataques de nematóides. O presente trabalho, tem como finalidade verificar a eficiência do *Bacillus subtilis* no controle biológico de nematóides na cultura da alface bem como seus benefícios como promotora de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento experimental casualizado, com três tratamentos, sendo eles Bs10, Panta (produto comercial) e testemunha, dispostos em tubetes com substrato, areia e solo nas proporções 1:1:1, com inoculação de 1 mL de nematóides, posteriormente, a inoculação dos tratamentos bacterianos com 1 mL por tubete aos 11 dias após semeadura. As avaliações foram realizadas com 39 e 52 dias, apresentando resultados positivos quanto ao NMG (Número médio de galhas) e incremento de biomassa, demonstrando assim, a eficiência do *Bacillus subtilis* quanto ao biocontrole de nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. e as suas capacidades como promotora de crescimento. A utilização do isolado de *Bacillus subtilis*, Bs10 e isolado comercial Panta avaliados, se mostraram promissores para o controle de *Meloidogyne* spp. na cultivar de alface Lucy Brown, bem como eficiente nas variáveis de biomassa aérea e radicular, onde ficou explícito a capacidade que as bactérias têm, na conversão de substâncias minerais em orgânicas que não estavam disponíveis, fator benéfico para a planta, no qual além de inibir a atividade de patógenos, contribuiu diretamente para o aumento da produção, incrementando o desenvolvimento vegetativo de interesse comercial da cultura, esses resultados, revelam um alto potencial para serem utilizados no controle biológico.

Palavras-chave: Bactéria; Nematicida; *Lactuca sativa* L.

---

<sup>1</sup> Graduanda em Agronomia, Pibic/CNPq, Universidade Federal do Tocantins, bruna.marques@mail.uft.edu.br.

<sup>2</sup> Formação, vínculo, instituição, e-mail. (Doutor em xxxx, Curso de xxxxx, Universidade Federal do Tocantins, beltrano@mail.uft.edu.br.)

## INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Bacillus*, além de serem componentes de populações microbianas do solo, superfícies radiculares e superfícies foliares, apresentam características atrativas para o estudo do controle biológico de doenças e promotores de crescimento vegetal. É uma das principais bactérias da rizosfera que é importante na promoção do crescimento das plantas, afetando positivamente a germinação, o desenvolvimento e o rendimento das culturas, e também por produzir substâncias que promovem o crescimento, melhoraram a nutrição das plantas e inibem patógenos (CHAGAS JUNIOR et al., 2022).

A espécie *Bacillus subtilis* possui efeitos benéficos na nodulação e na supressão de doenças, atuando diretamente na produção ou alteração das concentrações de hormônios vegetais, na fixação de nitrogênio, fosfatos minerais ou na dissolução de outros nutrientes no solo, aumentando a permeabilidade das raízes e a produção de sideróforos, além de promover a melhoria da produtividade das culturas; especialmente quando combinado com outras medidas de gestão, como a fertilização (SAXENA et al., 2019).

Dentre as principais causas de perdas nas maiores culturas de importância econômica ou de subsistência em todos os continentes, a incidência de nematoides tem ganhado notoriedade, bem como estudos e atualizações de tecnologias, pois em escala global, estima-se que os prejuízos decorrentes da ação desses organismos parasitas de plantas sejam calculados entre 78 bilhões e 125 bilhões de dólares (LOPES; FERRAZ, 2016).

Muitos gêneros de nematoides ocorrem em áreas de produção de hortaliças folhosas, dentre os principais nematoides que têm causado prejuízos, é possível encontrar alta incidência de nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) (EMBRAPA, 2010).

No Brasil, os maiores problemas em hortaliças folhosas geralmente ocorrem em decorrência da infestação pelo

nematoide-das-galhas, principalmente as espécies *M. incognita* e *M. javanica*, que possuem maior distribuição nas regiões produtoras. A alta incidência destas espécies é atribuída à alta capacidade de reprodução de ambas, em regiões com grande variação de temperatura do solo. Outras espécies, como *Meloidogyne hapla* e *M. arenaria* possuem maior incidência em regiões isoladas do país e causam maiores problemas em regiões tropicais e subtropicais (FERRAZ e BROWN; OLIVEIRA, 2016).

Com o uso de nematicidas caro, de disponibilidade limitada e propensos a causar sérios danos ao meio ambiente e aos seres humanos, o controle químico tem prevalecido há algum tempo. Os produtos mais utilizados para fins de controle, pertencem à classe dos carbamatos, que estão entre as formulações mais tóxicas já registradas no país (MACHADO et al., 2012). Desta forma, o controle biológico torna-se uma opção sustentável diante do controle tradicional de nematoides (FERNANDES et al., 2014).

Neste contexto, as bactérias da rizosfera, especialmente *Bacillus subtilis*, têm se tornado objeto de pesquisas, principalmente devido às suas capacidades nematicidas e como promotoras de crescimento de plantas, o que estimula a utilização de novas estratégias que facilitem a implementação de abordagens mais sustentáveis para a agricultura (ICHIWAKI, 2012). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis* no biocontrole de nematoides na cultura de alface.

## MÉTODO E MATERIAIS

Os experimentos foram conduzidos em condições de cultivo protegido, no Viveiro Florestal da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, localizado a 11°43' de latitude Sul e 49°04' de longitude Oeste e altitude de 280 m.

Foi utilizada a cultivar comercial de alface Lucy Brown, avaliada em duas etapas. As parcelas consistiram em duas sementes em

delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos implantados foram: Bs10, Panta (produto comercial) e a testemunha absoluta sem inoculação, dispostos em tubetes contendo substrato, areia e solo, na proporção de 1:1:1. A inoculação dos nematoides foi realizada no momento da semeadura, contendo 1 mL por tubete. Posteriormente, com onze dias após a semeadura, realizou-se a inoculação com os tratamentos bacterianos na proporção de 1 mL por tubete (Figura 1 A).

Na formação de mudas de alface, foram semeadas duas sementes em 50 tubetes. Aos nove dias após a semeadura, quando as plântulas apresentaram a primeira folha definitiva expandida, foi realizado o desbaste, mantendo-se uma plântula por célula (Figura 1B).

Figura 1. A, desbaste das mudas nove dias pós semeadura. B, Inoculação dos tratamentos Bs10 e PANTA, 11 dias após a semeadura.



O isolado de nematoide foi obtido na UFT, já caracterizado, por meio de parceria com grupo de pesquisa em Olericultura. Eles foram mantidos em jardineira com plantas de alface para a preservação de viabilidade.

Aos 39 dias após semeadura, as plantas foram retiradas cuidadosamente dos vasos e suas raízes foram lavadas em água

corrente para remoção do substrato. Em seguida, foram levadas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola para a determinação das seguintes características: Comprimento da raiz (CR) e comprimento folha (CF): com auxílio de uma régua graduada em cm, onde foi mensurada a distância da base do corte no caule até a parte apical da raiz, bem como a base do corte no caule até a parte apical da folha; Quantidade de folhas (QF); Massa seca da parte aérea (MAS), massa seca raiz (MSR) e massa seca total (MST), ambos obtidos através de pesagem em balança analítica, após a secagem por estufa. Em todos os tratamentos, foram avaliadas: Número médio de galhas (NMG), onde através do microscópio, foram identificadas e contabilizada a quantidade de galhas nas raízes (Figura 2).

Figura 2. Identificação de galhas via microscópio após lavagem das raízes.



Os dados foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística SISVAR.

### DADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação, realizada com 39 dias após a semeadura, os tratamentos Panta e Bs10, apresentaram pouca diferenciação entre si, no entanto superiores a testemunha, para as variáveis analisadas (Tabela 1). Ambos os tratamentos mostraram-se superiores a testemunha, possuindo grande expressividade positiva no comprimento de raiz (CR), vantagem obtida através das propriedades de promoção de crescimento do *Bacillus subtilis*, onde foi observado um maior desenvolvimento das raízes nos tratamentos, tornando as plantas tratadas mais aptas a explorar maiores áreas do solo e consequentemente absorverem mais água e nutrientes, tornando-as mais resilientes e aptas a condições adversas, da mesma forma que foi relatado nos estudos realizados por Jain et al. (2016) na cultura da soja, os quais mostraram que isolados de *Bacillus* podem incrementar, o peso fresco da parte aérea e aumentar o tamanho e número de raízes laterais.

Os tratamentos Panta e Bs10 apresentaram bons resultados quanto as características de produtividade, sendo a quantidade de folhas (QF) apresentando mínima variação entre si, no entanto significantes quanto a testemunha, bem como para o comprimento de folha (CF), onde os tratamentos se diferenciaram da testemunha. Domingues et al. (2022), também notaram um significativo aumento de folhas em alface e Clemente et al. (2016) que notaram um expressivo aumento na produtividade, após a aplicação de composto fermentado com linhagens de *Bacillus* em cenouras.

Os níveis de massa seca da raiz (MSR), massa seca aérea (MAS) e massa seca total (MST) se apresentaram superiores a testemunha, onde a MSA, apresentou variação quanto ao tratamento da cepa Bs10, se mostrando pouco mais eficiente na promoção de crescimento foliar, revelando maior capacidade de retenção de nutrientes nas plantas. Segundo Braga (2022), esse incremento na biomassa, pode estar ligado aos vários mecanismos pelos quais essa bactéria atua, como na produção de fitohormônios, disponibilização de nutrientes, enzimas e produção de ácido cianídrico.



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Tabela 1. Biomassa de plantas de alface inoculadas com *Bacillus subtilis* aos 39 dias após semeadura.

TRAT	CR	QF	CF	MSR	MSA	MST	NMG
PANTA	22,8 a	8,60 a	11,66 a	0,33 a	0,48 b	0,81 a	7,75 a
BS10	22,8 a	8,54 a	12,16 a	0,29 a	0,60 a	0,89 a	7,38 a
Testemunha	17,84 b	6,80 b	10,0 b	0,21 b	0,38 c	0,59 b	15,90 b
CV (%)	4,49	10,75	8,12	6,74	1,46	9,72	8,04

CR (Comprimento de Raiz); QF (Quantidade de Folhas); CF (Comprimento de Folhas); MSR (Massa Seca Raiz); MSA (Massa Seca Aérea); MST (Massa Seca Total); NMG (Número Médio de Galhas).

Foi notado também, grande significância no número médio de galhas (NMG), onde os tratamentos pouco se diferiram entre si, porém apresentou excelente resultado em relação a testemunha, revelando uma significativa redução na incidência de número de galhas nas raízes. Domingues et al. (2022), também relatou um destaque de *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne* spp. em alface. Segundo Araújo e Marchesi (2009), a redução dos nematoides através da utilização de rizobactérias pode ser justificada devido aos mecanismos de ação delas, tais como: aumento da imobilidade, mortabilidade e inibição da eclosão.

Na segunda avaliação, realizada aos 52 dias após a semeadura, todos os tratamentos se mantiveram superiores a testemunha. A cepa Bs10 apresentou variância quanto a QF, apresentando desempenho significativo na promoção de crescimento foliar, ao contrário do resultado obtido na primeira etapa do experimento. Esse aumento de eficácia pode estar relacionado com o fato de a cepa ser obtida em solo do cerrado, que segundo Chagas et al. (2023) esse fator pode favorecer a constante viabilidade da cepa na região. Braga (2022),

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

também constatou maior eficiência do Bs10 quanto as variáveis de biomassa em estudos voltados para a cultura da soja.

Tabela 2. Biomassa de plantas de alface inoculadas com *Bacillus subtilis* aos 52 dias após semeadura.

TRAT	CR	QF	CF	MSR	MSA	MST	NMG
PANTA	22,77 a	7,50 b	12,30 a	0,34 a	0,53 a	0,88 a	13,90 a
BS10	22,32 a	8,53 a	12,28 a	0,32 b	0,52 a	0,84 a	10,20 b
Testemunha	22,17 a	7,25 b	11,78 a	0,27 c	0,43 b	0,71 b	19,00 c
CV (%)	2,83	5,35	5,91	4,34	6,36	7,74	7,62

CR (Comprimento de Raiz); QF (Quantidade de Folhas); CF (Comprimento de Folhas); MSR (Massa Seca Raiz); MSA (Massa Seca Aérea); MST (Massa Seca Total); NMG (Número Médio de Galhas).

Para as variáveis MSR, MSA e MST o tratamento Panta se mostrou superior quanto ao incremento de biomassa nas partes aéreas e radicular, Chagas et al., (2022), também relatou incremento de biomassa por *Bacillus subtilis* na cultura da soja, qual está relacionada com as propriedades biológicas da bactéria, que possui facilidade para manter sua viabilidade, tendo assim, potencial para promover o crescimento vegetal.

Para o NMG o tratamento Bs10 se manteve superior, apresentando uma significativa redução da incidência de galhas nas raízes da cultura. Domingues et al. (2022), ao realizar um trabalho voltado para ação de agentes biológicos no controle de fitonematóides em alface, analisou que a utilização de *B. subtilis* desempenhou resultados promissores no controle de nematoides das espécies de *Meloidogyne*. O autor também relata que a patogenicidade do nematoide na cultura pode depender da cultivar utilizada, pois as cultivares podem desempenhar

sensibilidade distintas, entretanto a utilização de controles alternativos se faz necessária, pois pode contribuir com a redução dos prejuízos causados por nematoides. Costa (2023) também constatou a eficiência de *B. subtilis* ao pulverizar sobre plantas de cafezeiro um produto contendo a bactéria como princípio ativo. Segundo o autor, o nematicida biológico desempenhou capacidade de reduzir a população de *Meloidogyne* exígua no solo a partir de 180 dias após aplicação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do isolado de *Bacillus subtilis*, Bs10 e isolado comercial Panta avaliados se mostraram promissores para o controle de *Meloidogyne* spp. na cultivar de alface Lucy Brown, bem como eficiente nas variáveis de biomassa aérea e radicular, onde ficou explícito a capacidade que as bactérias têm, na conversão de substâncias minerais em orgânicas que não estavam disponíveis, fator benéfico para a planta, no qual além de inibir a atividade de patógenos, contribuiu diretamente para o aumento da produção, incrementando o desenvolvimento vegetativo de interesse comercial da cultura. Esses resultados revelam um alto potencial para serem utilizados no controle biológico.

## REFERÊNCIAS

ARPINI, B. da S; LIMA, I. de M.; COSTA, N. S.; Controle *Meloidogyne* exígua em cafeeiro arábica com uso de bionematicida constituído por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*. XXII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVIII Encontro Latino Americano de Pós- Graduação e VIII Encontro de Iniciação à Docência, 2018, Linhares. Instituto Capixaba de Pesquisa, 2018.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p.553, 1981.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; BRAGA JUNIOR, G. M.; LIMA, C. A.; MARTINS, A. L. L.; SOUZA, M.C.; CHAGAS, L. F. B. *Bacillus subtilis* as a vegetable growth promoter inoculant in soybean. *Diversitas Journal*, 7, 1, 1-16, 2022º.

DE PAULA FILHO, A. C. Utilização de nematicidas biológicos para o controle de nematoide de galhas na cultura da alface. 2021. Dissertação (mestrado em Olericultura) – Instituto Federal Goiano, programa de pós graduação em Olericultura, Morrinho, 2021.

DOMINGUES, Samiele Camargo de Oliveira et al. Microrganismos promotores de crescimento em Alface. *Nativa, Sinop*, v. 9, n. 2, p.100-105, mar./abr.2021.

DOMINGUES, S. C. O.; CARVALHO, M. A. C.; RABELO, H. O.; DAVID, G. Q.; FURINI, T.; BARRADAS, A. C.; JUNIOR, B. H. M. Ação de agentes biológicos no controle de fitonematóides em alface. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, vol. 10, n. 2, p. 157-166, 2022.

EMBRAPA. Manejo de nematoides na cultura da alface. Circular Técnica 124: informação. Brasília: EMBRAPA, 2013. 8 p.

EMBRAPA. Ocorrência e controle de nematoides em hortaliças folhosas. Circular Técnica 89: informação. Brasília: EMBRAPA, 2010. 10 p.

EMBRAPA. Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematóides: Alface/*Meloidogyne* spp. Circular Técnica 27: informação. Brasília: EMBRAPA, 2005. 8 p.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. Pochonia  
Chlamydosporia e Bacillus subtilis no controle de Meloidogyne  
incognita e M. javanica em mudas de tomateiro.  
Bioscience Journal, v. 30, p. 1, p. 34-38, 2014.

FERREIRA, S. Resistência de Cultivares de Feijão e Feijão-Vagem aos  
nematoides das galhas. 2009. 32f. Dissertação de Mestrado (Fitotecnia),  
Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ICHIWAKI, S. Efeitos da inoculação de Enterobacter sp. ICB481 sobre o  
crescimento e acúmulo de proteico em plântulas de cana-de-açúcar  
(Saccharum sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional.  
Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,  
2012.

JUNIOR, A. F. C. et al. Utilização de Bacillus subtilis como promotor de  
crescimento na cultura do tomate e alface. Journal of Biotechnology  
and Biodiversity, v. 11, n. 4, p. 153-159p.100-105.

JUNIOR, Gaspar Moreira Braga. Eficiência de Bacillus subtilis no  
biocontrole de fitopatógenos e promotor de crescimento vegetal. 2015.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do  
Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal,  
Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2015.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach  
as biofertilizers. International Journal of Agronomy, v. 2019: p.1-7, 2019.

KALAM, S.; BASU, A.; PODILE, A. R. Functional and molecular  
characterization of plant growth promoting Bacillus isolates from  
tomato rhizosphere. Heliyon, v. 6, p. e04734, 2020.

LIMA, Inorbert de Melo et al. Bionematicidas contemporâneos: aplicabilidade e importância no manejo de fitonematóides em áreas agrícolas. Incaper em Revista, Vitória, v. 10, p. 90-104, jan./dez. 2019.

LOPES, Elisete Pedreira. Meios de cultura alternativos para rizobactérias e controle biológico de *Meloidogyne javanica* em olerícolas. 2019. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Janaúba, 2019.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. D. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E. D.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. *Oecologia Australis*, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

SAXENA, A. K.; KUMAR, M.; CHAKDAR, H.; ANUROOPA, N.; BAGYARAJ, D. J. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, v. 128, p. 1583-1594, 2019.

SEGATO, S. B.; BETTIO, D. P.; CACEFO, B.; ARAUJO, F. F. Controle Biológico de nematoides em Alface com *Bacillus subtilis*. *Agronomia, Presidente Prudente*, v. 12, n. especial, p. 23-29, 2016.

SILVA, M. DO C. L. DA; SANTOS, C. D. G.; SILVA, G. S. DA. Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. *Ciência agronômica*, v. 47, n. 4, p. 710– 719, 2016.

TONINATO, BO; SOUZA, DHG; PONTALTI, PR; LOPES, APM; DIAS, ARIEIRA. *Meloidogyne javanica* control in lettuce with fertilizers applied isolated or associated with biological product. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 4, p. 384– 389, 2019.

#### FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

## Capítulo 18

### Efeito do tempo de armazenamento da amostra no DNA total do solo

Milenna Oliveira Santiago <sup>1</sup>

Elainy Cristina Alves Martins Oliveira <sup>2</sup>

#### RESUMO

Caracterizado por ser um ecossistema rico em diversidade microbiana, o solo possui grande potencial biotecnológico, visto que os microrganismos desempenham importantes papéis ecológicos no meio ambiente, agindo como exímios indicadores biológicos, especialmente para a agricultura. O processo de extração de DNA é fundamental para essa avaliação, entretanto, enfrenta consideráveis desafios, como a disponibilidade de técnicas moleculares e armazenamento eficaz das amostras. O objetivo deste trabalho foi avaliar se procedimentos de extração de DNA convencionais eram capazes de extrair material genético em quantidades e qualidades pertinentes, bem como, o procedimento por kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®), enquanto analisava-se a estabilidade do material genético presente nas amostras armazenadas a -20°C durante determinado período de tempo. O solo foi coletado na fazenda COBRAPE, no Tocantins, em duas áreas (área com monocultivo de arroz e área de preservação permanente com cerrado nativo) na profundidade 0-10 cm. O material coletado manteve-se armazenado em freezer a -20°C durante todo o período do estudo, sendo retiradas sub-amostras apenas no momento da extração. Os resultados encontrados demonstram uma necessidade de implementação de técnicas de purificação refinadas em protocolos tradicionais, entretanto observou-se que o kit obteve êxito em extrair DNA livre de contaminantes. O resultado obtido sugere que o método de armazenamento escolhido se mostrou satisfatório, uma vez que proporcionou que significativa quantidade de DNA fosse obtida, mesmo após oito meses.

Palavras-chave: Estabilidade de DNA; Extração de DNA; Diversidade Microbiana.

---

<sup>1</sup> Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Pibic/FAPT, Universidade Federal do Tocantins, [milenna.santiago@mail.uft.edu.br](mailto:milenna.santiago@mail.uft.edu.br)

<sup>2</sup> Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, [biocris@mail.uft.edu.br](mailto:biocris@mail.uft.edu.br)



## INTRODUÇÃO

O solo representa um dos ecossistemas microbianos mais ricos em diversidade no mundo, abrigando uma variedade de organismos, tais como bactérias, fungos, arqueias, vírus e protistas. Estudos estimam a presença de 2000 a 8,5 milhões de bactérias em apenas um grama de solo, entre os quais, pode-se destacar gêneros e espécies fundamentais para a manutenção da fertilidade do ambiente (STRELETSKII et al., 2024; CLUTTER, 2021). Essas comunidades microbianas desempenham um papel crucial na promoção da saúde das plantas e na sua resistência a fatores de estresse, como secas, poluição por metais pesados e parasitismo (GREEN; BOHANNAN, 2006; GANS et al., 2005).

É importante ressaltar que as taxas de atividade, biomassa, estrutura da comunidade e diversidade dos microrganismos podem sofrer alterações rápidas, antecipando mudanças nas propriedades físico-químicas do solo, mesmo antes de serem detectadas (SHARMA et al., 2010). Para avaliar os tipos e os níveis de degradação das áreas de cultivo agrícola, é possível realizar comparações da área atual com o estado natural do solo, ou seja, locais que não passaram por algum tipo de modificação antrópica, conseqüentemente, na sua fertilidade. As matas virgens servem como um cenário ideal, já que não passaram por exposição à adubos, agrotóxicos e danos mecânicos, principalmente quando se considera os indicadores biológicos como parâmetro de qualidade (SILVA, et al., 2015).

Como os microrganismos tendem a ser bons indicadores biológicos da saúde do solo, a aplicação de técnicas biotecnológicas permite extrair o material genético presente em determinado local e avaliar a presença ou ausência de algum ser vivo, o que, conseqüentemente, fornece um panorama de como se encontra o ambiente analisado. Apesar do recomendado ser realizar as análises moleculares imediatamente após a coleta do solo, o mais comum é que as amostras sejam armazenadas, refrigeradas, transportadas e, de fato,

analisadas, após algum período de tempo. Os motivos que levam isso a acontecer são os mais diversos, como o tempo de trânsito, a distância entre os locais de coleta e o laboratório, grande volume de amostras e a disponibilidade de mão de obra especializada (LANE, et al., 2022).

Entretanto, estudos voltados para a variável “tempo de armazenamento” de amostras biológicas do solo são escassos, principalmente se for considerado apenas os empregados no bioma Cerrado (ARAGÃO, et al., 2020). Dessa forma, este estudo objetiva avaliar a interferência do tempo de armazenamento na quantidade e qualidade do DNA total extraído de amostras de solo de áreas de cultivo de arroz e de Cerrado nativo submetidas à congelamento em -20°C por diferentes períodos de tempo.

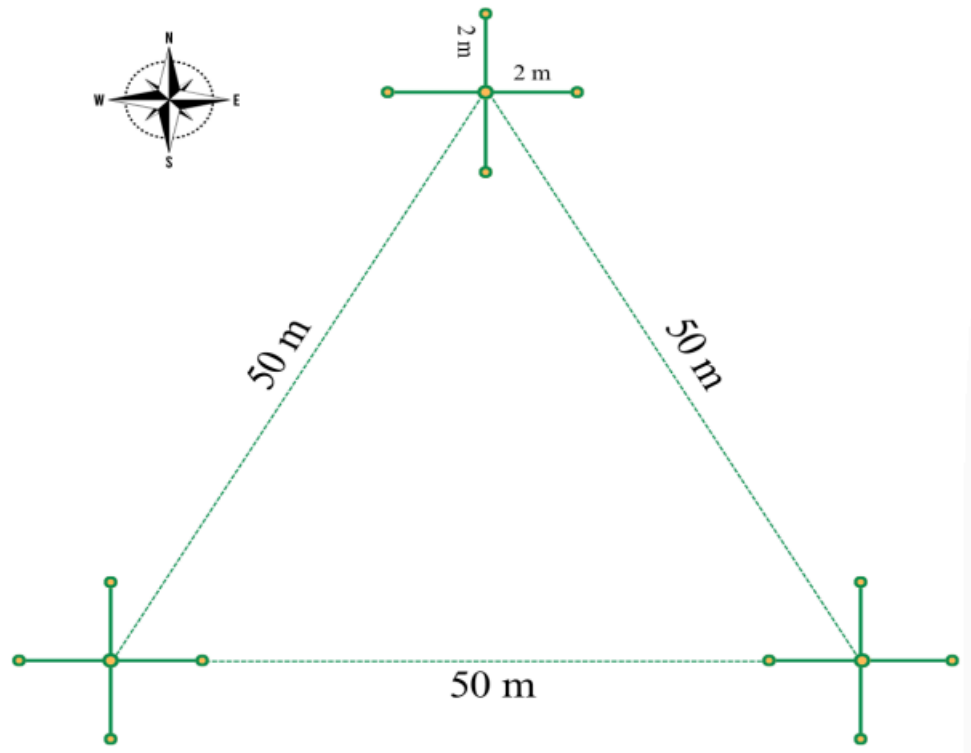
## MÉTODO E MATERIAIS

### Coleta das amostras

A coleta das amostras de solo foi realizada na Fazenda COBRAPE (Companhia Brasileira de Agropecuária), localizada no município de Formoso do Araguaia - TO, reconhecida por plantio de grandes latifúndios há mais de 50 anos. No momento da amostragem (dia 25/11/2023), a área estava com plantio de arroz (*Oryza sativa*). Áreas de Cerrado, paralelas ao plantio, que não foram sujeitas a nenhum tipo de atividade humana, denominadas como “áreas de preservação permanente de Cerrado nativo”, também foram amostradas.

Inicialmente, foi selecionado um ponto aleatório, a partir dele, outros dois pontos foram marcados a uma distância de 50 m, formando um triângulo (figura 01). Em cada ponto foram marcados 5 subpontos (um central e os demais seguindo os pontos cardeais), ambos distantes a 2 m do ponto central, (figura 01). O procedimento foi realizado tanto na área de monocultivo, quanto na área de Cerrado nativo. No total, cada área foi representada por 3 amostras compostas de solo.

Figura 01: Representação gráfica dos pontos de coleta de ambas as áreas analisadas.



Fonte: Autor, 2024

O solo foi coletado na profundidade 0-10 cm em cada um dos pontos marcados. Na coleta, foram utilizados tubos de PVC de 15 cm, previamente esterilizados e sinalizados na marca de 10 cm. Após a coleta, as extremidades dos tubos foram vedadas com fita adesiva, e estes foram colocados em sacos plásticos zip lock esterilizados, para que as amostras não se misturassem durante o processo. As amostras foram imediatamente colocadas em caixas de isopor com gelo e foram transportadas para a Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus Gurupi.

#### Armazenamento e conservação das amostras

Com as amostras no Laboratório de Genética e Bioquímica da UFT, foi realizada a homogeneização das amostras de cada ponto, formando amostras compostas. Após a mistura das cinco amostras

coletadas em cada um dos pontos, obteve-se 3 amostras compostas de solo de cultivo de arroz (AC) e 3 amostras compostas de solo da área de preservação permanente de Cerrado nativo (APP).

Uma parte do solo coletado foi usado nas análises físico-químicas e o restante foi previamente separado em distintos sacos plásticos zip lock, que foram destinados para cada uma das extrações de DNA previstas. As amostras separadas e pesadas foram guardadas em freezer (-20°C). Durante todo o processo de armazenamento não foi observado quedas de energias ou outros fatores que pudessem interferir na integridade do ambiente utilizado. As sub-amostras só foram descongeladas quando da extração de DNA total.

#### Análise físico-química do solo

As amostras foram destinadas para análises físico-químicas do solo na empresa privada Sellar, no município de Gurupi, Tocantins, em 23 de janeiro de 2024. O estabelecimento é um laboratório especializado em análises agrícolas, conveniado ao Programa de Análises de Qualidade de Laboratórios de Fertilidade (PAQLF) da EMBRAPA e ao Instituto Agrônômico.

#### Extração de DNA total do solo

Na extração de DNA foi utilizado o protocolo proposto por Cullen e Hirsch (1998) e modificado por Santos (2002). Consiste em extrair o DNA a partir de 0,3 g de solo. Utilizando esse protocolo como referência, otimizações foram implementadas, a fim de se obter uma quantidade e qualidade razoável de material genético extraído.

A partir das amostras previamente pesadas e alocadas em microtubos, adicionou-se 750 µl de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (120 mM), 75 µl de SDS 10% e 0,5 ml de pérolas de vidro de 0,1 mm de diâmetro. Ao término dessa etapa, deve-se submetê-las por 30 segundos à etapa de bead beater utilizando-se agitador vórtex, seguida centrifugado a 15000 rpm por cinco minutos. Ao sobrenadante que foi coletado,

adicionou-se EDTA pH 8,0 (0,5 M) até a concentração final de 100 mM e acetato de potássio pH 8,0 (5,0 M), para se obter a concentração final de 500 mM. Ao término dessa etapa, o material foi deixado em gelo por 20 minutos foi submetido a uma centrifugação a 15000 rpm por cinco minutos.

Realizou-se uma nova coleta do sobrenadante e adicionou-se um volume de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (120 mM) contendo 4% de CTAB, o material foi submetido a uma agitação em shaker de 30 minutos para precipitar ácidos húmicos e fúlvicos, seguida de uma centrifugação de 15000 rpm por cinco minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se um volume de isopropanol, seguido, imediatamente, de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 80%, com posterior secagem. O DNA foi ressuspendido em 100 µl de tampão TE e estocado a -20 °C.

A partir deste protocolo, foram realizadas 3 modificações, objetivando uma melhoria nos resultados. Os protocolos modificados encontram-se descritos no material em anexo. Para as modificações, foi consultada a literatura disponível quanto a este tipo de análise, levando-se também em consideração as características físico-químicas e geomorfológicas do solo utilizado.

Houve, ainda, uma extração utilizando-se o kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica - RUO (Nova Biotecnologia ®). A partir de 0,5g de cada amostra de solo, decorreu a extração, conforme as recomendações do fabricante. Todos os procedimentos utilizados encontram-se esquematizados nas figuras 05, 06, 07, 08 e 09, presentes no anexo.

#### Qualificação do DNA

Como forma de avaliar a qualidade do DNA extraído, optou-se por realizar o procedimento de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) contendo 5 µL brometo de etídio. O tampão para eletroforese foi adicionado na cuba e, por fim, com 5 µL das amostras, conjunto a 2 µL

de load (KASVI Supplied in 6x Loading Buffer), de modo que nos primeiros poços fossem colocados o marcador, para que nos seguintes fossem adicionados o DNA a ser analisado. As imagens do gel foram visualizadas sob luz ultravioleta, com o auxílio de fotodocumentador.

#### Quantificação do DNA

Para avaliar a quantidade de DNA obtido da extração, foi empregado o espectrofotômetro para microvolumes BioDrop para realizar a leitura das absorbâncias a 230 nm (A230), a 260 nm (A260), a 280 nm (A280), da razão A260/A280, para avaliar a pureza do material genético em relação a proteínas e, por fim, da razão A260/230, para avaliar a pureza do DNA em relação às substâncias húmicas. A concentração (em ng/ $\mu$ l) de material genético em cada uma das amostras também foi quantificado.

#### DADOS E DISCUSSÃO

##### Análise físico-química do solo

Os resultados obtidos da análise físico-química encontram-se disponíveis na tabela 1.

Tabela 01: Análise química dos solos

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Tabela 01: Análise química dos solos

Determinação	Unidade	AC	APP
pH CaCl <sub>2</sub>	-	4,8	4,8
P meh	mg.dm <sup>-3</sup>	25,2	5,9
S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>		35	9
K		105	82
K	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	0,27	0,21
Ca		3,7	1,8
Mg		1,5	1,0
Al		0,50	0,80
H+Al		3,40	3,80
M.O.	dag.kg <sup>-1</sup>	2,8	1,7
C.O.		1,6	1,0
B	mg.dm <sup>-3</sup>	0,30	0,38
Cu		2,5	1,2
Fe		198	137
Mn		9,9	11,1
Zn		2,5	1,1
SB	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>	5,47	3,01
CTC <sub>i</sub>		8,87	6,81
V	%	62	44
m		8	21
Ca/T		42	26
Mg/T		17	15
K/T		3	3
Ca/Mg	-	2,5	1,8
Ca/K	-	13,7	8,6
Mg/ K	-	5,6	4,8

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

AC: Solo de cultivo de arroz; APP: Solo da área de preservação permanente de Cerrado nativo; Observações: CTCt: Capacidade de troca catiônica total; SB: Soma de bases trocáveis; M.O.: Matéria Orgânica; C.O.: Carbono Orgânico total; V% = Saturações por Bases; m% = Saturações por Alumínio. Fonte: Laboratório Sellar, 2024.

Observa-se que certos íons estão em maiores quantidades nos locais de lavoura, como o cálcio, magnésio e o potássio (Tabela 01), o que pode ser explicado pelas aplicações de minerais em solos do Cerrado, visando correção dos característicos solos ácidos e uma melhora na nutrição das plantas (LOPES; GUIMARÃES, 2016; FAGEIRA; ORLANDO, 1987).

Os dados para matéria orgânica (M.O) e carbono orgânico (C.O) também demonstraram valores relativamente maiores para a AC do que para APP, isso porque há reposições artificiais de material orgânico, além de restos culturais da vegetação e do sistema radicular de plantas (AGNE; KLEIN, 2014).

Conforme especificado na Instrução Normativa SPA/MAPA Nº 2 de 09 de novembro de 2021, os solos obtidos podem ser classificados por meio de análises granulométricas avaliando as quantidades de argila, areia e de silte em amostras representativas de uma área. Para a área de cultivo, classificou-se as amostras como tipo 3, o que significa que a textura é argilosa e o teor de argila estava maior ou igual a 35% (Tabela 02). As amostras da área de Cerrado nativo possuem textura média, o que significa que possuíam um teor de argila entre 15 e 35% e por isso, classifica-se como solo do tipo 2.

Tabela 02: Análise Granulométrica (física) dos solos



## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Determinação	Unidade	AC	APP
Argila	(g.Kg <sup>-1</sup> )	550	275
Silte		75	50
Areia Total		375	675
Classificação		Argilosa	Média
Tipo de Solo (MAPA)		3	2

Fonte: Laboratório Sellar, 2024

### Extração de DNA total do solo

No presente trabalho, foram efetuadas 4 extrações de DNA de solo, em quatro momentos diferentes, justamente para avaliar a influencia do tempo de armazenamento na qualidade do DNA extraído. Todas as amostras seguiam armazenadas a -20°C e só eram descongeladas no momento da extração. A primeira extração foi realizada no mês de janeiro/24 e a segunda em abril/24, ambas em triplicatas e com o protocolo proposto. A terceira extração ocorreu em junho/24, igualmente em triplicatas, porém, com adaptações inclusas, enquanto a última foi realizada em julho/24, com o uso de kit comercial e amostras em duplicatas.

A partir das amostras de DNA obtidas, foi possível realizar a quantificação e a qualificação do material genético. Entretanto, todos os procedimentos que fizeram o uso do protocolo de bancada foram insatisfatórios, pois não foi possível visualizar bandas de DNA nas eletroforeses realizadas (Figura 2), sendo possível visualizar apenas um arrasto. As imagens dos demais géis de agarose encontram-se disponíveis no material em anexo.

Figura 02: Eletroforese realizada com DNA das amostras de AC e APP.



M: marcador; 1-9: amostras de AC; 10-18: amostras de APP. Fonte: Autor, 2024

Como esse comportamento foi igual para as amostras de áreas de monocultivo (AC) e áreas de preservação permanente (APP), a principal hipótese proposta foi de que essa deficiência poderia estar relacionada às etapas de purificação do material genético obtido, visto que ambos os locais contavam com um alto teor de matéria orgânica (M.O) e carbono orgânico (C.O), os quais são os principais contaminantes deste tipo de análise, pois configuram as chamadas “substâncias húmicas” (SH). Em muitos casos, é visto que parte de SH são co-extraídas com DNA, que, por sua vez, interfere na detecção, medição e purificação do material genético (ISLAM et al., 2012; ROOSE-AMSALEG et al., 2001; GU et al., 2005).

Quando não se obtém uma quantidade e qualidade significativas e visíveis, as amostras devem ser descartadas, pois, de toda forma, não se encontram adequadas para serem empregadas em etapas posteriores, como a amplificação por PCR (GLICK; PASTERNAK, 1994; SAMBROOK; RUSSEL, 2001; SARTORETTO; FARIAS, 2010). Para mais,

conforme mencionado por He, (2005), as substâncias húmicas costumam absorver luz na faixa de A230, entretanto, podem, também, absorver luz na faixa de A260, portanto, para evitar possíveis mascaramento de resultados, é recomendado que a eletroforese seja realizada de forma rigorosa e apresente bandas únicas e com alto teor de pureza (sem solução de arraste).

Em seu estudo Islam et al., (2012) realizaram extrações diretas de DNA de solos com cultivos de arroz. Foram utilizados variados protocolos divergentes entre si, entretanto, independentemente do método escolhido, os autores observaram a necessidade de realizar, posteriormente, processos de purificação do material genético, especialmente com o auxílio de kits comerciais. Porém, ressaltam que cada solo possui um perfil genético único e que cada pesquisador possui seus próprios objetivos e, por isso, é necessário que combinações e modificações sejam realizadas, a fim de conquistar um resultado confiável e alinhado com as expectativas do projeto.

Por outro lado, o protocolo realizado com kit comercial apresentou êxito, ainda que as amostras estivessem armazenadas a -20°C por cerca de 8 meses. Na eletroforese (Figura 03) foi possível visualizar bandas uniformes, íntegras, consideravelmente espessas e com um bom grau de pureza, já que não foi observado o arraste da solução. Aliado aos dados obtidos na quantificação, conclui-se que as amostras possuem uma quantidade relativamente baixa de contaminantes. A extração usando o kit foi feita em duplicata.

Figura 03: Eletroforese realizada com DNA bruto extraído pelo kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®) das amostras de AC e de APP.



M: marcador; 1-6: amostras de APP; 7-12: amostras de AC. Fonte: Autor, 2024

Conforme Cullen e Hirsch (1998), autores do protocolo selecionado, para avaliar a pureza do DNA obtido e mensurar a contaminação por ácidos húmicos e proteínas do solo utilizado, é possível aplicar a relação  $A_{260}/A_{230} > 1,7$ , para as substâncias húmicas e a relação  $A_{260}/A_{280} > 2,0$ , para as substâncias proteicas.

Em conformidade aos dados apresentados na tabela 03, majoritariamente, as amostras obtiveram valores próximos ao recomendado pela literatura, quanto a relação  $A_{260}/A_{230}$ , indicando que o kit obteve êxito em extrair DNA, consideravelmente, livre de substâncias húmicas. Já para proteínas, observa-se que apesar da maior parte das amostras possuírem valores próximos a 2, esse parâmetro não é ultrapassado, indicando que, por mais que o kit seja eficiente para eliminar substâncias húmicas, a eficiência para proteínas é parcialmente menor. Para o kit, optou-se por realizar o procedimento em duplicatas.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

Tabela 03: Medidas de pureza (relações A260/A280 e A260/A230) por espectrofotômetro para microvolumes BioDrop do DNA extraído pelo kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®) das amostras de AC e de APP.

Amostra	A <sub>260/230</sub>	A <sub>260/280</sub>
01 <sup>1</sup>	1.640	1.640
02 <sup>1</sup>	-2.106	1.831
03 <sup>1</sup>	-8.000	1.846
04 <sup>1</sup>	-1.701	1.955
05 <sup>1</sup>	12.141	1.792
06 <sup>1</sup>	1.252	2.060
07 <sup>2</sup>	6.016	1.801
08 <sup>2</sup>	2.677	1.913
09 <sup>2</sup>	2.705	1.854
10 <sup>2</sup>	1.563	1.747
11 <sup>2</sup>	0.805	1.860
12 <sup>2</sup>	1.810	1.810

<sup>1</sup>:Área de preservação permanente; <sup>2</sup>:Área com cultivo. **Fonte:** Autor, 2024

A principal vantagem de utilizar o kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica consiste no fato das próprias colunas de sílica serem eficientes meios de purificação de material genético. Portanto, é possível afirmar que apesar de terem sido utilizadas as mesmas amostras de solo (tanto AC, quanto APP), pelo kit possuir uma técnica de purificação otimizada, apresentou grande êxito ao eliminar, consideravelmente, as substâncias húmicas presentes nas amostras, ao passo que os protocolos de extração de DNA convencionais não possuíam a mesma eficiência. Logo, o material obtido através do kit encontra-se apto para ser utilizado em etapas posteriores, como a amplificação por PCR.

Comparativamente a outros estudos que realizaram extrações de DNA de solo (SOLIMAN et al., 2017; ZIELIŃSKA et al., 2017; ROSA, 2006; CHAUHAN et al., 2024), a quantidade de material genético obtida no

presente estudo (tabela 04), mostra-se equivalente, ainda que as amostras de solo utilizadas encontravam-se armazenadas a -20°C pelo período aproximado de 8 meses. Portanto, demonstra-se que o método selecionado para armazenar o material coletado é eficiente e não possui grandes impactos na qualidade e na quantidade de DNA que pode ser obtido.

Tabela 04: Quantificação por espectrofotômetro para microvolumes BioDrop do DNA extraído pelo kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®) das amostras de AC e de APP.

Amostra	Concentração de DNA (ug/ml)
01 <sup>1</sup>	30.75
02 <sup>1</sup>	17.63
03 <sup>1</sup>	24.00
04 <sup>1</sup>	16.37
05 <sup>1</sup>	29.42
06 <sup>1</sup>	44.70
07 <sup>2</sup>	35.98
08 <sup>2</sup>	33.52
09 <sup>2</sup>	41.24
10 <sup>2</sup>	44.43
11 <sup>2</sup>	45.41
12 <sup>2</sup>	42.45

<sup>1</sup>:Área de preservação permanente; <sup>2</sup>:Área com cultivo. **Fonte:** Autor, 2024

Stieven et al., (2015) avaliou a estabilidade do DNA presente em suas amostras de solo armazenadas a -20°C durante o período de 2 (dois) anos e 6 (seis) meses. É demonstrado que ao final do experimento, o material genético encontrava-se altamente degradado e seu uso não era indicado para posteriores análises moleculares. Entretanto, as amostras armazenadas por um período de tempo menor a 2 anos, como as de 1 (um) ano possuíam maior quantidade de amostra de DNA e eram claramente visualizadas em gel de eletroforese.

Para o período de 50 (cinquenta) dias de armazenamento a -20°C, Brock et al., (2024) concluíram que ao manter o solo peneirado a -20°C, não houveram alterações na riqueza de espécies presentes na amostra, quando comparado a outros métodos de controle. Logo, realizar esse tipo de armazenamento proporciona a possibilidade de experimentação repetida a longo prazo, de forma que as comunidades microbianas se mantenham fisiologicamente ativas preservadas.

Entretanto, apesar de ser uma ótima opção para armazenar amostras, o mais recomendado é que as análises moleculares sejam feitas imediatamente após a coleta ou em um curto período posterior a amostragem. Isso porque algumas comunidades de microrganismos são mais sensíveis e podem ser degradadas mais rapidamente, ou ainda, táxons específicos podem se desenvolver, enquanto inibem o crescimento de outras espécies, o que, por sua vez, pode mascarar os resultados obtidos em sequenciamentos genéticos (AMIR et al., 2017).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos é possível perceber a necessidade de técnicas refinadas para purificação de DNA de solo, especialmente quanto a substâncias húmicas e proteínas, que possam ser implementadas em protocolos de extração de DNA tradicionais. Em contrapartida, percebe-se que os kits comerciais têm ganhado elevado destaque, principalmente por serem capazes de solucionar a adversidade de co-extração de substâncias húmicas e material

genético, ofertando um DNA purificado e qualificado para etapas posteriores de análises moleculares.

O kit selecionado para o presente estudo foi capaz de extrair considerável quantidade de material genético, em qualidade pertinente, de uma amostra de solo armazenada a -20°C durante sete meses, tanto para o solo de áreas com monocultivo de arroz (*Oryza sativa*), quanto para o solo de preservação permanente de Cerrado nativo. O tipo de armazenamento selecionado mostrou-se eficiente, visto que foi capaz de manter estável as comunidades microbianas presentes no solo, sem causar elevada degradação de seu DNA, mantendo, também, as principais características visuais do solo, como textura e cor. Além disso, o método para armazenamento selecionado é relativamente simples e pode ser empregado em grande parte dos laboratórios que realizam procedimentos moleculares. Contudo, seria interessante avaliar a estabilidade do material genético de amostras do solo de Cerrado durante um intervalo de tempo maior, uma vez que as quantidades de estudos referentes a esse tópico são escassas.

## REFERÊNCIAS

AGNE, S. A.; KLEIN, V. A. Matéria orgânica e atributos físicos de um Latossolo Vermelho após aplicações de dejetos de suínos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, p. 720-726, julho, 2014.

AMIR, A.; MCDONALD, D.; NAVAS-MOLINA, J. A.; KOPYLOVA, E., MORTON, J. T.; XU, Z. Z., et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. *Journal American Society for Microbiology*, v. 2, n. 2, março, 2017.

ARAGÃO, O. O. S.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. O.; SOUZA A. A.; JESUS, E. C.; MERLO; M. N.; OLIVEIRA, E. P.; MOREIRA, F. M. S. The Effectiveness of a Microbiological Attribute as a Soil Quality Indicator Depends on the



Storage Time of the Sample. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 20, p. 2525-2535, outubro, 2020.

BROCK, M.T.; MORRISON H. G.; MAIGNIEN, L.; WEINIG, C. Impacts of sample handling and storage conditions on archiving physiologically active soil microbial communities. *FEMS Microbiology Letters*, v. 371, junho 2024.

CHAUHAN, G.; ARYA, M.; KUMAR, V.; VERMA, D.; SHARMA, M. An improved protocol for metagenomic DNA isolation from low microbial biomass alkaline hot-spring sediments and soil samples. *3 Biotech*, v. 14, janeiro, 2024.

CULLEN, D. W.; HIRSCH, P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 30, n. 8, p. 983-993, 1998.

DEFOREST, J. L.; The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and l-DOPA. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 1180-1186, junho, 2009.

FAGERIA, N. K.; ORLANDO, P. M. Avaliação de cultivares de arroz na utilização de cálcio e magnésio em solo de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 22, p. 667-672, julho 1987.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, v. 309, p.1387-1390, agosto, 2005.

GLICK, B.R.; PARSTERNAK, J., J. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3 ed. United States: Universities Press Channarayappa, 1994, p. 1217.

GREEN, J.; BOHANNAN, J. M. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 21, p. 502-507, setembro, 2006.

GU Y.; ZHONG X. The Implementation of Mobile IP in Hopen System. *Embedded Software and Systems*, v. 3605, p. 300-305, 2005.

HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, n. 12, p. 2337-2341, 2005.

HERNANDEZ, J. A. C.; RIBEIRO, H. M.; BAYNE, E.; MACKENZIE, M. D.; LANOIL, B.D.

Impact of stockpile depth and storage time on soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, v. 196, abril, 2024.

ISLAM, M. R.; SULTANA T.; JOE M. M.; CHO J. C.; SA T. Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 19, p. 337-342, julho, 2012.

LANE, J. M.; DELAVALUX, C. S.; KOPPEN, L. V.; LU, P.; CADE-MENUN, B.J.; TREMBLY, J.; BAINARD, L.D. Soil sample storage conditions impact extracellular enzyme activity and bacterial amplicon diversity metrics in a semi-arid ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 175, dezembro, 2022.

LEE, Y. B.; LORENZ, N.; DICK, L. K.; DICK, R. P. Cold Storage and Pretreatment Incubation Effects on Soil Microbial Properties. *Soil Science Society of America Journal*, v. 71, p. 1299-1305, julho, 2007.

LOPES, A. S; GUIMARÃES, L. R. G. A career perspective on soil management in the Cerrado Region of Brazil. *Advances in Agronomy*, v. 137, p. 1-72, 2016.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SPA/MAPA nº 2: Especificações dos tipos de solos adotados no Zoneamento Agrícola de Risco

Climático – ZARC. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 nov. 2021. Disponível em:

<https://in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-spa/mapa-n-2-de-9-de-novembro-de-2021-359074246>. Acesso em: (01 de março de 2024).

PEOPLES, M. S.; KOIDE, R. T. Considerations in the storage of soil samples for enzyme activity analysis. *Applied Soil Ecology*, v. 62, p. 98-102, novembro, 2012.

ROSA, Márcia Maria. Avaliação de diferentes metodologias para extração de DNA de solo sob cultivo de cana-de-açúcar. 2006. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Rio Claro, 2006.

ROOSE-AMSALEG C. L.; SILLAM E. G.; HARRY M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, v. 18, p. 47-60, setembro, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a Laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 800.

SANTOS, S. T. Comparação de métodos de extração de DNA de solo para estudos de diversidade microbiana por técnicas moleculares. 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. *Unoesc e Ciência*, v. 1, n. 2, p. 155-162, março, 2010.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

SILVA, G. F; SANTOS, D; SILVA, A. P; SOUZA J. M. et al. Indicadores de Qualidade do Solo sob diferentes sistemas de uso na Mesorregião do Agreste Paraibano. Revista Caatinga, v. 28, n. 3, p. 25-35, setembro, 2015.

SOLIMAN, T.; YANG S. Y.; YAMAZAKI T.; KODOMA H. J. Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: the influence of DNA kit selection and technician technical expertise. PeerJ, v. 5, julho, 2017.

STIEVEN, A. C.; OLIVEIRA, D. A.; COUTO, E. G., CAMPOS, D. T. S. DNA total do solo: efeitos do armazenamento e conservação das amostras. Scientia Amazonia, v. 4, n. 2, p. 114-124, 2015.

STRELETSKII, R. A.; ASTAYKINA, A. A.; BELOV, A. A.; CHEPTSOV, V. S.; VETROVA, A. A. Beneficial soil microorganisms and their role in sustainable agriculture. Sustainable Agricultural Practices: Plant and Soil Microbiome, v. 1, cap. 14, p. 293-333, 224.

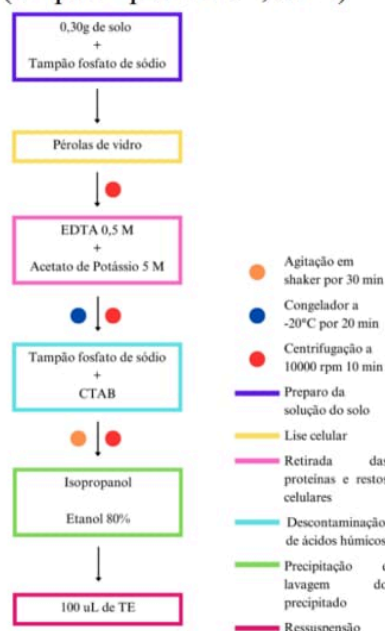
ZIELIŃSKA, S.; RADKOWSKI, P.; BLENDOWSKA, A.; GALEZOWSKA, A. L.; LOS, J. M.; LOS, M. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. Microbiology Open, v. 6, agosto, 2017.

### FINANCIAMENTO

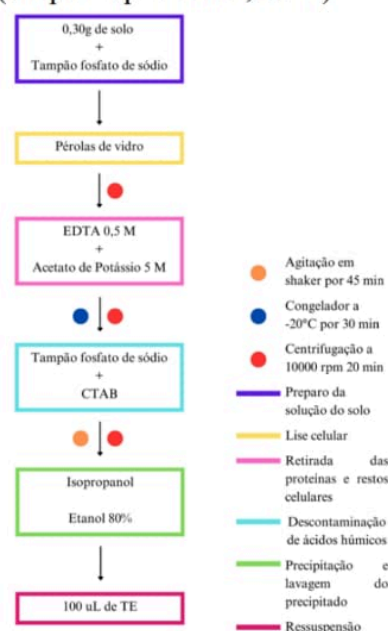
O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins - FAPT

### ANEXO

**Figura 04:** Fluxograma geral da técnica de CUL (adaptada por Santos, 2002)

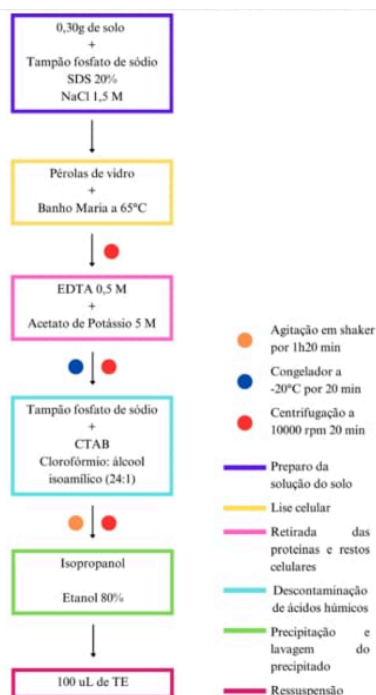


**Figura 05:** Fluxograma geral da técnica de CUL (adaptada por Autor, 2024)

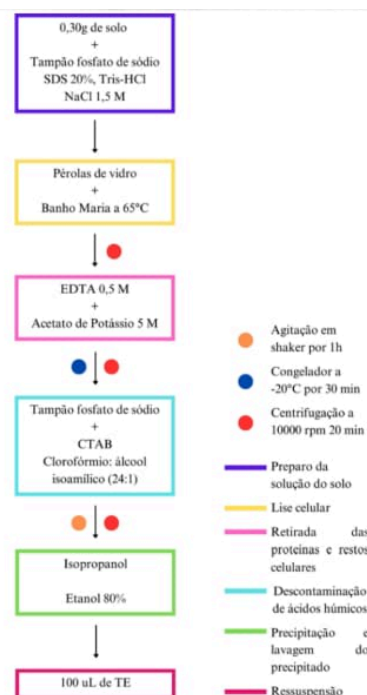


Fonte: Autor, 2024

**Figura 06:** Fluxograma geral da técnica de CUL (adaptada por Autor, 2024)



**Figura 07:** Fluxograma geral da técnica de CUL (adaptada por Autor, 2024)



Fonte: Autor, 2024

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

**Figura 08:** Fluxograma geral do protocolo do kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®)



**Fonte:** Autor, 2024

## Tabelas dos resultados

**Tabela 05:** Localização geográfica dos pontos de coleta

Pontos AC <sup>1</sup>	L.G. <sup>2</sup>
Ponto 1	-11,429794, -49,93161
Ponto 2	-11,430229, -49,937129
Ponto 3	-11,429855, -49,936863
Pontos APP <sup>3</sup>	L.G.
Ponto 1	-11,42819, -49,932636
Ponto 2	-11,428162, -49,933071
Ponto 3	-11,42794, -49,932587

<sup>1</sup>:Área com cultivo; <sup>2</sup>:Localização geográfica dos pontos; <sup>3</sup>:Área de Preservação Permanente.

# HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

**Tabela 06:** Medida das absorbâncias obtidas a A230, A260 e A280. por espectrofotômetro para microvolumes *BioDrop* do DNA extraído pelo kit para extração e purificação de DNA de solo com colunas de sílica – RUO (Nova Biotecnologia ®) das amostras de AC e de APP.

Amostra	A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>
01 <sup>1</sup>	0.123	0.135	0.123
02 <sup>1</sup>	0.025	0.051	0.043
03 <sup>1</sup>	0.025	0.052	0.041
04 <sup>1</sup>	0.004	0.030	0.022
05 <sup>1</sup>	0.037	0.064	0.051
06 <sup>1</sup>	0.130	0.139	0.116
07 <sup>2</sup>	0.054	0.084	0.068
08 <sup>2</sup>	0.063	0.084	0.068
09 <sup>2</sup>	0.086	0.112	0.093
10 <sup>2</sup>	0.086	0.102	0.083
11 <sup>2</sup>	0.116	0.105	0.084
12 <sup>2</sup>	0,080	0,099	0,080

Fonte: Autor, 2024

<sup>1</sup>:Área de preservação permanente; <sup>2</sup>:Área com cultivo;



Fonte: Google Earth, 2024

**Figura 11:** Amostra de solo AC.

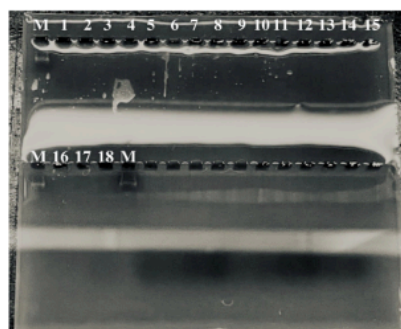


**Figura 12:** Armazenamento das amostras.



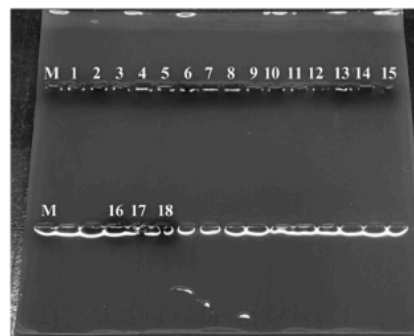
Fonte: Autor, 2023

**Figura 13:** Eletroforese realizada com DNA bruto extraído pelo protocolo de CUL (Adaptado por Santos, 2002) das amostras de AC e de APP.



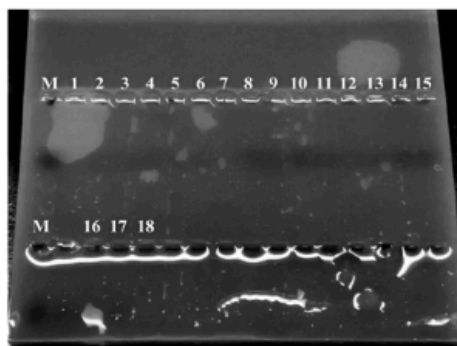
M:marcador; 1-9: amostras de AC; 10-18: amostras de APP. Fonte: Autor, 2024

**Figura 14:** Eletroforese realizada com DNA bruto extraído pelo protocolo de CUL (Adaptado por Autor, 2024) das amostras de AC e de APP.



M:marcador; 1-9: amostras de AC; 10-18: amostras de APP. Fonte: Autor, 2024

**Figura 15:** Eletroforese realizada com DNA bruto extraído pelo protocolo de CUL (Adaptado por Autor, 2024) das amostras de AC e de APP.



M:marcador; 1-9: amostras de APP; 10-18: amostras de AC. Fonte: Autor, 2024

**Figura 16:** Resumo gráfico das principais etapas do trabalho realizado.



Fonte: Autor, 2024



## Sobre os organizadores

### THIAGO NILTON ALVES PEREIRA

Possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado e Licenciatura) pela Universidade Federal do Tocantins (2007), mestrado (2010) em Ciências Biológicas, área de concentração em Zoologia pela Universidade Estadual de São Paulo "Julio de Mesquita Filho", câmpus Botucatu (2010) e doutorado (2014) em Ciências, área de concentração em Biologia Comparada pela Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Zoologia, com ênfase em sistemática e taxonomia de grupos recentes, com ênfase em peixes, além de estudos comparativos da anatomia do Sistema Nervoso Central. Atualmente, é Professor Adjunto III do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Tocantins e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação. Atualmente é Diretor de Pesquisa junto à PROPESQ na UFT.

### RUHENA KELBER ABRÃO

Professor Adjunto IV na Universidade Federal do Tocantins (UFT), Coordenador e Professor do Mestrado Profissional em Educação Física e do Doutorado em Educação na Amazônia. Coordena o Centro de Formação, Extensão, Inovação e Pesquisa em Educação, Lazer e Saúde (CEPELS) e atua como Presidente da Editora Universitária da UFT (EdUFT). Possui 12 anos de experiência na Educação Básica antes de ingressar no Ensino Superior em 2008. Atua nas áreas de docência e gestão com foco na Educação e Saúde e Lazer.

### JOSÉ DE OLIVEIRA MELO NETO

Professor adjunto da Universidade Federal do Tocantins no campus de Gurupi vinculado ao curso de graduação em Engenharia Florestal. Graduado em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Sergipe, mestre e doutor em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas pela Universidade Federal de Lavras, Pós-doutor pela universidade Federal de Alfenas - Campus Poços de Caldas, atuando principalmente nos seguintes temas: modelagem hidrológica e ambiental, hidrometeorologia, hidrologia florestal, gestão de bacias hidrográficas, hidrossedimentologia, manejo de solo e uso de geotecnologias na área florestal. Atualmente também é coordenador institucional do PIBIC na UFT.

## HORIZONTES CIENTÍFICOS DA UFT: REFLEXÕES DO XX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (PIBIC)

---

### VÂNIA DE PAULA NEVES

Graduada em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual do Tocantins (UNITINS), atuou no desenvolvimento de pesquisas na área de tecnologia e processamentos de alimentos no laboratório da UNITINS, com vínculo de estágio. Realizou pesquisas de ensino e extensão na área de manejo e controle de plantas daninhas, relacionados ao herbicida glyphosate. Atualmente assessora técnica junto a Diretoria de Pesquisa.

### LÚCIA MORAES E SILVA

Estudante de Jornalismo na UFT. Presidente da Sagaz Jr (Empresa Júnior de Jornalismo). Estagiária na Editora da Universidade Federal do Tocantins.

### ANA JÚLIA CAMPOS VIEIRA

Estudante de Ciência da Computação na UFT. Diretora de Assuntos Estudantis do Centro Acadêmico de Ciência da Computação. Estagiária na Diretoria de Pesquisa na Universidade Federal do Tocantins.

