

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS
PECTINOLÍTICAS E SELETIVIDADE DE
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE O
AGENTE BIOLÓGICO “G088”**

ALISSON GONÇALVES MENESES

2007

ALISSON GONÇALVES MENESES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SELETIVIDADE DE
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE O AGENTE BIOLÓGICO
“G088”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Profª. Dra. Sára Maria Chalfoun

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

ALISSON GONÇALVES MENESES

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E SELETIVIDADE DE
PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS SOBRE O AGENTE BIOLÓGICO
“G088”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 30 de março de 2007

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

UFLA

Profa.Dra. Maria Emília de S. Gomes Pimenta

EPAMIG

Profa. Dra. Sara Maria Chalfoun
EPAMIG/UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Meneses, Alisson Gonçalves

Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico “G088” / Alisson Gonçalves Meneses. -- Lavras : UFLA, 2007.

96 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Sára Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Enzimas pectinolíticas. 2. Seletividade. 3. Poligalacturonase. 4. Agrotóxicos.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-574.1925
-576.163

OFEREÇO

Aos meus pais e irmãos, que são a base de uma família sólida e unida. A toda a minha família, pelo apoio e consideração nos momentos difíceis pelos quais passei nesta jornada. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho, direta ou indiretamente.

DEDICO

A “todos” os laboratoristas, professores, funcionários e amigos que, de alguma forma, me apoiaram e incentivaram nesta conquista, sendo de alguma forma incentivo para esta grandiosa vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, pela consagração, suas bênçãos, proteção e sabedoria neste momento.

A professora Sara Maria Chalfoun, pela orientação, sinceridade, amizade, liberdade e confiança durante o mestrado.

A Maria Emília de Sousa Gomes Pimenta, pelo apoio, orientação desde outros tempos, amizade, crescimento profissional, confiança e companheirismo dedicados, por todos estes anos de estudos.

Ao professor Dr. Carlos José Pimenta, por toda ajuda e atenção.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela formação acadêmica e apoio.

Às laboratoristas Vicentina, Tina, Creusa e Sandra que, a seu modo, me auxiliaram e me deram a oportunidade de aprender, errar e crescer nestes anos.

Aos “amigos” e familiares, em especial a Priscilla, Caroline, Geni, Sabrina, Livia e Marcelo, pelo grande auxílio e dedicação durante a condução do experimento e pela valiosa amizade, que contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente aos “amigos”.

Aos funcionários das secretarias de pós-graduação e de graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela paciência e amizade, e aos funcionários responsáveis que, nos momentos mais difíceis, se tornaram, além de companheiros de trabalho, amigos valiosos. Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos do DCA/UFLA, pelo companheirismo e pela colaboração nas análises químicas e bioquímicas.

Agradeço em especial aos funcionários da EPAMIG-CTSM, pelo apoio e orientação nestes anos, por meio do qual pude aprender a ser mais profissional e responsável nas minhas obrigações.

Em especial, às pessoas que passaram pela minha vida, nestes anos e que de, alguma forma, me ajudaram a enxergar novos valores, que muito me ensinaram, não só a respeito da vida profissional, mas acrescentaram muito a minha vida pessoal, por onde vou, levando dentro do peito as marcas de cada um.

BIOGRAFIA

Alisson Gonçalves Meneses, filho de Antonio Pedro de Meneses Filho e Amaziles Maria de Gonçalves Meneses, nasceu em Sete Lagoas, MG.

Em fevereiro de 2001, ingressou na Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, onde, em dezembro de 2004, obteve o título de Zootecnista.

Em março de 2005, iniciou a Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Lavras, tendo concentrado seus estudos na área de Microbiologia.

Em 30 de março de 2007, submeteu-se à defesa de dissertação para a obtenção do título de “Mestre”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	5
REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1.Caracterização de microrganismos utilizados como agentes de bioproteção e como produtores de enzimas.....	6
2.2.Substâncias pécnicas.....	6
2.3. Enzimas pectinolíticas.....	9
2.3.1. Pectina metil esterase (PME).....	12
2.3.2.Poligalacturonase (PG).....	13
2.3.3.Exo poligalacturonase.....	15
2.4. Fungos.....	15
2.5. Produção de enzimas pectinolíticas por fungos.....	17
2.6. Aspergillus, Seção Nigri.....	19
2.7. Rhizopus sp.....	20
2.8. Condições de cultivo.....	21
2.9. Fermentação em estado sólido.....	26
2.10. Seletividade de produtos ao agente biológico "G088".....	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2.....	41
EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS PÉCNICAS PELO AGENTE BIOLÓGICO 088".....	41
RESUMO.....	42

ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Índice de velocidade de crescimento micelial.....	45
2.2 Metodologia analítica.....	47
2.3 Condições de cultivo.....	47
2.4 Inóculo no meio de cultivo.....	48
2.5. Pectinametilesterase.....	49
2.5.1 Obtenção do extrato enzimático da pectinametilesterase.....	49
2.5.1.2 Atividade da pectinametilesterase.....	49
2.5.2 Poligalacturonase.....	49
2.5.2.1 Obtenção do extrato enzimático da poligalacturonase.....	49
2.5.2.2 Atividade da poligalacturonase.....	49
2.6. Microrganismos utilizados.....	50
2.6.1 Agente biológico "G088".....	50
2.6.2 <i>Aspergillus niger</i>	51
2.6.3 <i>Rhizopus</i> sp.	51
2.7. Condições de cultivo.....	51
2.8. Inóculo no meio de cultivo.....	52
2.9. Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG).....	53
2.10. Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME).....	54
2.11 Delineamento experimental.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM).....	57
5.2 Atividade enzimática dos isolados de diferentes regiões.....	61
5.3 Crescimento das culturas, tempo de cultivo e produção de pectinases pelo agente biológico G088 e outros microrganismos utilizados comercialmente.....	62
6 CONCLUSÕES.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

CAPÍTULO 3.....	75
SELETIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS AO AGENTE BIOLÓGICO "G088".....	75
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	77
1 INTRODUÇÃO.....	78
2 MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 Delineamento experimental.....	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 Avaliação do crescimento vegetativo (IVCM) a produtos fitossanitários do agente biológico "G088".....	84
3.2. Avaliação da porcentagem de inibição a produtos fitossanitários do agente biológico "G088".....	86
4 CONCLUSÃO.....	90
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7 ANEXOS.....	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Identificação dos isolados quanto à origem (Três Pontas, Lavras e Patrocínio), sistema de cultivo (Irrigado, Não Irrigado e Orgânico). (Lavras-MG 2007).	46
TABELA 2 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de diferentes regiões (Lavras, Três Pontas e Patrocínio).	57
TABELA 3 Atividades médias de PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) dos isolados de diferentes regiões	62
TABELA 4 Atividade média de PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) dos três microrganismos, nos diferentes tempos de cultivo.	63
TABELA 5 Produtos fitossanitários químicos em sua maioria registrados para a cultura do café utilizados nos testes de seletividade	82
TABELA 6 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários	85
TABELA 7 Índices de % de inibição do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários	87
TABELA 8 Resumo da Análise de Variância dos resultados do Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de diferentes regiões... ..	94
TABELA 9 Resumo da Análise de Variância dos resultados do Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários.....	94
TABELA 10 Resumo da Análise de Variância dos resultados dos Índices de % de inibição do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários	95

TABELA 11 Resumo da Análise de Variância dos resultados de Atividades PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) para o ensaio com três gêneros de fungos e quatro diferentes tempos de cultivo	95
TABELA 12 Resumo da Análise de Variância dos resultados de Atividades PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) para o ensaio com três gêneros de fungos e quatro diferentes tempos de cultivo	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Reações de atuação da PME sobre a Pectina (Braverman, 1980)...	13
FIGURA 2 Atuação da PE e PG sobre a pectina metilada produzindo o ácido D-galacturônico (Braverman, 1980).....	14
FIGURA 3 Reações químicas que demonstram o mecanismo de atuação da PG (Braverman, 1980).....	15
FIGURA 4 Gráficos referentes ao índice de crescimento dos isolados dos agentes biológicos através de regressão.....	59
FIGURA 5 Atividade de PME, ao longo dos tempos de cultivo para <i>Aspergillus niger</i>	65
FIGURA 6 Atividade de PG ao longo dos tempos de cultivo para os fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus sp</i>	66

RESUMO GERAL

MENESES, Alisson Gonçalves. **Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico “G088”**. 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

Para a obtenção de enzimas microbianas, é necessária a seleção de um microrganismo. As linhagens específicas de microrganismos empregados na produção de enzimas são, originalmente, obtidas por isolamento a partir de fontes naturais ou das culturas mantidas em coleções estabelecidas. Recentemente, um grande número de microrganismos, isolado de diferentes materiais, tem sido selecionado, por sua habilidade de degradar os polissacarídeos presentes em biomassa vegetal, produzindo pectinases (enzimas pectinolíticas). As enzimas pectinolíticas têm grande importância comercial para diversas aplicações industriais. A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos, como fungos, desenvolvem tolerância a esses compostos. Sabendo do grande destaque da utilização de pectinases no setor industrial, objetivou-se, neste trabalho, avaliar vários isolados de agente biológico, por meio da determinação de características de velocidade e taxa de crescimento em meio de cultura e produção de enzimas pectinolíticas; comparar o isolado superior quanto ao conjunto de características anteriores com os principais produtores comerciais, por meio de curvas de produção, **pectinametilesterase** (PME) e **poligalacturonase** (PG), validando, assim, seu potencial industrial. Adicionalmente, testou-se a seletividade de produtos (defensivos) usualmente utilizados na cafeicultura, visando à preservação de agente biológico bioprotetor da qualidade do café. Os isolados G076, G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088 foram os que apresentaram IVCM superiores. O isolado G088 que apresentou atividade média superior aos demais para a produção de PME e de PG, sendo também superior ao *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. Os produtos químicos Biopiról e Envidor, foram os mais seletivos quanto ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e % de inibição do crescimento do agente biológico G088.

¹ Comitê de Orientação: Sára Maria Chalfoun - EPAMIG (Orientadora); Carlos José Pimenta - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

GENERAL ABSTRACT

MENESES, Alisson Gonçalves. **Efficiency of pectic enzyme production and selectivity of phytosanitary products on the biologic agent “GO88”**. 2007. 96 p. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

For obtaining microbial enzymes, the selection of a microorganism is necessary. The specific strains of microorganisms employed in the production of enzymes are originally obtained by isolation from natural sources or from the cultures maintained in established collections. Recently, a great number of microorganisms, isolated from different materials have been selected by their ability of degrading the polysaccharides present in the plant biomass producing pectinases (pectinolytic enzymes). The pectonolytic enzymes, which degrade the pectin present in the media lamella and primary cell wall, have a great commercial importance for a number of applications industrial applications such as to improve juice yields and clarification in the food industry, brewery and pharmaceutical and textile industry. The selectivity of agrototoxic chemicals is a process in which organisms such as fungi develop tolerance to those complexes. Being aware of the great prominence of the use of pectinases in the industrial sector, it was aimed in this work to evaluate several isolates of biologic agent through the determination of velocity characteristics and growth rate in culture medium and production of pectinolytic enzymes; compare the isolate superior as regards the set of previous characteristics with the main commercial producers through the production curves, pectinmethylesterase (PME) and poygalacturonase (PG), validating in this way their industrial potential. In addition, the selectivity of the products (defensive) usually utilized in coffee production aiming the preservation of bioprotector biologic agent of coffee quality. Isolates GO76, GO77, GO79, GO80, GO81, GO82, GO84, GO87 and GO88 which showed superior IVC. Isolate GO88 which presented average activity superior to the other for production of PME and PG, its being also superior to *Aspergillus niger* and *Rhizopus sp.* The chemicals Biopiról (T 10) and Envidor (T 14) were more selective concerning the mycelial velocity index and % of growth inhibition of the biologic agent GO88.

* Guidance Committee: Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser); Carlos José Pimenta – UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O primeiro passo na obtenção de enzimas microbianas é a seleção de um microrganismo que, ao crescer em cultura pura, produza a enzima desejada em grande quantidade. As linhagens específicas de microrganismos empregados na produção de enzimas são, originalmente, obtidas por isolamento a partir de fontes naturais ou das culturas mantidas em coleções estabelecidas, em vários laboratórios. Quando se deseja obter uma enzima que efetue determinada reação, deve-se procurá-la entre microrganismos por meio de métodos apropriados de seleção.

Enzimas são de grande importância em processos industriais, em razão de sua especificidade e de seu potencial catalítico em inúmeras reações celulares. As enzimas microbianas são classes de proteínas responsáveis pela reciclagem de matérias orgânicas insolúveis na natureza. Dentre essas enzimas, as pectinases apresentam destaque no setor industrial.

Pectinases foram as primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 1930, para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas em 1960, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são, hoje, as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas, principalmente, por bactérias, fungos e leveduras. Embora muitos estudos enzimáticos sejam realizados de diversas origens, as principais preparações enzimáticas utilizadas industrialmente são de origem fúngica.

Atualmente, a utilização de pectinases tem aumentado progressivamente, possuindo variadas aplicações industriais (indústria têxtil, química, cosmética, farmacêutica), além de um destacado papel no setor alimentício, podendo influir na composição, no processamento, na deterioração e

na conservação dos alimentos. A produção comercial de pectinases para os mais diversos fins tem sido um campo crescente da biotecnologia, cujo valor estimado de vendas tem aumentado progressivamente.

Atualmente, o alto custo na produção enzimática é, talvez, o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, pode levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção.

Os fungos são fontes potenciais de enzimas, como as pectinases, em função de suas características de reprodução e crescimento, pois se adaptam a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico, além de possuírem um crescimento rápido quando as condições de cultivo são favoráveis. O agente biológico em estudo é considerado um bom produtor de pectinases, pois apresenta ampla distribuição geográfica, é facilmente cultivado em diferentes tipos de substrato, pois, além de crescer rapidamente em vários substratos, inclusive resíduos industriais, também produz pectinases durante o seu metabolismo, sem a necessidade de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo, além de não causar danos à saúde do homem.

O principal objetivo do controle biológico é o de manter, por meio do emprego de determinadas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agrossistema em equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado juntamente com o patógeno e os organismos úteis.

A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos, como fungos, desenvolvem tolerância a esses compostos. Este processo pode ser devido a vias metabólicas alternativas ou reações enzimáticas insensíveis à inibição por esses agrotóxicos (Pelczar et al., 1980). Outros mecanismos de tolerância de microrganismos a pesticidas podem incluir a inibição competitiva entre um metabólito essencial e um análogo (pesticida); o desenvolvimento de

via metabólica alternativa que evite alguma reação normalmente inibida pelo pesticida; a produção de uma enzima alterada para funcionar em benefício da célula, mas não sendo afetada pelo pesticida; a síntese de uma enzima, em excesso, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano; a dificuldade do agrotóxico em penetrar na célula, por alguma alteração da membrana citoplasmática e a modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas (Cook, 1985; Pelczar et al., 1980).

Sabendo do grande destaque da utilização de pectinases no setor industrial, objetivou-se, neste trabalho: avaliar vários isolados de um agente biológico, por meio da determinação de características de velocidade e taxa de crescimento em meio de cultura e produção de enzimas pectinolíticas; comparar o isolado superior quanto ao conjunto de características anteriores com os principais produtores comerciais, por meio de curvas de produção, pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG), validando, assim, seu potencial industrial. Adicionalmente, testou-se a seletividade de produtos (defensivos) usualmente utilizados na cafeicultura, visando à preservação de um agente biológico bioprotetor da qualidade do café.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização de microrganismos utilizados como agentes de bioproteção e como produtores de enzimas

O aproveitamento de microrganismos como agentes de bioproteção de cultivos e sua aplicação como produtores de enzimas comerciais tem se mostrado viável. Segundo Andrews (1985), muitos pesquisadores preferem selecionar microrganismos com características como: presença no local onde o controle será aplicado; bom crescimento, estabilidade e esporulação em cultura; membro de espécies ou gêneros conhecidos como antagonísticos, e características morfológicas ou fisiológicas distintas para facilitar o reconhecimento e a sobrevivência no local em diferentes condições.

Além disso, estes microrganismos não podem produzir resíduos tóxicos, não podem alterar a qualidade do substrato e sua presença não pode colocar em risco a saúde do homem e a de outros animais. Nesse aspecto, deve-se citar que grupos de fungos largamente utilizados pela indústria de enzimas, considerados como os mais importantes microrganismos usados na biotecnologia, como os pertencentes ao grupo de *Aspergillus niger*, dentro dos quais alguns são produtores de ocratoxina A, apresentam diferenças aparentemente insignificantes, o que dificulta a sua manipulação (Schuster et al., 2002).

A seleção de microrganismos antagonísticos sustenta, virtualmente, todo o programa de controle biológico (Bettiol, 1988). Segundo Wood & Tveit (1955), organismos selecionados como antagonísticos não devem ser fitopatogênicos, devem ter propriedades que facilitem a aplicação na superfície das plantas ou solos e devem ter capacidade de rápido estabelecimento. Seus esporos ou estruturas de sobrevivência devem germinar bem e rapidamente. Os organismos devem apresentar alta taxa de crescimento e capacidade reprodutiva, especialmente de esporos relativamente resistentes. Os antagonísticos devem ser

facilmente cultivados em meios disponíveis e não devem ser exigentes em requerimentos nutricionais, de modo que grandes quantidades de inóculo possam ser facilmente preparadas a baixo custo. A maioria das considerações acima é válida, quando se pretende utilizar um microrganismo como produtor de enzimas comerciais.

Acresce-se a isso o fato de que, na utilização de microrganismos, tanto para a produção de enzimas quanto como agentes de bioproteção, esses não devem ser produtores de micotoxinas, devendo, portanto, serem classificados como GRAS (do inglês *generally regarded as safe*, ou geralmente reconhecidos como seguros) pelo *Food and Drug Administration*, o FDA, órgão governamental dos Estados Unidos (Varga et al., 2000).

2.2 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas formam um grupo heterogêneo de derivados de carboidratos, ocorrendo em todos os vegetais superiores, em quantidades variáveis. Elas são encontradas em tecidos vegetais, nas paredes celulares e na lamela média (espaço intercelular). A principal função biológica destas substâncias é de caráter estrutural. Elas são responsáveis pela união das células umas as outras, além de serem componentes da parede celular primária, juntamente com a celulose e a hemicelulose. Do ponto de vista químico, as substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos (mais precisamente poliuronídeos), cujo componente principal é um uronídeo derivado da D-galactose, com o grupo hidroxílico do carbono 6 oxidado a carboxílico, denominado ácido D-galacturônico. Alguns termos têm sido empregados para denominar as diferentes substâncias pécticas, mas as suas definições ainda geram certa confusão. A nomenclatura proposta pela *American Chemical Society* (Kertesz, 1951), completada pela nomenclatura utilizada por Whitaker (1990), é apresentada a seguir.

“Substâncias pécticas” é a designação global para os derivados coloidais de carboidratos que ocorrem em plantas, ou são preparados a partir destas, e que contêm grande proporção de unidades de ácido galacturônico anidro. Os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico podem estar parcialmente esterificados por grupos metila, ou parcialmente ou totalmente neutralizados por uma ou mais bases. As substâncias pécticas são diferenciadas dos polissacarídeos pelo fato de possuírem grupos carboxílicos (COOH), característicos dos ácidos orgânicos. Dessa forma, é mais apropriado descrever as substâncias pécticas como sendo derivados de carboidratos, em vez de simplesmente carboidratos (Kertesz, 1951).

“Protopectina” é a denominação dada para o composto insolúvel em água que ocorre em plantas, a partir do qual se obtêm as substâncias pécticas por hidrólise restrita (Kertesz, 1951). Segundo Whitaker (1990), a insolubilidade deste composto em água deve-se, provavelmente, ao tamanho do polímero ou à ligação com cátions divalentes (especialmente Ca^{+2}) e ou outros polissacarídeos, como celulose e hemicelulose. A protopectina pode ser decomposta por meio de aquecimento em presença de ácidos diluídos, liberando os ácidos pectínicos e os ácidos pécticos.

A expressão “ácidos pectínicos” designa os ácidos poligalacturônicos coloidais contendo uma quantidade significativa de grupos metil éster. Os ácidos pectínicos são capazes de formar géis com açúcar e ácidos, sob condições adequadas. Se o teor de metoxila for baixo, a formação de gel poderá ocorrer quando certos íons metálicos estiverem presentes em solução. Os sais de ácidos pectínicos são pectatos neutros ou ácidos (Kertesz, 1951).

Whitaker (1990) utiliza uma definição de ácidos pectínicos um pouco menos genérica, especificando que a quantidade de grupos carboxila metoxilados deve ser maior que zero e menor que 75%.

“Pectina” é o termo geral empregado para designar os ácidos pectínicos com teor de grupos metil éster e grau de neutralização variáveis, solúveis em água e que são capazes de formar géis com açúcar e ácidos, em condições adequadas (Kertesz, 1951). A pectina é definida, por Whitaker (1990), como sendo o material polimérico solúvel, no qual pelo menos 75% dos grupos carboxílicos das unidades de ácidos galacturônicos encontram-se esterificados com metanol.

O termo "ácido péctico" é aplicado às substâncias pécticas compostas, em sua maior parte, por ácidos poligacturônicos coloidais completamente livres de grupos metil éster. Os sais dos ácidos pécticos são pectatos neutros ou ácidos (Kertesz, 1951; Whitaker, 1990).

2.3 Enzimas pectinolíticas

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias, que são denominadas enzimas pectinolíticas ou pectinases (Bailey & Pessa, 1990).

As pectinases são responsáveis pela degradação das substâncias pécticas para fins nutricionais e são produzidas, principalmente, por bactérias, fungos, leveduras e plantas superiores, não sendo sintetizadas por células animais, exceto por alguns insetos (Pardo et al., 1991).

O termo enzimas pectinolíticas, ou “pectinases”, normalmente designa as enzimas capazes de degradar os poliuronídeos das moléculas das substâncias pécticas, conforme Macmillan & Sheiman (1974). Elas estão envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos dos vegetais, e são empregadas na indústria desde a primeira metade daquele século, destacando-se por serem as enzimas mais utilizadas pelas indústrias de processamento de frutas (Macmillan & Sheiman, 1974; Pepler & Reed, 1987). As pectinases são aplicadas

industrialmente na extração e clarificação de sucos de frutas, na maceração de vegetais e frutas, e na extração de óleos essenciais.

A classificação das enzimas pectinolíticas é feita de acordo com a sua atuação sobre as substâncias pécticas, dividindo-se em dois grupos principais: esterase e despolimerases. A única fração esterase descrita na literatura é denominada pectinaesterase e atua sobre os grupos metil éster, desesterificando a pectina por meio de um mecanismo de hidrólise. As frações despolimerases atuam sobre a cadeia de poligalacturonato, despolimerizando as substâncias pécticas pela quebra das ligações glicosídicas α -1,4 da cadeia principal. Esta despolimerização pode se dar por meio de um mecanismo de hidrólise ou por um mecanismo de transeliminação (β -eliminação). Em função do mecanismo envolvido, as despolimerases são classificadas em hidrolases e liases (ou transeliminases). Elas ainda são subdivididas, conforme a especificidade, quanto ao substrato preferencial (pectina, ácido péctico ou oligogalacturonato) e segundo o padrão de ação (endo-enzimas e exo-enzimas). A hidrólise da cadeia de pectina é obtida pela ação sinérgica de algumas enzimas, incluindo pectinametilesterase, endo e exo-poligalacturonase, pectato liase e pectina liase (Gummadi & Panda, 2003; Soares et al., 2001).

De acordo com Malvessi & Silveira (2004), devido à grande diversidade de pectinas presentes nos tecidos de plantas, as pectinases possuem diferentes mecanismos de ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato. Elas podem, então, ser classificadas em dois grandes grupos, segundo seu mecanismo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes.

A enzima que cataliza a desesterificação das substâncias pécticas é denominada pectinametilesterase (PME), pectina metoxilase ou pectina desmetoxilase. Seu modo de ação consiste na remoção dos grupamentos metil-éster presentes em algumas substâncias pécticas, hidrolisando somente os

grupamentos adjacentes a grupos carboxílicos livres. Essas enzimas convertem a pectina em pectato e liberam metanol (Celestino et al., 2006).

Sheen et al. (1999), caracterizando a enzima pectinametilesterase, relatam a importância dessa enzima na primeira separação da cadeia de pectina, pois a pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase e pectato liase.

Em complemento às enzimas desesterificantes (pectinametilesterase), as despolimerases promovem a clivagem de ligações glicosídicas α -(1,4) e são classificadas conforme: 1) a especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou ácido pécico); 2) a posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pécicas, atuação ao acaso (endo-enzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora do substrato (exo-enzima) e 3) o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por β -eliminação ou hidrólise do substrato) (Bailey & Pessa, 1990).

Dentre as enzimas despolimerizantes, as denominadas transeliminases, ou liases, catalisam a quebra não hidrolítica de pectatos, atuando na clivagem de ligações glicosídicas α -(1,4) entre resíduos de ácido galacturônico adjacentes por β -eliminação e gerando duplas ligações entre os carbonos 4 e 5 do produto (Sakai et al., 1993). As liases são classificadas em pectina liase (PL) e pectato liase (PAL), de acordo com o substrato sobre o qual atuam.

Por outro lado, as despolimerases que atuam por hidrólise e têm como substrato o pectato são chamadas poligalacturonases. As poligalacturonases são hidrolases que catalisam a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, atuando mais em pectato que em pectina e resultam em mono e dissacarídeos (Pardo et al., 1991). De acordo com o mecanismo de ação dessas enzimas sobre o substrato, elas são classificadas em dois grupos: endopoligalacturonase, que promove a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato e a exopoligalacturonase, que hidrolisa a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora. A hidrólise do

pectato ou de porções não esterificadas da cadeia de poligalacturonatos pela endopoligalacturonase produz uma série de oligogalacturonatos, podendo acumular mono, di e, algumas vezes, trigalacturonatos. Já a ação das exopoligalacturonases sobre a molécula de pectato provoca uma rápida liberação de grupos redutores (Rexová-Benková & Markovic, 1976).

2.3.1 Pectina metil esterase (PME)

A enzima PME é conhecida por desesterificar compostos pécticos constituintes da parede celular das plantas. A hidrólise de grupos metil-éster, catalisada por esta enzima, produz uma pectina com menor grau de metilação, a qual sofre clivagem pela poligalacturonase (PG). Assim, o efeito sinérgico dessas duas enzimas tem um importante papel no processo de amolecimento do fruto durante o estágio de amadurecimento. A desmetilação da pectina resulta em um maior número de grupos carboxílicos, o que pode facilitar a ação da poligalacturonase, que degrada substâncias pécticas, preferivelmente desesterificadas (Fry, 1986).

Vários tipos de enzimas participam da clivagem do polímero de pectina (Linko et al., 1989). A pectina esterase (EC 3.1.1.11), também denominada de pectina metil esterase ou pectina acetilesterase, cliva ligações metilester ou acetilester com formação de ácido péctico. A atividade de pectina metil esterase está presente em plantas superiores, sendo abundante em frutas cítricas e legumes, assim como em microrganismos, principalmente fungos (Walsh & Headon, 1994; Whitaker, 1990). A pectina metil esterase de origem vegetal hidrolisa ligações éster próximas a resíduos não esterificados. A PME remove os grupos metoxil das pectinas por um ataque nucleofílico da enzima no éster, resultando na formação de um intermediário acil-enzima, com a liberação de metanol. Segue-se, então, uma deacilação (hidrólise do intermediário), regenerando a enzima e o ácido carboxílico (Figura 1) (Braverman, 1980).

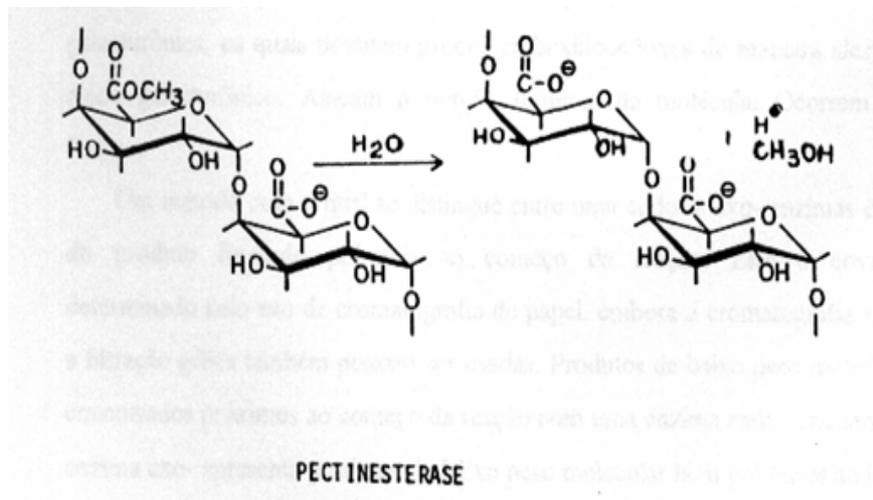


FIGURA 1 Reações de atuação da PME sobre a pectina (Braverman, 1980).

2.3.2 Poligalacturonase (PG)

A poligalacturonase hidrolisa de forma aleatória as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização de molécula (Pilnik & Rombouts, 1981). A atividade desta enzima tem sido identificada em vários frutos em amadurecimento e está correlacionada com o aumento no teor de pectinas solúvel. Ela catalisa a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4-D-ácido galacturônico. É inativa sobre o polímero totalmente metilado, mas, em presença da PME, que é capaz de desmetilar a pectina, rompe todas as ligações da cadeia e produz D-galacturônico livre (Figura 2) (Braverman, 1980).

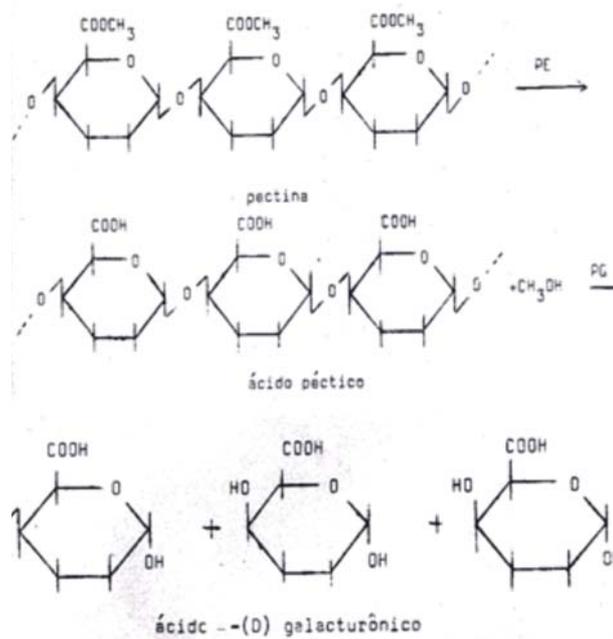


FIGURA 2 Atuação da PE e PG sobre a pectina metilada, produzindo o ácido D-galacturônico (Braverman, 1980).

A PG é a enzima mais importante, principalmente em produtos de caráter ácido, por apresentar uma atividade ótima em pH 4,5 e por ser a mais resistente ao tratamento térmico. No entanto, a PG depende, essencialmente, da ação da PME, que fornece o seu principal substrato, o ácido péctico, a partir da pectina natural da planta (Benen & Vincken, 2002).

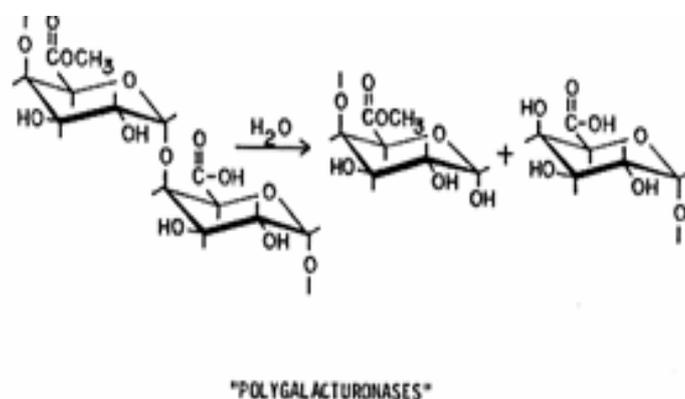


FIGURA 3 Reações químicas que demonstram o mecanismo de atuação da PG (Braverman, 1980).

2.3.3 Exo-poligalacturonase

Este grupo é subdividido em **Exo-PG-1** (Exo-poly- α -1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e **Exo-PG-2** (Exo-poly- α -1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (Hennies, 1996; Pilnik & Rombouts, 1981).

2.4 Fungos

Os fungos compreendem seres eucariotos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, obtendo energia por meio de reações químicas nas quais substratos adequados são oxidados (Tortora et al., 2000). Apresentam parede celular rígida quitinosa, constituída de polímeros de amino-açúcares, sem reserva de amido, em alguns casos, com presença de glicogênio.

Segundo Lacaz (1998), o reino Mycetalia ou Fungi abrange os fungos gelatinosos (Divisão Myxomycota) e os verdadeiros (Divisão Eumycota). Os Eumycota compreendem seres com organização miceliana e, dependendo da origem dos esporos, sexuada ou assexuada, são divididos em fungos perfeitos ou imperfeitos (deuteromycetos), respectivamente. Sob o ponto de vista morfológico, torna-se conveniente distingui-los em fungos filamentosos e leveduras. Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas num mesmo grupo de fungos. Artificialmente, desenvolvem-se em meio de cultura, apresentando colônias visíveis macroscopicamente. As leveduras formam aglomerados de aspecto cremoso ou rugoso e os bolores, massas filamentosas.

Segundo Minami (2003), o substrato e a temperatura de incubação são fatores que interferem no dimorfismo (leveduriforme ou filamentosos) apresentado por algumas espécies.

Os fungos filamentosos ou bolores são constituídos por células multinucleadas (conócitos), formando tubos denominados hifas que, entrelaçadas, constituem o micélio (Borzani et al., 2001).

O micélio pode ser vegetativo ou reprodutivo. O primeiro tem por finalidade absorver e metabolizar nutrientes e o segundo multiplicar, reproduzir, transmitir caracteres genéticos e perpetuar a espécie. Multiplicam-se por fragmentação das hifas ou formação de esporos mediante fusão (sexuadamente) ou dispersão dos mesmos no ambiente (assexuadamente) (Lacaz, 1998).

Os fungos imperfeitos ou deuteromycetos assumem importância diferenciada, pois apresentam micélio septado, reprodução exclusivamente assexuada com esporos exógenos formados em conidióforos. A identificação de gêneros e espécies está vinculada à coloração do micélio e a forma, cor e disposição dos conídios (Borzani et al., 2001).

2.5 Produção de enzimas pectinolíticas por fungos

As pectinases são produzidas, principalmente, por plantas superiores e uma grande variedade de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de microrganismos. Portanto, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para o uso industrial (El-Refai et al., 1984; Ueda et al., 1982).

Nos últimos anos, bactérias, leveduras e outros fungos despertaram grande interesse de estudo, em virtude das inúmeras vantagens apresentadas, destacando-se, dentre outras, as seguintes:

- não necessitam de amplos espaços para seu crescimento e não dependem das condições atmosféricas (Falanghe, 1975; Ursini, 1974);
- os fatores de crescimento, como concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e de células, podem ser manipulados facilmente (Snyder, 1970);
- conseguem degradar e crescer em amplos substratos, inclusive em resíduos industriais, os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada. Como decorrência desse fato, têm-se a redução ou o controle dos problemas de poluição causados por esses resíduos (Falanghe, 1975);
- possuem crescimento rápido, quando as condições de crescimento são favoráveis. A população de fungos chega a dobrar em intervalos de 4 a 12 horas, as leveduras de 1 a 3 horas e as bactérias de 0,5 a 2 horas (Falanghe, 1975; Snyder, 1970);

- podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados (Batt & Sinskey, 1989).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. Além disso, as pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura (Martin et al., 2004).

Um outro fator que pode justificar a crescente utilização de enzimas fúngicas na indústria de alimentos é o fato de os fungos produtores de pectinases possuírem o pH de atuação bem próximo ao pH da maioria dos sucos de frutas, o qual varia de 3,0 a 5,5 (Moyo, et al., 2003).

Preparações comerciais de pectinases são, normalmente, de origem fúngica, especialmente de *Aspergillus* e *Penicillium*, que exibem características de alta atividade de endopoligalacturonase e de pectinaliase. Estas preparações de pectinases disponíveis no mercado são compostas por pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina liase. Além dos gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, outros fungos filamentosos produtores de pectinases são citados por Castilho (1999), Geocze (1994), tais como: *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Coniothyrium* e *Rhizopus*, dentre vários outros que vêm sendo avaliados como potentes produtores de pectinases. Apesar da propriedade desses fungos quanto à produção de pectinases, nem todos são aproveitáveis, já que alguns deles são produtores de várias micotoxinas, as quais podem ser prejudiciais à saúde do homem (Dalboge, 1997)

Apesar de existirem vários fungos produtores de pectinases, Jia & Wheals (2000) afirmam que as enzimas pectinolíticas usadas na indústria de alimentos são comercialmente produzidas, em sua maioria, por *Aspergillus niger*. Esta espécie de fungo produz várias pectinases, incluindo

pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL). As pectinases produzidas por *Aspergillus niger* são de grande importância, pois são classificadas como GRAS, permitindo, assim, sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos. Além disso, a pectina liase, produzida por *Aspergillus niger*, é a única enzima capaz de hidrolisar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de frutas.

Dalboge (1997) menciona que, apesar da extensa aplicação de pectinases de *Aspergillus niger* no setor comercial, muitas apresentam baixa atividade de PG e alta atividade de PME e PL. Além disso, o uso da mistura enzimática produzida por *Aspergillus* pode resultar em decréscimo da estabilidade do suco de fruta, pela precipitação dos derivados de pectina desesterificados com íons de cálcio presentes no suco e na liberação de metanol para o sistema digestivo. Atualmente, novos estudos têm sido incentivados, buscando o conhecimento e a aplicação de novas pectinases fúngicas no setor comercial.

2.6 *Aspergillus*, seção *Nigri*

Um conidióforo se origina de uma célula podal e termina numa vesícula, que forma esterigmatas em forma de frascos. Cadeias de conídios se desenvolvem em esterigmatas secundárias (ramos de esterigmata primária). Em algumas espécies, a cabeça do esporo é esférica; em outras, a disposição das esterigmatas dá um aspecto de leque ou de cilindro. Em algumas espécies, são produzidos ascósporos, os quais, quando presentes, são em números de oito, redondos ou ovalados, em cada asco. Os ascos são irregularmente distribuídos ao longo do peritécio. Os esporos têm coloração variada, fornecendo a esses bolores cores típicas. São importantes, economicamente, tanto em sentido positivo como negativo (Pelczar, 1980).

As espécies de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* são fungos cosmopolitas, com grande impacto na sociedade moderna (Accensi et al., 1999;

Varga et al., 2000). Algumas espécies são responsáveis pela deterioração de alimentos, enquanto outras são usadas na indústria de fermentação, para a produção de diferentes enzimas hidrolíticas, tais como amilases e lipases, e ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido glucômico (Varga et al., 2000). Há isolados de *Aspergillus niger* modificados geneticamente e aceitos como GRAS, pelo FDA (Varga et al., 2000). Entretanto, nos últimos anos, algumas espécies têm sido mencionadas como produtoras de ocratoxina A (Abarca et al., 1994; Nakajima et al., 1997), com destaque especial para o *Aspergillus carbonarius*, nos alimentos de países tropicais e subtropicais (Pitt et al., 2000).

Schuster et al. (2002) citam que apenas 3% a 10% dos isolados de *A. niger* examinados para a produção de ocratoxina A apresentaram um teste positivo sob condições favoráveis. No entanto, se considerarmos um sistema contínuo de produção de enzimas, mesmo que o isolado inicial seja negativo para a produção de OTA, este índice de ocorrência de isolados produtores deve ser considerado elevado, devido aos riscos de contaminação que representa.

2.7 *Rhizopus* sp.

Os fungos deste gênero são comumente conhecidos como fungo do pão ou bolor negro. Os micélios jovens são multinucleados e não apresentam paredes transversais, sendo todas as hifas iguais. Estas, mais tarde, desenvolvem três tipos: rizóides ramificados que penetram no substrato, estolones que crescem lateralmente na superfície do substrato, juntando as unidades em que se formam tufo de rizóides, e esporangióforos, que crescem a partir dos estolones. Os esporangióforos não são ramificados e demonstram esporangióforos em suas extremidades. A reprodução assexuada se faz por meio de aplanósporos ou, em algumas espécies, clamidósporos. Sexualmente, algumas espécies do gênero são homotáticas e outras heterotáticas. Nestas últimas, as hifas de ambos os sexos se unem para formar progametângios, que se desenvolvem ao longo de etapas até

formar o zigoto caracterizado por sua parede espessa negra e rugosa. Os zigotos podem permanecer em estado latente durante vários meses, antes da germinação (Pelczar, 1980).

- O exemplo típico desse fungo é o *Rhizopus stolonifer*, fungo cosmopolita que vive particularmente em regiões tropicais e subtropicais, em quase todo tipo de alimento fresco, úmido e particularmente seco. A espécie mais comumente encontrada é o *Rhizopus stolonifer*, classe Zygomycetos, ordem Mucorales, sendo as espécies dessa ordem as que predominam em alimentos. Morfologicamente, são fungos não septados, com micélios cotonosos e formando esporangiosporos nos nódulos onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são, usualmente, muito grandes e negros, e suas columelas são hemisféricas. A base do esporângio, ou apófise, tem a forma de taça. O micélio produz estolões aéreos que, em determinados pontos, formam rizóides capazes de formar raiz onde pode se originar um novo organismo. A característica primordial do *Rhizopus stolonifer* é o excessivo crescimento a 25°C, sendo o esporângio primeiramente branco, havendo mudança para preto, com o amadurecimento. O crescimento a 5°C e 37°C é fraco ou ausente. As micotoxinas possivelmente envolvidas não estão bem esclarecidas (Pitt & Hocking, 1997).

2.8 Condições de cultivo

A produção de pectinases em microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, período de incubação, estágio do ciclo de

crescimento, pH e temperatura de cultivo, além de outros fatores (Bravo et al., 2000).

O pH é considerado um importante parâmetro envolvido na produção e na manutenção de pectinases, pois alterações nos valores de pH podem influenciar a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais na molécula, proporcionando, assim, alterações no seu sítio ativo, resultando na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato (Garzón & Hours, 1992). Geoczé (1994) também sugere que uma das razões pelas quais a produção e a atividade de enzimas pécticas variam com o pH também está relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima péctica.

Fidurek et al. (1989), utilizando *Aspergillus niger*, detectaram pectinases após 12 horas de cultivo, ocorrendo aumento progressivo nessa produção com o passar do tempo. O valor ideal de pH para a produção de pectinases por *Aspergillus niger*, neste estudo, é igual a 6,0. Por outro lado, Bracat et al. (1981), trabalhando com *Aspergillus formigatus*, determinaram que a atividade máxima de poligalacturonase ocorre em pH 3,1.

Ueda et al. (1982) mostraram que variações no pH do meio de cultura provocaram alterações no tipo, na quantidade e no tempo de produção das PME, PG e PL de *Aspergillus oryzae* A3 e determinaram que a produção de PG foi maior em meio com pH 4,0, comparado a meios com pH 6,0. Esses autores sugeriram que uma das razões pelas quais as atividades de PME, PG e PL variam com o pH do meio de cultura seria a estabilidade de cada enzima ao pH. Vários outros autores verificaram que a maior produção de poligalacturonase ocorre em pH ácido, geralmente em torno de 3,0-4,0 (Aguilar et al., 1991; Martins et al., 2002).

De acordo com Pandey (1999), nos processos de fermentação em meio sólido (SSF), a acidificação do meio tem influenciado a produção de pectinases. Siessere (1991) verificou que os maiores níveis de atividade pectinolítica para

Penicillium frequentans foram obtidos quando o pH do meio de reação estava entre 4,0 e 5,4, diminuindo acentuadamente em valores de pH mais elevados e atingindo, em pH 6,0 e 7,0, respectivamente, 33% e 8% da atividade ótima observada em pH 5,0. Os valores de pH ótimo de reação estão incluídos no intervalo de pH encontrado para outros fungos, que, geralmente, varia de 3,8 a 5,5 (Bailey & Pessa, 1990). A maioria dos trabalhos mostra que as enzimas pectinolíticas purificadas são inativas em pH alcalino (Siessere, 1991).

Como o pH, a temperatura também tem seu papel de destaque, uma vez que afeta a viabilidade e o crescimento microbiano, o número de microrganismos no final do processo, a composição química e enzimática das células, como também suas necessidades nutricionais (Olson & Nottingham, 1980).

Todo microrganismo possui uma temperatura ótima de crescimento, pois, quando se eleva a mesma até esse ponto, ocorrerá, nas células, um aumento das reações químico-enzimáticas e, conseqüentemente, o crescimento celular torna-se mais rápido. Porém, se o aumento persistir e ultrapassar a temperatura máxima suportada pelos microrganismos ocorrerá a morte dos mesmos, que será mais evidente quanto maior for o tempo de exposição a essa temperatura. Por outro lado, a medida que a temperatura decresce, afastando-se do ponto ótimo, o crescimento celular torna-se cada vez mais lento, até chegar o momento em que cessará. Nesse ponto, pode-se dizer que está abaixo da temperatura mínima suportada pelo microrganismo (Loudiere et al., 1987).

Siessere (1991), estudando o efeito da temperatura sobre o crescimento e produção enzimática de *Penicillium frequentans*, constatou que, nas temperaturas de 30°C a 35°C, ocorreu a maior produção de enzimas pectinolíticas. Ao contrário do que foi verificado para *Penicillium frequentans*, a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* não foi afetada pela temperatura entre os valores de 25°C e 40°C, mas a produção de pectinase foi

maior a 30°C.

O comportamento diferente da produção de biomassa e da atividade pectinolítica, frente à temperatura de cultivo, foi citado também para os fungos *Cryphonectria parasitica*, *Venturia inaequalis*, *Aureobasidium pullulans* e *Botrytis cinerea*, os quais apresentaram temperatura ótima, para o crescimento, entre 40°C e 50°C. Porém, a poligalacturonase do fungo *Penicillium expansum*, do sobrenadante da cultura, foi estável em temperaturas abaixo de 40°C, quando pré-incubada, por 1 hora, em temperaturas entre 20°C e 80°C (Freitas, 1991).

Siessere (1991) ressalta que o extrato bruto enzimático é mais tolerante ao aquecimento do que as enzimas purificadas, sugerindo que fatores protéicos (ou impurezas) ainda não identificados estabilizariam as enzimas contra a desnaturação térmica.

Assim como o pH e a temperatura podem influenciar no crescimento microbiano, a idade da cultura pode determinar a produção das enzimas pectinolíticas. De acordo com Brumano et al. (1993), a idade do inóculo influenciou a síntese de enzimas pectinolíticas, mas não alterou a massa micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus alliaceus*. Assim, concluiu-se que a produção das enzimas pode estar diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra. Esta cultura pode estar em diferentes fases de maturação, quando associada ao meio de cultivo, tais como: crescimento exponencial, estacionária ou decrescente.

Siessere (1991) verificou que, em culturas mantidas em condição estacionária, teve-se uma pequena produção de PME e PG no primeiro dia de incubação. A primeira atingiu os maiores níveis no segundo dia de cultivo e decresceu sua atividade após o quarto dia de cultivo, enquanto a segunda manteve-se estável a partir do segundo dia. Isso pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície de cultura estava coberta com uma fina camada micelial.

Outra razão para a estabilização e a diminuição na atividade pectinolítica, observada após um período de tempo específico para cada microrganismo, pode estar relacionada ao consumo de algum composto essencial, aparecimento de um inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (Barnby et al., 1990).

Um outro fator que deve ser observado no cultivo de microrganismos é a concentração de nutrientes, pois esta pode afetar a velocidade de crescimento celular (Bravo, 2000).

Diferentes fontes de carbono podem influenciar no crescimento de microrganismo, como também na sua produção enzimática. Brumano (1993), estudando a produção de poligalacturonase (PG) por *Aspergillus niger*, verificaram que a enzima foi produzida em meios contendo combinações de pectina e glicose.

De acordo com Silva et al. (2002), a síntese de pectinases por fungo está sujeita à repressão catabólica por grande concentração de açúcar, afetando a indução e a constituição enzimática. O efeito de diferentes fontes de carbono na síntese de pectinases por fungos cultivados em meio sólido tem sido muito estudado e os resultados mostram que o meio ótimo para a produção de pectinases extracelular é o que possui substâncias pécticas como um indutor (Naidu & Panda, 1998).

Siessere (1991) também afirma que as enzimas pectinolíticas são induzíveis por várias substâncias pécticas e que o melhor indutor para a produção dessas enzimas por *Penicillium frequentans* foi a pectina. Porém, a proporção de nutrientes a serem combinados ao meio de cultivo é dependente da enzima que se deseja obter em maior quantidade, pois, de acordo com Martin et al. (2004), cada pectinase foi induzida pela presença de um nutriente específico. Assim, sugere-se que o meio de cultivo destinado ao crescimento de microrganismos produtores de pectinases seja uma fonte de carboidrato e

pectina, os quais são necessários ao crescimento do microrganismo e à indução enzimática.

Atualmente, muitos estudos têm sido conduzidos, visando à produção enzimática máxima, adicionando aos meios de cultivo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Alguns microrganismos têm sua produção aumentada pela adição de nutrientes, porém, outros produzem enzimas constitutivamente, mesmo na ausência de compostos pécnicos. Sabe-se que a concentração de células pode aumentar com a concentração de nutrientes, porém, em determinado momento, mesmo que se adicionem mais nutrientes ao meio, o número total de células vai permanecer constante (Geocze, 1994).

A escolha do meio de cultura é tão importante para o sucesso do processo fermentativo quanto à escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (Bravo et al., 2000).

2.9 Fermentação em estado sólido

A produção de enzimas em escala industrial se faz, majoritariamente, por fermentação submersa, porém, em alguns países, está crescendo, cada vez mais, a utilização da fermentação em meio semi-sólido, para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos. Novos avanços tecnológicos estão sendo incorporados a esse processo, podendo torná-lo interessante para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo (Couto & Sanromán, 2006).

Desde 1986, o Brasil iniciou uma série de projetos de pesquisas valorizando a adição de subprodutos da agricultura nos processos de crescimento

e reprodução enzimática em estado sólido. Atualmente, a fermentação em estado sólido (SSF) tem mostrado grande potencial para a produção de enzimas. Essa fermentação pode ser de especial interesse naqueles processos nos quais o produto fermentado bruto pode ser usado diretamente como meio para produção enzimática (Viniegra-González et al., 2003).

Esse sistema de fermentação em estado sólido oferece numerosas vantagens, quando comparado à fermentação em meio líquido, incluindo alto volume de produção enzimática, melhor circulação de oxigênio, extensa disponibilidade desses produtos, baixo custo, escassos problemas operacionais, diminuição dos problemas de contaminação microbiana, menor geração de efluentes e requerimento de simples equipamentos para os processos fermentativos (Patil & Dayanand, 2006). Além disso, os meios de cultura sintéticos são muito caros e a opção, geralmente, é feita por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agroindústria (Lima, 2001).

Apesar das inúmeras vantagens, algumas desvantagens podem ser destacadas, como dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Apesar dessas desvantagens, a fermentação em estado sólido tem se mostrado eficiente para a produção de enzimas por fungos filamentosos, ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (Couto & Sanromán, 2006).

Recentemente, um grande número de microrganismos, isolados de diferentes materiais, está se destacando por sua habilidade em degradar polissacarídeos presentes nos tecidos vegetais, produzindo pectinases em meio de cultura sólido (Gomes et al., 2001; Soares et al., 2001).

Castilho et al. (2000) fizeram uma análise econômica na produção de

lipase em meio sólido e líquido e constataram que o capital investido em um meio de fermentação líquido foi 78% maior que o necessário ao segundo. Esse estudo apontou uma grande vantagem ao meio de fermentação sólido, pois o custo de produção foi baixo, quando comparado ao meio líquido.

Niture & Pant (2004), estudando a produção de poligalacturonase em meio sólido composto por farelo de trigo e bagaço de laranja, observaram que a atividade dessa enzima foi aumentada três vezes, quando comparada com a atividade enzimática em meio de cultura líquido. Viniegra-González et al. (2003) afirmam que o meio de fermentação sólido (SSF) é mais produtivo que a fermentação em meio submerso (SmF), pois as pectinases produzidas por SSF são mais estáveis ao pH e à temperatura, além disso, são menos afetadas pela repressão catabólica.

De acordo com Castilho et al. (2000), um dos fatores que beneficiam as condições de crescimento em meios sólidos (SSF) é que estes estão mais próximos ao hábitat de fungos filamentosos, quando comparados aos meios de cultura líquidos. Assim, os microrganismos são capazes de crescer em substrato sólido e excretar maiores quantidades de enzimas. O material desperdiçado pelo processamento agroindustrial pode ser usado como substrato para o crescimento microbiano, valorizando os produtos que podem ser sintetizados e reduzindo a poluição ambiental.

A seleção do substrato para a produção enzimática em meio sólido depende de alguns fatores, como custo e disponibilidade do substrato, objetivo da produção enzimática e sua posterior aplicação. No processo de fermentação em estado sólido, o substrato sólido é responsável pelo fornecimento de nutrientes para o crescimento da cultura microbiana, como também fornecer um “suporte” para as células. O substrato que oferece todos os nutrientes necessários ao crescimento do microrganismo pode ser considerado como um substrato ideal. Entretanto, alguns dos nutrientes podem estar disponíveis em baixas

concentrações ou, então, o substrato pode estar isento. Nesse caso, o substrato poderia ser suplementado com nutrientes específicos (Pandey, 1999).

Além dos fatores citados acima, outros são importantes para o crescimento microbiano e a produção enzimática em um substrato sólido, incluindo o tamanho da partícula e o nível de umidade, podendo ser considerados os pontos mais críticos. Geralmente, substratos com partículas pequenas fornecem maior superfície de área para o ataque microbiano. Porém, quando muito pequenos, podem resultar em uma acumulação na superfície do substrato, podendo interferir na respiração e na aeração microbiana, resultando, assim, em menor crescimento e desenvolvimento na cultura microbiana. Em contraste, partículas grandes promovem respiração e aeração mais eficientes, pois se tem um espaço entre as partículas. No entanto, possui limitada superfície para o ataque microbiano (Jing et al., 2006).

Sabendo-se que a síntese microbiana de enzimas em meio sólido (SSF) pode ser afetada por vários fatores, é importante observar alguns pontos antes do início da colonização, incluindo: seleção de um substrato e microrganismo adequados, pré-tratamento do substrato, tamanho da partícula (espaço entre partícula e superfície de área) do substrato, disponibilidade de água no substrato, tipo e tamanho do inóculo, controle de temperatura de fermentação, período de cultivo e manutenção da uniformidade no meio de cultura (Pandey et al., 1999).

Atualmente, os resíduos agroindustriais são considerados o melhor substrato para a fermentação em meio sólido e o uso desse tipo de substrato está cada vez mais disseminado. Alguns dos substratos que estão sendo extensamente utilizados para o crescimento e a produção enzimática por fungos filamentosos são: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, sabugo de milho, resíduos de banana, resíduos de chá, polpa de café e outros resíduos industriais (Niture & Pant, 2004). A literatura revela que muitos trabalhos têm sido conduzidos

destacando a produção de enzimas em substrato sólido, como: proteases, celulasas, lignases, xilanases, pectinases, amilases e glicoamilases.

2.10 Seletividade de produtos ao agente biológico “G088”

Os cafezais apresentam muitas espécies de insetos, ácaros e fungos, algumas das quais são pragas de importância econômica, enquanto a maioria não chega a causar prejuízo, por ser mantida sob controle por inimigos naturais (Bustillo 1990). O ressurgimento de pragas-chave, o aparecimento de pragas secundárias e a resistência de pragas pelo uso contínuo do controle químico nos agroecossistemas estão relacionados à destruição de agentes de controle natural e levam, inevitavelmente, ao aumento nas doses dos produtos químicos e ao agravamento da situação (Bosch et al., 1982, Bustillo, 1990).

A conservação de organismos benéficos em cultivos protegidos é uma importante estratégia para a manutenção da densidade populacional das pragas abaixo do nível de dano econômico (Carvalho et al., 2001).

Fungos entomopatogênicos podem ser inibidos por agrotóxicos, o que pode comprometer o manejo integrado (Alves, 1986; Fernandes et al., 1985). Por isso, devem-se buscar soluções que conciliem alta produtividade, baixa relação custo/benefício e preservação do ambiente, pois estudos de impacto ou efeito de inseticidas sobre inimigos naturais de pragas são econômica e ambientalmente importantes. Dessa forma, devem-se utilizar defensivos agrícolas seletivos a fungos entomopatogênicos, em programas de manejo integrado.

A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos como fungos desenvolvem tolerância a esses compostos. Este processo pode ser devido a vias metabólicas alternativas ou reações enzimáticas insensíveis à inibição por esses agrotóxicos (Pelczar et al., 1980). Outros mecanismos de tolerância de microrganismos a pesticidas podem incluir a inibição competitiva

entre um metabólito essencial e um análogo (pesticida); o desenvolvimento de via metabólica alternativa que evite alguma reação normalmente inibida pelo pesticida; a produção de uma enzima alterada para funcionar em benefício da célula, mas não sendo afetada pelo pesticida; a síntese de uma enzima, em excesso, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano; a dificuldade do agrotóxico em penetrar na célula, por alguma alteração da membrana citoplasmática e a modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas (Cook, 1985; Pelczar et al., 1980).

Existem, atualmente, no mercado, inúmeras substâncias químicas empregadas no controle de pragas e doenças, sendo os inseticidas e fungicidas um grupo numeroso e destacado. Entretanto, as conseqüências da sua utilização não são unicamente positivas. Muitos desses compostos químicos são tóxicos ao homem e animais e, também do ponto de vista ambiental, acarretam diminuição do potencial de controle efetuado por predadores, parasitóides e patógenos. O controle integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico, pode ser uma estratégia mais segura e eficiente. Entretanto, alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos ou, até, alterar sua composição genética, acarretando modificações na sua virulência (Alves et al., 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, July 1994.
- ACCENSI, F.; CANO, J.; FIGUERA, L.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 191-196, Nov. 1999.
- AGUILAR, G.; TREJO, B. A.; GARCIA, J. M.; Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v 37, n. 12, p. 912-971, July 1991.
- ANDREWS, J. H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C. L.; LINDON, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. P. 31-44.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p. 73-126.
- ALVES, S. B.; MOINO JR., A.; ALMEIDA, J. E. M.. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217- 238.
- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v 12, n. 4, p. 266-271, Apr. 1990.
- BRACAT, M. C.; CRISTINA, M.; VANETTI, D.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, London, v. 13, n. 10, p. 693-696, Oct. 1981.
- BARNBY, F. M.; MORPHETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 891-897, 1990

BATT, C. A.; SINSKEY, A. J. Use of biotechnology in the production of single-cell protein. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 2, p. 108-111, Feb. 1989.

BENEN, J. A.; VINCKEN, J. P. Microbial pectinases. In: **Pectins and their manipulation**. Sheffield, Academic Press, 2002.

BETTIOL, W. **Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1988. 140 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BORZANI, W.; RATUSZNEI, S. M. ; RODRIGUES, J. A. D. ; CAMARGO, E. F. M. ; ZAIAT, M. ; Influence of agitation rate on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. **Water Science and Technology**, London, v. 4, n. 4, p. 305-312, 2001.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introducion a la bioquímica de los alimentos**. 2. ed. México: Editorial El Manual Moderno, 1980. 357 p.

BRAVO. C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 137-152, 2000. Edição especial.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World Journal Microbiology Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 225-228, Mar. 1993.

BUSTILLO, A. E. P. El control biológico como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. In: CONFERENCIA CONGRESSO DE SOCOLEN, 20., 1990, Cali. **Memorias...** Cali, 1990. p. 159-164.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Oxon, v 34, n. 4, p. 181-186, June 1999.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Oxford, v 71, n. 1, p. 45-50, Jan. 2000.

- CARVALHO, G. A.; MORAES, J. C.; GODOY, M. S.; MORAIS, A. A. Seletividade de produtos fitossanitários: uma estratégia viável no manejo integrado de pragas de hortaliças. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. cap. 9, p. 285-308.
- CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 33-42, May 2006.
- COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p. 25-29, 1985.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Applications of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v 76, n. 3, p. 291-302, Oct. 2006.
- DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 29-42, Aug. 1997.
- EL-REFAI, A. A.; METWALLI, S.M.; EL SABAIY, L. A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus amamori* 16. **Chemistry Microbial Technology**, New York, v. 8, n. 1, p. 115-117, 1984.
- FALANGHE, H. Produção de microorganismos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia**: tecnologia das fermentações. São Paulo: E. Blucher, 1975. v. 1, p. 246-285.
- FERNANDES, P. M.; LECUONA, R. E.; ALVES, S. B. **Patologia de *Beauveria bassiana*** (Bals.) Vuill. à broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera; Scolytidae). **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 10, p. 176-181, out. 1985.
- FIEDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **ACTA Biotechnology**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 355-361, 1989.

FREITAS, L. E. **Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1991. 67 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 165-186. 1986.

GARZÓN, C.G.; HOURS, R.A. Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Bioresource Technology**. v 39: 93-95, 1992.

GEOCZE, M. L. A. **Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1994. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GOMES, E.; IEMBO, T. and SILVA, R. Production, characterization and properties of depolymerising enzymes from a *Curvularia inaequalis* strains, **Folia Microbiologica**, Prague, v. 46, n. 4, p. 303-308, 2001.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases- a review. **Process Biochemistry**, v 38: 987-996, 2003.

HENNIES, P. T. **Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. 1996. Dissertação (Dissertação) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

JIA, J. H.; WHEALS, A. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Current Genetics**, New York, v. 38, n. 5, p. 264-270, Dec. 2000.

JING, D.; LI, P. J.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v 64, n. 2, p. 244-250, June 2006.

KERTESZ, Z. I. **The pectic substances**. New york: Interscience, 1951. 628 p.

LACAZ, C. S. et al. Classificações e caracteres gerais dos fungos. In: _____. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. Cap. 1, p. 3-45.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnología industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. cap. 14 e 15.

LINKO, M.; POUTANEN, K.; VIIKARI, L. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In: _____. **Enzyme systems for lignocellulose degradation**. Londres: Elsevier Applied Science, 1989.
LOUDIERE, S.; DURAND, A.; GRAJEK, W. Temperature and influence on pectinolytic activities of some fungi cultured in solid state meium. **Journal Eur. Congresso-Biotechnology**, v. 3, p. 258-263, 1987.

MACMILLAN, J. D.; SHEIMAN, M. I. Pectic enzymes. In: WHITAKER, J. R. (Ed.). **Food related enzymes**. Washington: ACS, 1974. p. 101-130. (Advances in Chemistry series, 136).

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept./Oct. 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819, Sept./Oct. 2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.

MINAMI, P. S. Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 10, jan./fev. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652003000100014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 Apr 2007.

MOYO, S.; GASHE, B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v 85, n. 1/2, p. 87-100, Aug. 2003.

NAIDU, G. G. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes- a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 19, n. 5, p. 355-361, Nov. 1998.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, v. 9, n. 2, p. 77-83, June 1997.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium Moniliforme*. **Microbial Research**, Jena, v. 159, p. 305-314, 2004.

OLSON JR., J. C.; NOTTINGHAM, P. M. Temperatura. In: SILLIVER, J. H. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980.

PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 13, n. 2/3, p. 81-84, Mar. 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; CARLOS, R. S.; POONAM, N. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July 1999.

PARDO, C.; LAPENA, M. A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharidase from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 974-977, Dec. 1991.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 18, p. 2340-2344, Dec. 2006.

PEPPLER, H. J.; REED, G. Enzymes in food and feed processing. In: KENNEDY, J. F. (Ed.). **Enzyme technology**. Weinheim: VCH, 1987. v. 7, cap. 11, p. 581-586. (Biotechnology)

PELCZAR, M.; REIDS, R.; CHAN, E. C. S. (Ed.) **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. 566 p.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G. C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. (Ed). **Enzymes and food processing**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 105-128.

- PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Micotoxins and Toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, n. 38, n. 1, p. 17-22, 2000. Supplement.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L. ; MARCOVIC, O. Pectic enzymes. In: Tipson, R. S. e Norton, D. (eds.) **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York, Academic Press, 1976. p. 323-385.
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, J.;FRIVASD, P. & VAN DICK. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 59, n. 4-5, p. 426-435. 2002
- SHEEN Z.; MANNING G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v 29, n. 3, p. 209-214, Mar. 1999.
- SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2002.
- SIÉSSERE, V. **Otimização das Condições de Cultivo para Produção e Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans***. 1991. 118 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SNYDER, H. E. Microbial sources of protein. In: CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M.; STEWART, G. F. **Advances in food research**. New York: Academic Press, 1970. v. 18, p. 85-140.
- SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; CASALI, A. G.
Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **Journal Applied Biochemistry**, New York, v 4, p. 524-532, 1982.

URSINI, R. Opening remarks. In: DAVIS, P. **Single-cell protein**. New York: Academic Press, 1974. p 1-2.

van den BOSCH, R.; VAN DEN; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. Naturally occurring biological control and integrated control. In van den BOSCH, R. (Ed.). **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. p. 165-184.

VARGA, J.; TÓTH, B.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; HOESKSTRA, R. F.; KOZAKIEWICZ, Z. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circundati* base don sequences of the internal transcribed Sspacer regions and the 5. 8 S RRNA gene. **Fungal Genetic and Biology**, Orlando, v. 30, n. 1, p. 71-80, June 2000.

VINIEGRA-GONZÁLES, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RONERO-GOMEZ, S. J.; DIAZ-GOLDÍNEZ, G.; AUGUR, C. A. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation syatems. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v 13, n. 2/3, p. 157-167, Mar. 2003.

WALSH, G.; HEADON, D. **Protein biotechnology**. Inglaterra: Wiley Publishers, 1994.

WHITAKER, J. Microbial Pectinolytic enzymes. In: **Microbial enzymes and biotechnology**. 2. ed. Amsterdam, Elsevier Applied Science Publishers, 1990a.

WOOD, R. K. S.; TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. **The Botanical Review**, Bronx, v. 21, n. 4, p. 441-492, Oct./Dec. 1955.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS PÉCTICAS PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”

RESUMO

MENESES, Alisson Gonçalves. Eficiência de produção de enzimas pécicas pelo agente biológico “G088”. In: _____. **Produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “G088”**. 2007. Cap. 2, p. 41-73. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Para a obtenção de enzimas microbianas é necessária a seleção de um microrganismo que cresça em cultura pura e produza a enzima desejada em grande quantidade. As linhagens específicas de microrganismos empregados na produção de enzimas são originalmente obtidas por isolamento a partir de fontes naturais ou das culturas mantidas em coleções estabelecidas, em vários laboratórios. Enzimas são de grande importância em processos industriais, em razão de sua especificidade e de seu potencial catalítico, em inúmeras reações celulares. As enzimas pectinolíticas catalisam a degradação de polissacarídeos pécicos e são essenciais na indústria de alimentos e na indústria têxtil. Objetivou-se neste trabalho: avaliar vários isolados de agente biológico, por meio da determinação de características de velocidade e taxa de crescimento em meio de cultura e produção de enzimas pectinolíticas e comparar o isolado superior quanto ao conjunto de características anteriores com os principais produtores comerciais, por meio de curvas de produção, **pectinametilesterase** (PME) e **poligalacturonase** (PG), validando, assim, seu potencial industrial. Os isolados G076, G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088 apresentaram índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) superior. O isolado G088 apresentou atividade média superior aos demais isolados para produção de PME e de PG, sendo também superior ao *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. O agente biológico G088 foi superior ao *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp., na determinação da atividade enzimática PME e PG, nos vários tempos estudados, aos 15, 22, 29 e 36 dias.

* Comitê de Orientação: Sára Maria Chalfoun - EPAMIG (Orientadora); Carlos José Pimenta - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

ABSTRACT

MENESES, ALISSON GONÇALVES. **Efficiency of pectic enzyme production by the biologic agent “GO88”**. 2007. Chap. 2, p. 41-73. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil*.

Enzymes are of great importance in industrial processes on the account of their specificity and their catalytic potential in a number of cell reactions. The pectinolytic enzymes catalyze the degradation of pectic polysaccharides and are essential in food industry and textile industry. Microorganisms as related with their reproduction and growth characteristics adapt themselves to a great diversity of substrates, they are excellent decomposers of organic material, their being utilized by industries, in the production of pectinolytic enzymes. Use of solid substrates for production of pectinolytic enzymes offers a great number of advantages over the method of conventional submerge and liquid fermentation. The production mean is simple, utilizing plant residues of grape, wheat meal, rice or sugar cane bagasse. The application of residues is way of utilizing alternative substrates and solving pollution problems with they can cause. It was aimed by this work to evaluate the potential of the biological agent in the production of pectinolytic enzymes from agroindustrial substrates and their residues as substrates. The first step was inoculating biological agent “G088” in the different substrates: orange bagasse, sugar cane bagasse, grape skin, passion fruit skin, coffee and rice hull. The enzymatic activities of polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME) of the substrates were evaluated; the best result for each enzyme was related with cropping time and sort of substrate. All the substrates produced pectinases, polygalacturonase (PG) and pectin methyl esterase (PME), standing out grape skin and rice hull. The best substrate for production of PG (117.35 U/g) and PME (1760 U/g) at 14 days was grape skin. The composition of the substrate has a direct influence on the production of PG and PME.

* Guidance Committee: Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser); Carlos José Pimenta – UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases são responsáveis pela degradação de uma molécula complexa de pectina, as quais são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Atualmente, as pectinases possuem várias aplicações biotecnológicas, sendo consideradas um destaque no setor industrial. Elas são necessárias na extração e na clarificação de sucos de frutas e vinhos, na extração de óleos essenciais, na produção de alimentos para recém-nascidos, na fermentação do café e do cacau, além do excelente destaque na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras, como o linho e o ramie (Malvessi & Silveira, 2004).

A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular do meio de cultura, do tempo de cultivo e da escolha de linhagens de microrganismos apropriadas. Quando esses critérios são alcançados, tem-se uma melhor produção enzimática.

Atualmente, o alto custo na produção enzimática é, talvez, o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismos apropriadas, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção.

Sabendo do grande destaque da utilização de pectinases no setor industrial, objetivou-se, neste trabalho, avaliar vários isolados de agente biológico, por meio da determinação de características de velocidade e taxa de crescimento em meio de cultura e produção de enzimas pectinolíticas, e comparar o isolado superior quanto ao conjunto de características anteriores com os principais produtores comerciais, por meio de curvas de produção, pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG), validando, assim, seu potencial industrial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA e de Microbiologia de Alimentos do Centro Tecnológico Sul de Minas (CTSM) da Epamig.

Os isolados de agente biológico foram obtidos por meio de diferentes localidades e variados sistemas de cultivo. Todos os isolados foram submetidos ao teste do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), para a determinação do isolado de maior crescimento. Após a determinação dos isolados superiores quanto ao crescimento micelial, procedeu-se a determinação das atividades enzimáticas dos melhores isolados obtidos quanto ao IVCM. O isolado de agente biológico que foi superior na determinação da atividade enzimática foi isolado para comparação com os principais produtores industriais de enzimas.

2.1 Índice de velocidade de crescimento micelial

O presente experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da EPAMIG-CTSM, localizado no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram testados vários isolados de agente biológico, obtidos de diferentes localidades e sistemas de cultivo da cafeeicultura mineira (Tabela 1). Os isolados do agente biológico foram avaliados medindo-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), utilizando-se a fórmula de Maquire adaptada por Oliveira (1991). O meio de cultura utilizado no ensaio foi batata-dextrose-ágar (BDA), vertido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Foram preparadas três placas por tratamento e foi inoculado um disco no centro da placa, contendo isolados de agente biológico, com o auxílio da alça de repicagem. Após a

inoculação ao meio de cultura, estes foram incubados em estufa BOD, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, sendo realizada a medição do diâmetro das colônias a cada dois dias.

TABELA 1 Identificação dos isolados quanto à origem (Três Pontas, Lavras e Patrocínio) e o sistema de cultivo (irrigado, não irrigado e orgânico). (Lavras, MG, 2007).

Isolado	Localidade	Sistema de cultivo	Propriedade
G076	Três Pontas, MG	Irrigado	X
G077	Três Pontas, MG	Não irrigado	X
G078	Três Pontas, MG	Orgânico	X
G079	Três Pontas, MG	Não irrigado	Y
G080	Três Pontas, MG	Irrigado	Y
G081	Três Pontas, MG	Irrigado	W
G082	Três Pontas, MG	Não irrigado	W
G083	Três Pontas, MG	Não irrigado	Z
G084	Três Pontas, MG	Irrigado	Z
G085	Lavras, MG	Irrigado	A
G086	Patrocínio, MG	Irrigado	B
G087	Patrocínio, MG	Não irrigado	B
G088	Lavras, MG	Orgânico	C

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) é dado por meio da fórmula de Maquire adaptada por Oliveira (1991), sendo descrito da seguinte forma:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

$$\text{IVCM} = (D - D_a)/N$$

D = diâmetro médio atual

D_a = diâmetro médio anterior

N = número de dias

Os isolados obtidos após a caracterização passaram a compor a coleção de isolados do agente biológico, por meio da transparência de partículas da colônia para tubos de ensaio, conforme metodologia preconizada por Castellani (1939).

2.2 Metodologia analítica

Além do IVCM, foram determinados também outros parâmetros, tais como a atividade enzimática dos isolados de maior índice de crescimento e comparação do melhor isolado com os tradicionais produtores industriais, com a finalidade de se estabelecer suas possíveis correlações. Os parâmetros analisados estão relacionados a seguir.

2.3 Condições de cultivo

Nessa etapa, utilizou-se o arroz como substrato semi-sólido, o qual foi considerado como padrão para o crescimento e a produção de enzimas pectinolíticas a partir dos microrganismos isolados da cafeicultura de diferentes regiões e sistemas de cultivo.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro de 500 ml, previamente esterilizados. O meio de cultura foi preparado da seguinte forma:

- foi feita uma mistura composta de 70g de arroz com 70 ml de água. Essa mistura foi autoclavada, durante 30 minutos, até alcançar a completa esterilização da amostra;
- após esse período de esterilização, o meio de cultivo semi-sólido obtido foi resfriado à temperatura ambiente, para posterior inoculação dos microrganismos;
- os isolados que apresentaram valores de IVCN superiores estatisticamente foram selecionados e utilizados nesta etapa, para a determinação da atividade enzimática. Os isolados utilizados foram G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088, obtidos de diferentes sistemas de cultivo e diferentes localidades.

2.4 Inóculo no meio de cultivo

A fermentação foi conduzida inoculando-se esporos dos microrganismos G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088 ao meio de cultivo semi-sólido, contendo o substrato arroz. Os esporos foram obtidos pela raspagem da superfície do meio de cultura (BDA), contendo a cultura esporulada, com alça de repicagem e a suspensão transferida para o meio de cultivo. Após a inoculação dos microrganismos ao meio de cultura, este foi incubado em estufa BOD, com temperatura de 25°C e umidade controlada. Com o objetivo de investigar se havia relação entre a produção de enzimas pectinolíticas e a idade das culturas, estas permaneceram em estufa durante 15 dias, sendo observadas diariamente. Foi avaliado o período de tempo necessário para uma produção enzimática considerada ótima para os microrganismos em estudo.

Após 15 dias da inoculação do agente biológico, foi determinada a atividade das enzimas pectinolíticas, seguindo-se as seguintes metodologias. Em seguida, foi selecionado o melhor agente biológico, para comparação com os produtores comerciais.

2.5 Pectinametilesterase

2.5.1 Obtenção do extrato enzimático da pectinametilesterase

O extrato enzimático foi obtido e determinado pelo método descrito por Buescher & Furmanski (1978).

2.5.1.2 Atividade da pectinametilesterase

A atividade da pectinesterase foi determinada por titulação dos grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina, devido à ação da enzima pectinametilesterase (PME), de acordo com o método descrito por Jen & Robinson (Jen & Robinson, 1984). Utilizou-se como substrato uma solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2N, pH 7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina, adicionada ao extrato enzimático, foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,01N, mantendo-se o pH 7,0 por 10 minutos. A unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalisar a desmetilação de pectina correspondente a 1 nanomol de NaOH, nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática por minuto por grama de peso fresco ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

2.5.2 Poligalacturonase

2.5.2.1 Obtenção do extrato enzimático da poligalacturonase

O extrato enzimático foi obtido e determinado pelo método descrito por Buescher & Furmanski (1978).

2.5.2.2 Atividade da poligalacturonase

A atividade da poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida dos grupos redutores liberados do ácido poligalacturônico, segundo metodologia de Pressey & Avants (Pressey & Avants, 1973). A atividade foi determinada

incubando-se o extrato enzimático com solução de ácido poligalacturônico a 0,25%, em tampão acetato de sódio 37,5 mM, pH 5, a 30°C, por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores foram determinados segundo a técnica descrita por Somogyi modificada por Nelson (Nelson, 1944), usando-se ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (UAE) foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a formação de um nanomol de ácido galacturônico por minuto de reação.

2.6 Microrganismos utilizados

2.6.1 Agente biológico “G088”

O agente biológico G088 é considerado um bom produtor enzimático, pois cresce facilmente em diferentes substratos (incluindo resíduos industriais), possui características de um microrganismo GRAS (ainda não foram encontrados efeitos prejudiciais à saúde do homem), não necessita de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo, pois se desenvolve bem em diversos resíduos industriais, além de produzir enzimas durante o seu metabolismo, as quais possuem inúmeras aplicações industriais. Isso faz com que esse agente apresente destaque na produção enzimática, bem como na sua posterior aplicação no setor comercial, quando comparado com outros microrganismos produtores de pectinases.

O G088 utilizado neste experimento é originado do café e foi obtido por meio de coletas em quatro regiões produtoras do estado de Minas Gerais, no período de maturação dos frutos: Sul de Minas, Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Zona da Mata. Foram realizadas várias coletas de frutos colonizados em cada região. Após as coletas, os frutos foram encaminhados para o laboratório da Epamig, onde ocorreram os isolamentos, a identificação e a purificação dos isolados. Esses isolados foram, então, avaliados separadamente,

quanto ao seu potencial de produção enzimática, no intuito de identificar o melhor isolado produtor de pectinases: poligalacturonase e pectinametilesterase. Após a identificação e a purificação do melhor isolado, denominado G088, foi realizada a inoculação no substrato padrão. O agente biológico não será divulgado por se tratar de objeto de patente, em fase de registro.

2.6.2 *Aspergillus niger*

Utilizou-se isolado do fungo, obtido da cafeicultura, cultivado em Minas Gerais. O isolado de *Aspergillus niger* era oriundo da micoteca do laboratório de isolamento de microrganismos da Epamig-CSTM. O fungo foi isolado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e, posteriormente, incubado em estufa do tipo *Biochemistry Oxygen Demand* (BOD) à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

2.6.3 *Rhizopus* sp.

Utilizou-se isolado do fungo, obtido da cafeicultura, cultivado em Minas Gerais. O isolado de *Rhizopus* sp. era oriundo da micoteca do laboratório de isolamento de microrganismos da Epamig-CSTM. O fungo foi isolado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e, posteriormente, incubado em estufa do tipo BOD, à temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.

2.7 Condições de cultivo

Nessa etapa, utilizou-se o arroz como substrato semi-sólido, o qual foi considerado como padrão para o crescimento e produção de enzimas pectinolíticas a partir dos microrganismos, agente biológico “G088”, *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro de 500 ml, previamente esterilizados. O meio de cultura foi preparado da seguinte forma:

- fez-se uma mistura composta de 70g de arroz com 70 ml de água. Essa mistura foi autoclavada, durante 30 minutos, até alcançar a completa esterilização da amostra;
- após esse período de esterilização, o meio de cultivo semi-sólido obtido foi resfriado à temperatura ambiente para posterior inoculação dos microrganismos: agente biológico “G088”, *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp.



2.8 Inóculo no meio de cultivo

A fermentação foi conduzida inoculando-se esporos dos microrganismos agente biológico "G088", *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp. ao meio de cultivo semi-sólido, contendo o substrato arroz. Os esporos foram obtidos pela raspagem da superfície do meio de cultura (BDA), contendo a cultura esporulada, com alça de repicagem e a suspensão transferida para o meio de cultivo. Após a inoculação dos microrganismos ao meio de cultura, este foi incubado em estufa BOD, com temperatura de 25°C e umidade controlada. Com

o objetivo de investigar se havia relação entre a produção de enzimas pectinolíticas e a idade das culturas, estas permaneceram em estufa durante 15, 22, 29 e 36 dias, sendo observadas diariamente. Foi avaliado o período de tempo necessário para uma produção enzimática considerada ótima para os microrganismos em estudo.



2.9 Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG)

A obtenção do extrato enzimático de poligalacturonase foi realizada pela técnica descrita por Buecher & Furmanski (1978).

Após o período de 15, 22, 29 e 36 dias de cultivo, foi determinada a atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida dos grupos redutores liberados do ácido poligalacturônico, segundo metodologia de Pressey & Avants (1973). Incubou-se o extrato enzimático com solução de ácido poligalacturônico a 0,25%, em tampão acetato de sódio, pH 5,0, a 30°C, por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores foram determinados segundo a técnica descrita por Somogyi, modificada por

Vilas Boas (1995). A unidade de atividade de PG (U) foi expressa em nmol de ácido galacturônico liberado por minuto de reação, sob as condições de ensaio.

2.10 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME)

O extrato enzimático de PME foi obtido por Buecher & Furmanski (1978).

A atividade de pectinametilesterase foi determinada, no 15º, 22º, 29º e 36º dias de fermentação, por titulação dos grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina, devido à ação da enzima pectinametilesterase (PME), de acordo com o método descrito por Jen & Robinson (1984). Utilizou-se, como substrato, uma solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2N, pH 7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina adicionada ao extrato enzimático foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,01N, mantendo-se o pH 7,0 por 10 minutos. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalizar a desmetilação da pectina correspondente a 1 nmol de NaOH por minuto, sob as condições de ensaio.

2.11 Delineamento experimental

Para analisar a variável índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com treze tratamentos e duas repetições.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

em que:

$$i = 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13;$$

Para analisar o melhor isolado de agente biológico, foram avaliadas as variáveis atividades PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min), sendo utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições e com sete isolados.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

em que:

$$i = 1,2,3,4,5,6,7;$$

Para analisar o agente biológico e os principais produtores convencionais, quanto à atividade PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, em esquema fatorial 3 x 4, consistindo de três gêneros de microrganismos e 4 tempos de inoculação.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \mu(i) + T(j) + \mu T(ij) + E(ij)$$

em que:

$$i = 1,2,3;$$

$$j = 1,2,3,4;$$

Os dados foram interpretados estatisticamente, por meio de variância (nível de significância de 5%). As médias para o desdobramento do fator qualitativo, gênero de fungo, dentro de cada tempo foram comparadas pelo teste de Scoot-Knot, a 5% e 1% de probabilidade. E os desdobramentos do fator do tempo de inoculação dentro de cada gênero de fungos foram analisados por meio de regressões polinomiais, sendo representadas pelas curvas com maior grau de significância.

Para todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho foi utilizado o software estatístico Sisvar[®] v 4.3 (Ferreira, 2004) e SAEG, descrito por Euclides (1983).

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk e o teste de homogeneidade de variância de Levene.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Os resultados representados na Tabela 2 demonstram a variabilidade quanto à velocidade de IVCM entre os isolados estudados, tendo sido observados dois grupos: os isolados G076, G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088, que apresentaram índices de velocidade de crescimento micelial estatisticamente superiores e os isolados G078, G083, G085 e G086, que apresentaram índices de velocidade de crescimento micelial inferiores.

TABELA 2 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de diferentes regiões (Lavras, Três Pontas e Patrocínio).

Isolado	IVCM (cm)
G076	0,415 a
G077	0,465 a
G078	0,300 b
G079	0,465 a
G080	0,465 a
G081	0,470 a
G082	0,465 a
G083	0,315 b
G084	0,500 a
G085	0,295 b
G086	0,310 b
G087	0,470 a
G088	0,460 a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott Knott, isolados de diferentes regiões (Lavras, Três Pontas e Patrocínio) (Ferreira, 2004).

As diferenças nas taxas de crescimento micelial verificadas podem ser atribuídas à variabilidade genética entre os isolados, devido as suas diferentes origens (Serra & Silva, 2005). Estes mesmos autores observaram resultados de

crescimento micelial diversificado para o mesmo microrganismo, por meio da observação de cinco isolados.

Ao contrário do que ocorre na caracterização de microrganismos fitopatogênicos, no caso presente, em que o objetivo é o aproveitamento do agente biológico para a produção de enzimas e como agente de bioproteção, é desejável a seleção de isolados que apresentem um crescimento vigoroso traduzido, entre outros fatores, por maiores valores de IVCN, concordando com as características descritas por Andrews (1985) e Wood & Tveit (1955).

Dessa forma, os isolados que apresentaram maiores índices de IVCN mostram-se mais adequados para a utilização em um processo de produção do agente de bioproteção e de enzimas em escala comercial.

Com relação à origem dos isolados, verifica-se que, embora as regiões Sul de Minas Gerais (Três Pontas e Lavras) e Alto Paranaíba (Patrocínio) apresentem diferenças climáticas marcantes que poderiam justificar a presença de diferenças quanto aos índices de IVCN observados, essas diferenças observadas não podem ser atribuídas a este fator, já que as duas regiões apresentaram isolados representativos de maiores e menores IVCN.

Com a finalidade de demonstrar a característica linear de crescimento dos isolados, realizou-se a análise das tendências apresentadas pelos valores de crescimento micelial apresentados pelos isolados durante o período de observação, conforme representado na Figura 4.

As diferenças estatísticas observadas demonstram que os isolados do agente biológico variam quanto à taxa de velocidade de crescimento micelial, justificando, para a finalidade de utilização para a produção comercial de enzimas, a seleção de isolados mais eficientes quanto ao crescimento micelial.

A variabilidade entre isolados quanto à capacidade de crescimento micelial ou de esporulação é comum entre microrganismos. Feitosa et al. (1987)

e Neto et al. (1994) encontraram grande variação nessas características, em isolados de cacau.

Nos gráficos encontram-se representadas as linhas de tendência de crescimento micelial dos isolados dentro do período estudado. Observa-se que, além das diferenças no crescimento micelial, as taxas de crescimento também variam, tendo-se observado que todos os isolados apresentaram, embora em diferentes intensidades, uma tendência linear de crescimento durante o período analisado.

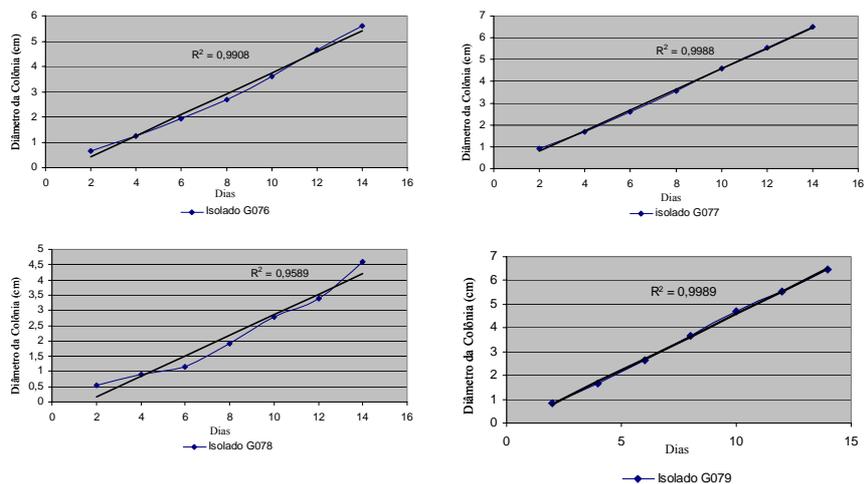
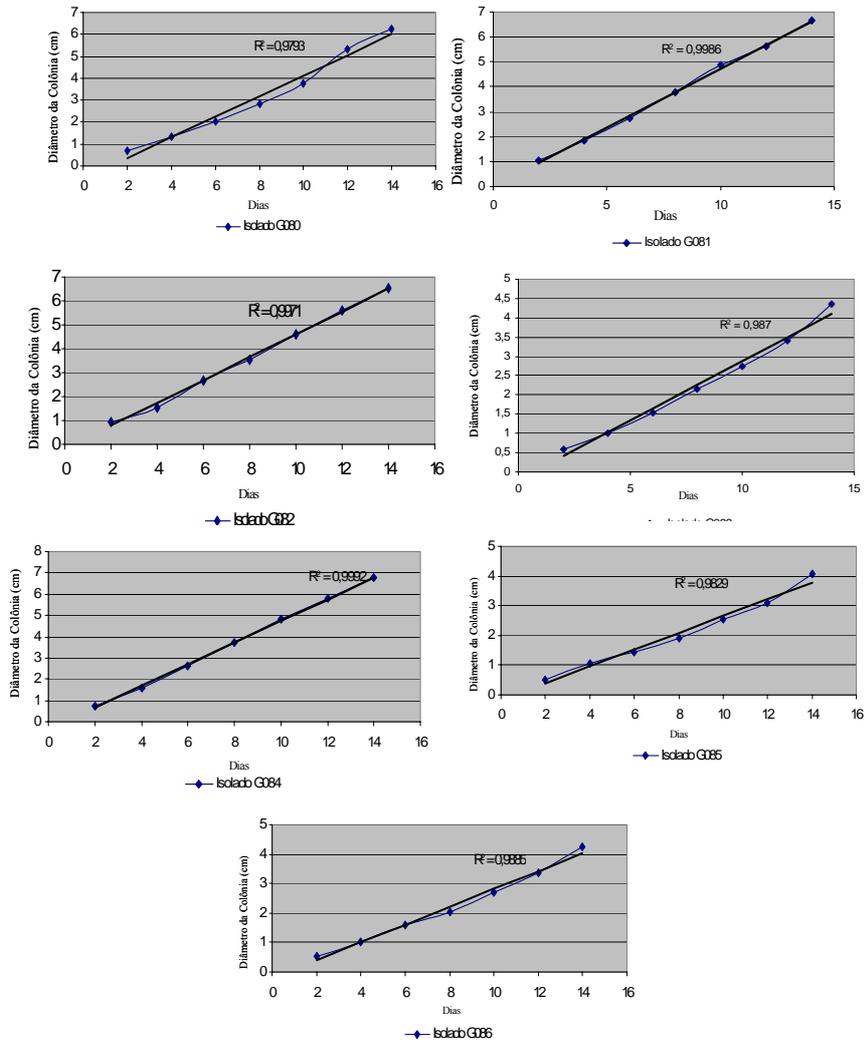


FIGURA 4 Gráficos referentes ao índice de crescimento dos isolados dos agentes biológicos por meio de regressão.

Os valores de R² descritos foram avaliados por meio de testes de regressão (Ferreira, 2004).

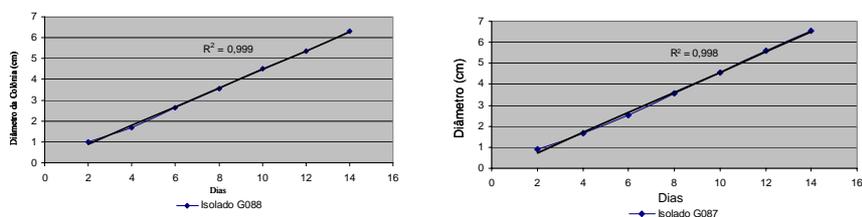
FIGURA 4 Continuação



Continua...

Os valores de R2 descritos foram avaliados por meio de testes de regressão (Ferreira 2004)

FIGURA 4 Continuação



Os valores de R2 descritos foram avaliados por meio de testes de regressão (Ferreira, 2004).

5.2 Atividade enzimática dos isolados de diferentes regiões

Os valores demonstrados na Tabela 3 indicam as diferenças nas atividades médias de produção de enzimáticas pécnicas (PME e PG) dos isolados de diferentes regiões, que apresentaram, por sua vez, melhor IVC.

Foram observados três grupos para a avaliação da atividade média da PME: o isolado G088, que apresentou atividade média superior aos demais para a produção de PME; os isolados G077, G080 e G082, que apresentaram atividade média inferior ao G088, porém sendo superiores aos demais isolados do terceiro grupo, e G079, G084 e G087, que foram considerados inferiores estatisticamente.

Para a atividade média de PG, também foram identificados três grupos: os isolados G082 e G088 apresentaram atividade média superior aos demais para a produção de PG; os isolados G079, G080, G081 e G084 apresentaram atividade média inferior aos isolados G082 e G088, porém, superiores ao isolado G077, que foi considerado estatisticamente inferior. Nota-se que, mesmo se fazendo o cultivo nas mesmas condições, existe um comportamento diferenciado entre isolado, quanto à eficiência na produção de PME e PG, mostrando a necessidade de se selecionar os melhores e preservá-los para exploração comercial, confirmando as observações de Bravo et al. (2000).

TABELA 3 Atividades médias de PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) dos isolados de diferentes regiões

Isolado	PME	PG
G077	833,33 b	17 c
G079	240 c	121 b
G080	758,33 b	116 b
G081	356,67 c	131 b
G082	716,67 b	175 a
G084	431,67 c	115 b
G087	430 c	159 a
G088	1333,33 a	146 a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

As diferenças nas taxas de produção de enzimas pécnicas verificadas podem ser atribuídas à variabilidade genética entre os isolados, devido às suas diferentes origens (Serra & Silva, 2005)

5.3 Crescimento das culturas, tempo de cultivo e produção de pectinases pelo agente biológico G088 e outros microrganismos utilizados comercialmente

Ao avaliar as características de crescimento das culturas, notou-se, por meio de observação visual, um crescimento dos microrganismos estudados. Até o 15º, o 10º e o 5º dia de incubação, verificou-se um aumento rápido do desenvolvimento dos isolados, respectivamente, para o agente biológico “G088”, *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp., preenchendo toda a superfície do substrato. Porém, após os dias citados, o desenvolvimento desses microrganismos sofreu um declínio. Este fato pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície da cultura estava coberta com uma fina camada micelial, pois os microrganismos já haviam colonizado toda a superfície do substrato, restando apenas as partes

intermediária e inferior do meio de cultivo. Outros fatores que podem explicar essa diminuição no crescimento é a redução de carboidratos disponíveis para o desenvolvimento dos mesmos, e ou a liberação de algum subproduto pelos microrganismos, resultante do seu metabolismo.

Apesar dos comportamentos diferentes, os microrganismos estudados foram capazes de crescer em meio de cultivo (arroz) e, portanto, produziram pectinases, durante seu metabolismo.

Visando avaliar essa propriedade, foram feitas análises para a verificação da produção de poligalacturonase e pectinametilesterase, por meio da determinação da atividade enzimática.

As atividades médias de pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) dos três microrganismos (*A. niger*, *Rhizopus* sp. e agente biológico “G088”), nos diferentes tempos de cultivo encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 Atividade média de PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min) dos três microrganismos, nos diferentes tempos de cultivos.

Atividades	Tempo (dias)	Espécies		
		<i>A. niger</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	Agente biológico
PME	15	216,67 c	800,00 b	1.533,33 a
	22	216,67 c	650,00 b	1.566,67 a
	29	283,33 c	783,33 b	1.633,33 a
	36	383,33 c	683,33 b	1.500,00 a
PG	15	200,14 a	134,33 b	227,05 a
	22	185,39 b	97,58 c	327,33 a
	29	159,55 b	98,24 c	251,29 a
	36	112,45 b	96,61 b	290,68 a

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (Ferreira, 2004).

A atividade de PME foi maior ($P < 0,05$) para o agente biológico “G088”, em todos os tempos de cultivo. Isso indica que o mesmo é um bom produtor dessas enzimas, pois, nas mesmas condições de cultivo, proporcionou oito vezes

mais atividade de PME que o *A. niger* e cerca de duas vezes maior atividade do *Rhizopus* sp.

Com relação aos outros microrganismos estudados, atividade de PME foi maior ($P < 0,05$) para o *Rhizopus* sp. que para o *Aspergillus niger*, em todos os tempos de cultivo, denotando uma superioridade do primeiro em relação ao segundo.

Quanto à atividade de PG, observou-se que, com 15 dias de cultivo, esta atividade enzimática foi semelhante para o *Aspergillus niger* e o agente biológico “G088” e inferior para o *Rhizopus* ($P < 0,05$). Nos demais tempos de cultivo, o agente biológico “G088” apresentou maior atividade de PG que os demais microrganismos estudados.

Assim como o pH e a temperatura podem influenciar no crescimento microbiano, a idade da cultura pode determinar a produção das enzimas pectinolíticas. De acordo com Brumano et al. (1993), a idade do inóculo influenciou a síntese de enzimas pectinolíticas, mas não alterou a massa micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus alliaceus*. Assim, a produção das enzimas pode estar diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra e esta cultura pode estar em diferentes fases de maturação, quando associada ao meio de cultivo, tais como: crescimento exponencial, fase estacionária ou decrescente.

Siessere (1991) verificou que, em culturas mantidas em condição estacionária, teve-se uma pequena produção de PME e PG no primeiro dia de incubação. A primeira atingiu os maiores níveis no segundo dia de cultivo e sua atividade decresceu após o 4º dia de cultivo, enquanto a segunda manteve-se estável a partir do segundo dia. Isso pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície de cultura estava coberta com uma fina camada micelial.

Aos 22 e 29 dias de cultivo, o *Rhizopus* apresentou menor ($P < 0,05$) atividade de PG que o *Aspergillus niger* e, aos 36 dias de cultivo, estes dois microrganismos se igualaram na atividade de PG.

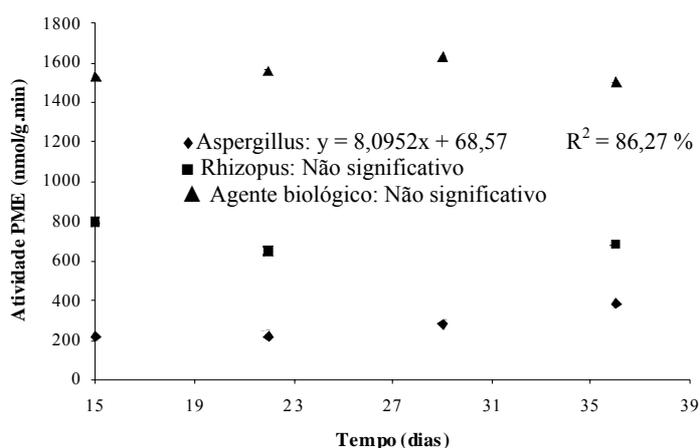


FIGURA 5 Atividade de PME, ao longo dos tempos de cultivo para *Aspergillus niger*.

Observou-se um efeito linear ($P < 0,05$), tendo, à medida que aumentou o tempo de cultivo, ocorrido também um aumento na atividade de PME.

Para os outros microrganismos, esse efeito não foi observado ($P < 0,05$), ou seja, os resultados médios não se ajustaram a modelos que propiciaram um estudo mais aprofundado do comportamento dos mesmos.

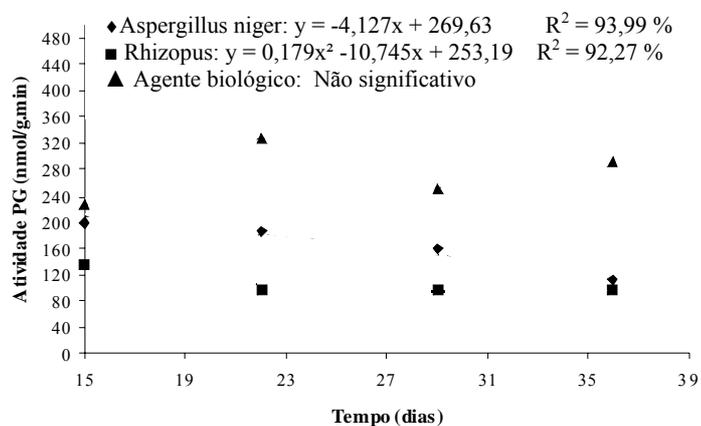


FIGURA 6 Atividade de PG ao longo dos tempos de cultivo para os fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus*.

Para o *Aspergillus niger*, observou-se um efeito linear dos tempos de cultivo sobre a atividade de PG ($P < 0,05$), tendo a atividade de PG diminuído a partir de 15 dias.

Siéssere (1991), estudando a influência de diferentes fatores sobre a produção de pectinases de *Penicillium frequentans*, observou uma redução na atividade enzimática com o tempo de cultivo, sugerindo que houve ou repressão da síntese das enzimas pectinolíticas ou inibição da atividade das mesmas, por um ou mais produtos metabólicos da degradação enzimática da pectina.

Alguns autores sugerem um mecanismo de regulação enzimática em fungos, que consiste no bloqueio da produção de enzimas quando é alcançada uma determinada proporcionalidade entre concentração de enzima e número de células (Soares et al., 2001). Outro fato que pode ser considerado para explicar a redução na atividade de PG é a inibição da síntese da enzima pelo produto final de sua ação, o ácido galacturônico. Segundo Spalding et al. (1973), a produção

de PG por *Penicillium expansum* foi reprimida por aminoácidos e açúcares, incluindo o ácido galacturônico.

Com relação ao Rhizopus, observou-se um efeito quadrático ($P < 0,05$), diminuindo até os 25 dias (ponto de mínimo) e, em seguida, voltou a aumentar suavemente, até os 36 dias de cultivo.

Pode-se deduzir que, a partir do momento em que a síntese enzimática é suspensa, ocorre degradação da enzima por proteases extracelulares. Porém, como, provavelmente, o crescimento do fungo continua, pode-se concluir que, por causa da nova alteração na relação enzima/célula, é reiniciada a produção enzimática, alcançando níveis mais elevados de atividade, em razão do maior número de células no meio. Vale (1996), avaliando atividade de pectina liase (PL), também observou o decréscimo de PL no meio, após 36 horas de cultivo, e a retomada da produção enzimática.

Yurkerich, citado por Schnidt et al. (1995), propõe sistema de regulação em que a produção das enzimas extracelulares é controlada nas vias sintéticas intracelulares por retroalimentação. Este autor relata que a síntese dessas enzimas é suspensa quando uma relação entre a concentração de enzimas e o número de células, no meio, é alcançada. Este processo é mediado por receptores presentes na superfície das células que, provavelmente, interagem com a molécula da enzima, desencadeando o processo de repressão. Segundo o autor, este sistema de repressão ocorre em tradução.

A atividade de PG do agente biológico “G088”, ao longo do tempo de cultivo, não se apresentou significativa ($P < 0,05$), não se ajustando a modelos que possibilitassem uma melhor aplicação para os valores obtidos. Entretanto, os pontos observados representados no gráfico comprovam as observações quanto à relação enzima/célula e ao reinício da produção.

Martin et al. (2004) utilizaram resíduo industrial como substrato para a produção de pectinases por *Penicillium* sp. EGC5, o qual apresentou um pico na

produção de PG no 8º dia de cultivo, porém, outra linhagem de fungo inoculada no mesmo substrato apresentou máxima produção de PG no 3º e 4º dias de cultivo. Sabendo que o meio de cultura utilizado interfere no tempo ótimo para a produção enzimática, Silva et al. (2002) estudaram a relação entre substrato e tempo de cultivo na produção de PG por *Penicillium viridicatum* Rfc3, constatando que o pico de produção de PG esteve entre 4º e 6º dia de cultura, quando o substrato era bagaço de cana-de-açúcar. Em meio composto de bagaço de laranja, farelo de trigo e milho, o pico de produção enzimática de PG e PME foi no 12º dia de fermentação. Assim, observa-se que o período ótimo para produção enzimática é bastante variável, de acordo com o microrganismo e o meio de cultura utilizado.

Outra razão para a estabilização e a diminuição na atividade pectinolítica, observada após um período de tempo específico para cada microrganismo, pode estar relacionada ao consumo de algum composto essencial, ao aparecimento de um inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (Barnby et al., 1990).

Outro fator que deve ser observado no cultivo de microrganismos é a concentração de nutrientes, pois esta pode afetar a velocidade de crescimento celular (Bravo, 2000).

Diferentes fontes de carbono podem influenciar no crescimento de microrganismo, como também na sua produção enzimática. Brumano et al. (1993), estudando a produção de poligalacturonase (PG) por *Aspergillus niger*, verificaram que a enzima foi produzida em meios contendo combinações de pectina e glicose.

De acordo com Silva et al. (2002), a síntese de pectinases por fungo está sujeita à repressão catabólica por grande concentração de açúcar, afetando a indução e a constituição enzimática. O efeito de diferentes fontes de carbono na síntese de pectinases por fungos cultivados em meio sólido tem sido muito

estudado e os resultados mostram que o meio ótimo para a produção de pectinases extracelular é o que possui substâncias pécicas como um indutor (Naidu & Panda, 1998).

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foi realizado este trabalho conclui-se que:

. os agentes biológicos G076, G077, G079, G080, G081, G082, G084, G087 e G088 apresentaram resultados de IVCN superiores aos dos demais isolados;

. o agente biológico G088 apresentou índices médios superiores para a produção de enzimas pectinolíticas (PME e PG);

. o agente biológico G088 apresentou produção superior de PG e PME em todos os tempos observados, em comparação com o *A. niger* e *Rhizopus* sp.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, J. H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C. L.; LINDON, S. E. **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p. 31-44.

BARNBY, F. M.; MORPHETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, Woborn, v 12, n. 11, p. 891-897, Nov. 1990.

BRAVO, C. E. C.; de CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 137-152, 2000. Edição especial.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 225-228, Mar. 1993.

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 264-266, Jan./Feb. 1978.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Stanford, v. 24, p. 270-276, 1939.

EUCLIDES, R. F. **Manual de utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatística e Genética)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 1983. 59 p.

FEITOSA M. I. et al. Estudo comparativo de diversas culturas de *Colletotrichum* isolado de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1/4, p. 17-25, 1987.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. P. Pectinolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum L.*). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 1045-1087, July/Aug. 1984.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept./Oct. 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid – state fermentation using agro industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819, sept./Oct. 2004.

NAIDU, G. G. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes- a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 19, n. 5, p. 355-361, Nov. 1998.

NETO, E. F.; NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J. C. **Influencia de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporoides*, obtidos por *Passiflora****. Jaboticabal: UNESP. Departamento de defesa fitossanitaria e de fitotecnia. Jaboticabal, SP, 1994.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annum L.*)**, 1991. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Separation and characterization the exopolygalacturonase e endopolygalacturonase from peaches. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 252-256, Sept. 1973.

SCHMIDT, O.; ANGERMANN, H.; FROMMHOLD-TREU, I.; HOPPE, K. Experimental and theoretical investigation of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiological and Biotechnology**, New York, v. 43, n. 3, p. 424-430, July 1995.

SERRA, I. L. K. A.; SILVA, G. S. **Caracterização Biológica e Fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* Obtidos de Pimentão no estado do Maranhão.**

2005. Maranhão: Universidade Estadual do Maranhão. Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, São Luís, MA.

SIÉSSERE, V. **Otimização das Condições de Cultivo para Produção e Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans***. 1991. 118 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; Da SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

SOARES, M. M. C. N.; Da SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potencial application on juice extraction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

SPALDING, D. H.; WELLS, J. M.; ALISSON, D. W. Catabolite repression of polygalacturonase, pectin lyase, and cellulose synthesis in *Penicillium expansum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 7, p. 840-844, July 1973.

VALE, R. H. P. **Influência das condições de cultivo na produção de pectinase por *Penicillium griseoroseum* em biorreatores**. 1996 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VILAS BOAS, E. V. de b. **Modificações pós-colheita de banana 'prata' (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* grupo AAB) γ -irradiada**. 1995. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WOOD, R. K. S.; TVEIT, M. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. **The Botanical Review**, Brronx, v. 21, n. 4, p. 441-492, Oct./Dec. 1955.

CAPÍTULO 3

SELETIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS AO AGENTE BIOLOGICO “G088”

RESUMO

MENESES, Alisson Gonçalves. In: _____. **Seletividade de produtos fitossanitários ao agente biológico“G088”**. 2007. Cap. 3, p. 75-93. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Os cafezais apresentam muitas espécies de insetos, ácaros e fungos, algumas das quais são pragas de importância econômica, enquanto a maioria não chega a causar prejuízo, por serem mantidas sob controle por inimigos naturais. Existem, atualmente, no mercado, inúmeras substâncias químicas empregadas no controle de pragas e doenças, sendo os inseticidas e os fungicidas um grupo numeroso e destacado. Entretanto, as consequências da sua utilização não são unicamente positivas. A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos desenvolvem tolerância a esses compostos. Este processo pode ser devido a vias metabólicas alternativas ou reações enzimáticas insensíveis à inibição por esses agrotóxicos. Objetivou-se, com este trabalho, testar a seletividade de produtos (defensivos) usualmente utilizados na cafeicultura, visando à preservação de agente biológico G088 bioprotetor da qualidade do café. Não houve efeito inibitório ao IVCM significativo dos tratamentos, Biopiról (T 10) e Envidor (T 14) sobre o agente biológico G088. Os demais tratamentos inibiram, parcial ou totalmente, o crescimento do agente biológico G 088. Não existiu porcentagem de inibição significativa dos tratamentos, Biopiról (T 10) e Envidor (T 14) sobre o agente biológico G088. Os demais tratamentos inibiram, parcial ou totalmente, o crescimento do agente biológico G 088.

* Comitê de Orientação: Sára Maria Chalfoun - EPAMIG (Orientadora); Carlos José Pimenta - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

ABSTRACT

MENESES, ALISSON GONÇALVES. Selectivity of phytosanitary products to the biologic agent “GO88”. 2007. Chap. 3, p. 75-93 . Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil* .

The coffee plantations present a lot of species of insects, acarids and fungi, some of which are pests of economic importance whilst the majority does not get to cause loss for being maintained under control by natural enemies. There are, at present, on market a number of chemicals employed in the control of pests and diseases, insecticides and fungicides being a numerous and little and outstood group. However, the consequences of their use are not only positive. The selectivity of agrotoxic chemicals is a process in which organisms develop tolerance to these compounds. This process can be due to the alternative metabolic pathways or enzymatic reactions insensitive to the inhibition by these agrotoxic products. It was intended in this work to test the selectivity of the chemicals (defensives) usually utilized in coffee growing, aiming at the preservation of the biologic agent GO88 bioprotector of coffee quality. There were no significant inhibitory effects on the IVCN of the treatments Biopiroal (T 10) and Envidor (T 14) on the biologic agent GO88, the other treatments inhibited partially or wholly the growth of the biologic agent G 088. There was no percentage of significant inhibition of the treatments Biopiroal (T 10) and Envidor (T 14) on the biologic agent GO88, the other treatments inhibited partially or completely the growth of the biologic agent G 088.

* Guidance Committee: Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser); Carlos José Pimenta – UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – EPAMIG.

1 INTRODUÇÃO

Os cafezais apresentam muitas espécies de insetos, ácaros e fungos, algumas das quais são pragas de importância econômica, enquanto a maioria não chega a causar prejuízo, por ser mantida sob controle por inimigos naturais (Bustillo 1990). O ressurgimento de pragas-chave, o aparecimento de pragas secundárias e a resistência de pragas pelo uso contínuo do controle químico nos agroecossistemas estão relacionados à destruição de agentes de controle natural e levam, inevitavelmente, ao aumento nas doses dos produtos químicos e agravamento da situação (Bosch et al., 1982, Bustillo, 1990).

Existem, atualmente, no mercado, inúmeras substâncias químicas empregadas no controle de pragas e doenças, sendo os inseticidas e os fungicidas um grupo numeroso e destacado. Entretanto, as consequências da sua utilização não são unicamente positivas. Muitos desses compostos químicos são tóxicos ao homem e animais e, também do ponto de vista ambiental, acarretam diminuição do potencial de controle efetuado por predadores, parasitóides e patógenos. O controle integrado, com a utilização de produtos fitossanitários seletivos em conjunto com fungos entomopatogênicos ou outros agentes de controle biológico, pode ser uma estratégia mais segura e eficiente. Entretanto, alguns produtos fitossanitários podem afetar o crescimento vegetativo, a viabilidade e a conidiogênese dos fungos entomopatogênicos, ou, até, alterar sua composição genética, acarretando modificações na sua virulência (Alves et al., 1998).

Os estudos sobre o efeito dos agrotóxicos sobre os entomopatógenos são conduzidos, na maioria, em laboratório. Ignoffo et al. (1975) estudaram alguns produtos químicos em meio de cultura e observaram que todos os fungicidas testados e alguns inseticidas e herbicidas inibiram o crescimento e a virulência desses fungos. Mais recentemente, estudos com produtos como tiametoxam e

imidaclopride, neonicotinóides de última geração, detectaram a capacidade estressora desses produtos, que reflete na mudança do comportamento do inseto, possibilitando a ação rápida e fácil dos fungos entomopatogênicos. Esses inseticidas têm se mostrado seletivos aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) (Holm ex SF Gray) e *Verticillium lecanii* (Zimmerman) (Batista Filho et al., 2001; Moino Jr. & Alves, 1998).

Controle biológico pode ser definido como redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes das doenças provocadas por um patógeno ou parasita nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou por meio da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (Baker & Cook, 1974).

A seletividade de agrotóxicos é um processo em que organismos desenvolvem tolerância a esses compostos. Este processo pode ser devido a vias metabólicas alternativas ou reações enzimáticas insensíveis à inibição por esses agrotóxicos (Pelczar et al., 1980). Outros mecanismos de tolerância de microrganismos a pesticidas podem incluir a inibição competitiva entre um metabólito essencial e um análogo (pesticida); ao desenvolvimento de via metabólica alternativa que evite alguma reação normalmente inibida pelo pesticida; à produção de uma enzima alterada para funcionar em benefício da célula, mas não sendo afetada pelo pesticida; à síntese de uma enzima, em excesso, ultrapassando a quantidade que pode ser inativada pelo antimicrobiano; à dificuldade do agrotóxico em penetrar na célula, por alguma alteração da membrana citoplasmática e à modificação estrutural das nucleoproteínas ribossômicas (Cook, 1985; Pelczar et al., 1980).

Objetivou-se, com este trabalho, testar a seletividade de produtos (defensivos) usualmente utilizados na cafeicultura, visando à preservação de agente biológico G088, bioprotetor da qualidade do café.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foi utilizado o agente biológico G088, obtido da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais Epamig/CTSM, localizado no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), local no qual foi realizado o experimento. O efeito de produtos fitossanitários químicos (Tabela 5) sobre o agente biológico foi estudado avaliando-se o índice de crescimento micelial (IVCM) na presença ou na ausência dos princípios ativos e na porcentagem de inibição de crescimento (% inibição) do agente biológico G088.

A adição dos produtos foi feita no meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) ainda líquido ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), de modo que a concentração final do produto no meio obedecesse às recomendações de cada fabricante, para a cultura do café. Em seguida, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Foram preparadas três placas por tratamento. Foi inoculado um disco contendo G088, com alça de repicagem. Após a inoculação do G088 ao meio de cultura, este foi incubado em estufa BOD, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foi realizada a medição do diâmetro das colônias, semanalmente.

O tratamento T 01 foi constituído pelo tratamento testemunha que não teve qualquer adição de produto fitossanitário ao meio de cultura para avaliação do IVCM e porcentagem de inibição.

TABELA 5 Produtos fitossanitários químicos, em sua maioria, registrados para a cultura do café, utilizados nos testes de seletividade.

Tratamento	Nome comercial	Grupo químico	Categoria
T 02	Oxicloreto de cobre (1/2) dose	Oxicloreto de cobre	Fungicida
T 03	Oxicloreto de cobre	Oxicloreto de cobre	Fungicida
T 04	Viça café (1/2) dose	Micronutrientes, sulfato de cobre	Fertilizante foliar
T 05	Viça café dose inteira	Micronutrientes, sulfato de cobre	Fertilizante foliar
T 06	Opus (1/2) dose	Epoxiconazol	Fungicida sistêmico
T 07	Opus dose inteira	Epoxiconazol	Fungicida sistêmico
T 08	Garant BR	Hidróxido de cobre	Fungicida/bactericida
T 09	Alto 100	Ciproconazol	Fungicida
T 10	Biopiról	Pyriphosforico	Fertilizante/inseticida
T 11	Cartap BR 500	Cloridrato de cartape	Fungicida/inseticida
T 12	Sulfato de cobre	Sulfato de cobre	Fungicida
T 13	Neoron	Bromopropylate	
T 14	Envidor	Espirodiclofeno	Acaricida
T 15	Torque 500 SC	Fenutatin oxide	Acaricida
T 16	Savey PM	Hexitiazoxi	Acaricida
T 17	Thiodan CE	Endosolfan	Acaricida/inseticida
T 18	Procalin	Emamectin	
T 19	Kumulus DF	Enxofre	Acaricida/fungicida
T 20	Vertimec 18 CE	Abamectina	Acaricida/inseticida
T 21	Peropal 250 PM	Azocyclotin	Acaricida
T 22	Caligur	Azociclotina	Acaricida
T 23	Lorsban 480 BR	Clorpirifós	Acaricida/inseticida
T 24	Kelthane 480	Dicofol	Acaricida
T 25	Karathane CE	Dinocap	Acaricida
T 26	Omite 720 CE	Propargito	Acaricida
T 27	Sanmite	Piridabem	Acaricida
T 28	Thiovit Sandoz	Enxofre	Acaricida
T 29	Deltaphos EC	Deltametrina, triazophos	Acaricida/inseticida

Os valores do índice de velocidade de crescimento foram determinados por meio da seguinte fórmula descrita por Maquire, adaptado por Oliveira (1991):

- IVCN = índice de velocidade de crescimento micelial.
- $IVCM = (D - Da)/N$
- D = diâmetro médio atual
- Da = diâmetro médio anterior
- N = número de dias

A porcentagem de inibição do agente biológico G088 foi determinada pelo crescimento do tratamento T 01 (testemunha), que foi considerado como 100% de crescimento. A partir daí, foi determinada a porcentagem de inibição dos produtos fitossanitários ao agente biológico G088.

2.1 Delineamento experimental

Para analisar a variável IVCN, no teste de seletividade, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 29 tratamentos e 3 repetições.

Para analisar a variável da porcentagem de inibição dos produtos fitossanitários ao agente biológico G088, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 29 tratamentos e 3 repetições.

Os dados foram interpretados estatisticamente, por meio de variância (nível de significância de 5%). As médias para o desdobramento do fator qualitativo, gênero de fungo, dentro de cada tempo, foram comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% e 1% de probabilidade. Para todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho foi utilizado o software estatístico Sisvar[®] v 4.3 (Ferreira, 2004).

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

em que:

$$i = 1,2,3,4,5,6,7,\dots, 29;$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento vegetativo (IVCM) a produtos fitossanitários do agente biológico G088

Os resultados referentes à seletividade dos produtos testados expressos quanto ao IVCM encontram-se representados na Tabela 6.

Com base nos dados representados na Tabela, verifica-se que não houve efeito inibitório ao IVCM significativo dos tratamentos, Biopiról (T 10) e Envidor (T 14) sobre o agente biológico G088, sendo as médias dos tratamentos semelhantes às da testemunha (Tabela 6) e apresentando-se estatisticamente superiores aos demais produtos testados.

Esses números reforçam um comportamento que tem sido comum em trabalhos que seguem essa metodologia de avaliação do efeito de produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos *in vitro*, como o de Alves et al. (1998) e o de Batista Filho et al. (2001). Moino Jr. & Alves (1998) levantaram a hipótese de que o microrganismo, num mecanismo de resistência fisiológica, pode metabolizar os princípios tóxicos dos ingredientes ativos, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo. Outra possibilidade, ainda, é a de que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com seres vivos em geral, utilize todo o seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altera seu ambiente e prejudica o seu desenvolvimento, resultando, assim, em maior crescimento vegetativo.

TABELA 6 Índices de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários

Tratamento	Nome comercial	Media final IVCM(cm)
T 01	Testemunha	0,19 a
T 02	Oxicloreto de cobre (1/2) dose	0,11 b
T 03	Oxicloreto de cobre	0,06 c
T 04	Viça café (1/2) dose	0,06 c
T 05	Viça café	0,03 c
T 06	Opus (1/2) dose	0,00 c
T 07	Opus	0,00 c
T 08	Garant	0,07 c
T 09	Alto 100	0,00 c
T 10	Biopiról	0,21 a
T 11	Cartap 500	0,00 c
T 12	Sulfato de cobre	0,00 c
T 13	Neoron	0,10 b
T 14	Envidor	0,17 a
T 15	Torque	0,08 c
T 16	Savey	0,13 b
T 17	Thiodan	0,10 b
T 18	Procalin	0,13 b
T 19	Kumululus	0,12 b
T 20	Vertmec	0,12 b
T 21	Peropal	0,06 c
T 22	Caligur	0,04 c
T 23	Lorsban	0,10 b
T 24	Kelthane	0,10 b
T 25	Karathane	0,05 c
T 26	Omite	0,10 b
T 27	Sanmite	0,06 c
T 28	Thiovit	0,14 b
T 29	Deltaphos	0,07 c

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (Ferreira, 2004)

Thiovit (T 28), Omite (T 26), Kethane (T 24), Lorsban (T 23), Vertimec (T 20), Kumulus (T 19), Procalin (T 18), Thiodan (T 17), Savey (T 16), Neoron (T 13) e oxicloreto de cobre (1/2) dose (T 04) causaram redução no IVCM no diâmetro das colônias do agente biológico G088, sendo inferiores

estatisticamente aos tratamentos (T 01, T 10 e T 14) e superiores estatisticamente aos demais produtos testados.

Opus (1/2) dose (T 06), Opus (T 07), Alto 100 (T 09), Cartap 500 (T 11) e sulfato de cobre (T 12) não apresentaram crescimento das colônias fúngicas, afetando, assim, o crescimento do agente biológico G 088, de maneira geral. Observou-se que o crescimento vegetativo do agente biológico G088 foi quase extinto com os tratamentos oxiclureto (T 03), Viça Café (1/2) dose (T 04), Viça Café (T 05), Garant BR (T 08), Torque (T 15), Peropal (T 21), Caligur (T 22), Karathane (T 25), Sanmite (T 27) e Deltaphos (T 29), porém, o crescimento micelial a que foram submetidos esses produtos quase cessaram, não diferindo estatisticamente dos tratamentos T 09, T 11 e T 12, que foram considerados inferiores estatisticamente para a seletividade a esses produtos.

Loria et al. (1983), estudando o efeito de metalaxil sobre diferentes fungos, observaram que esse produto proporcionou o crescimento da colônia e a produção de conídios em *P. fumosoroseus*, não havendo crescimento dos demais fungos estudados. Entretanto, a inibição do crescimento micelial não é necessariamente um indicador da redução na esporulação ou da viabilidade conidial e vice-versa (Zimmermann, 1975).

3.2 Avaliação da porcentagem de inibição a produtos fitossanitários do agente biológico G088

Não ocorreu porcentagem de inibição significativa dos tratamentos, Biopiról (T 10) e Envidor (T 14) sobre o agente biológico G088. As médias dos tratamentos foram semelhantes às da testemunha (Tabela 7), apresentando-se estatisticamente superiores aos demais produtos testados.

TABELA 7 Índices de % de inibição do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários

Tratamento	Nome comercial	Média final % de inibição pelos produtos fitossanitários
T 01	Testemunha	0,00% a
T 02	Oxicloreto de cobre (1/2) dose	42,11% c
T 03	Oxicloreto de cobre	70,13% d
T 04	Viça café (1/2) dose	70,13% d
T 05	Viça café	84,21% e
T 06	Opus (1/2) dose	100,00 f
T 07	Opus	100,00 f
T 08	Garant	63,16 d
T 09	Alto 100	100,00 f
T 10	Biopiról	0,00% a
T 11	Cartap 500	100,00% f
T 12	Sulfato de cobre	100,00% f
T 13	Neoron	47,37% c
T 14	Envidor	12,28% a
T 15	Torque	64,91% d
T 16	Savey	31,58% b
T 17	Thiodan	47,37% c
T 18	Procalin	47,37% c
T 19	Kumulús	38,59% b
T 20	Vertmec	36,84% b
T 21	Peropal	68,42% d
T 22	Caligur	73,58% d
T 23	Lorsban	47,37% c
T 24	Kelthane	47,37% c
T 25	Karathane	73,58% d
T 26	Omite	47,37% c
T 27	Sanmite	68,38% d
T 28	Thiovit	26,32% b
T 29	Deltaphos	63,16% d

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, a 1% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (Ferreira 2004)

Thiovit (T 28), Vertimec (T 20), Kumulus (T 19) e Savey (T 16) causaram aumento da inibição do crescimento do agente biológico G088, sendo inferiores estatisticamente aos tratamentos (T 01, T 10 e T 14) e superiores estatisticamente aos demais produtos testados.

Esses números reforçam um comportamento que tem sido comum em trabalhos que seguem essa metodologia de avaliação do efeito de produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos *in vitro*, como o de Alves et al. (1998) e Batista Filho et al. (2001). Moino Jr. & Alves (1998) levantaram a hipótese de que o microrganismo, num mecanismo de resistência fisiológica, pode metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo. Outra possibilidade, ainda, é a de que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com seres vivos em geral, utilize todo o seu esforço reprodutivo, quando em presença de um princípio tóxico que altera seu ambiente e prejudica o seu desenvolvimento, resultando, assim, em maior crescimento vegetativo.

Omite (T 26), Kethane (T 24), Lorsban (T 23), Procalin (T 18), Thiodan (T 17), Neoron (T 13) e oxiclreto de cobre (1/2) dose (T 04) causaram aumento da % de inibição do agente biológico G088, sendo inferiores estatisticamente aos tratamentos (T 01, T 10, T 14, T 16, T 19, T 20 e T 28) e superiores estatisticamente aos demais produtos testados.

Oxiclreto (T 03), Viça Café (1/2) dose (T 04), Garant BR (T 08), Torque (T 15), Peropal (T 21), Caligur (T 22), Karathane (T 25), Sanmite (T 27) e Deltaphos (T 29) causaram aumento da % de inibição do agente biológico G088, sendo inferiores estatisticamente aos tratamentos (T 01, T 04, T 10, T 13, T 14, T 16, T 17, T 18, T 19, T 20, T 23, T 24, T 26 e T 28) e superiores estatisticamente aos demais produtos testados.

Viça Café (T 05) causou aumento da % de inibição do agente biológico G088, sendo inferior estatisticamente aos tratamentos (T 01, T 03, T 04, T 08, T 10, T 13, T 14, T 15, T 16, T 17, T 18, T 19, T 20, T 21, T 22, T 23, T 24, T 25, T 26, T 27, T 28 e T 29) e superior estatisticamente aos demais produtos testados.

Opus (1/2) dose (T 06), Opus (T 07), Alto 100 (T 09), Cartap 500 (T 11) e sulfato de cobre (T 12) elevaram a 100% o nível de inibição, cessando, assim, o crescimento das colônias e afetando o crescimento do agente biológico G 088 de maneira geral, apresentado-se, dessa forma, estatisticamente inferior aos demais tratamentos.

A associação de métodos de controle químico e biológico pode ser obtida, desde que a população de antagonistas (G088) seja menos afetada pelos produtos fitossanitários do que o patógeno, ou que os antagonistas sejam capazes de colonizar, mais rapidamente que o patógeno, a superfície da planta após o tratamento químico (Bollen, 1982).

4 CONCLUSAO

Nas condições em que foram realizadas as avaliações, conclui-se que:

. Os produtos químicos Biopiról (T 10) e Envidor (T 14) foram os mais seletivos quanto ao índice de velocidade de crescimento micelial e % de inibição do crescimento do agente biológico G088;

. Os demais produtos químicos foram os menos seletivos quanto ao índice de velocidade de crescimento micelial e % de inibição do crescimento do agente biológico G088, inibindo, assim, seu crescimento, parcial ou completamente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As avaliações dos isolados devem continuar, a fim de obterem-se, constantemente, melhores produtores enzimáticos e bioprotetores para as culturas regionais.

Novos experimentos devem ser realizados a fim de consolidar a produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico G088, para uma melhor otimização no processo enzimático e purificação destas enzimas.

Novos testes devem ser realizados para a determinação do tempo ideal de produção de cada microrganismo, para se avaliar, com mais precisão, os índices produtivos do agente biológico G088 com relação aos produtores convencionais.

Novos testes de seletividade devem ocorrer para que os produtores obtenham informações sobre os produtos que afetam agentes bioprotetores, a fim de que as culturas tenham sempre a disponibilidade de produtos que afetem o mínimo o equilíbrio do meio ambiente.

Como não se pode dispensar o uso de produtos químicos nas culturas, que inibam a presença do agente biológico G088, este pode ser novamente adicionado ao meio, para que a qualidade da cultura não se perca, uma vez que ele é um bioprotetor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B.; MOINO JR. , A.; ALMEIDA, J. E. M. . Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, Sept. 2001.

BOLEN, G. J. Fungicide resistance and microbial balance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S. G. **Fungicide resistance in crop protection**. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. p. 161-176.

BUSTILLO, A. E. P. El control biológico como un componente en un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. In: CONFERENCIA CONGRESSO DE SOCOLEN, 20., 1990, Cali. **Memórias...** Cali, 1990. p. 159-164.

COOK, R. J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, n. 1, p. 25-29, Jan. 1985.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L.; GARCIA, C.; PINNELL, R. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomurae rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 4, n. 4, p. 765-768, Aug. 1975.

LORIA, R.; GALAINI, S.; ROBERTS, D. W. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. **Environmental Entomology**, Lanhan, v. 12, n. 6, p. 1724-1726, Dec. 1983.

MOINO JR., A.; ALVES, S. B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da**

Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 27, n. 4, p. 611-620, Aug. 1998.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plantulas de pepino (*Cucumis sativus L.*) e pimentão (*Capsicum annum L.*)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

PELCZAR, M.; REIDS, R.; CHAN, E. C. S. (Ed.) **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. 566 p.

van den BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. Naturally occurring biological control and integrated control. In: van den Bosch, R. (Ed.). **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. p. 165-184.

ZIMMERMANN, G. Über die wirkung systemischer fungizide auf verschiedene insektenpathogene fungi imperfecti *in vitro*. **Nachrichtenbl. Deutschland Pflanze-schuttdienst**, Stuttgart, v. 27, n. 8, p. 113-117, 1975.

7 ANEXOS

TABELA 8 Resumo da análise de variância dos resultados do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos isolados de diferentes regiões

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio
Isolados	12	0,01232*
Erro	13	0,0005038
Total	25	
Média geral		0,415
CV (%)		5,409

(NS), (*), (**), respectivamente, não significativo e significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 9 Resumo da análise de variância dos resultados do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio
Produto	28	0,009424**
Erro	58	0,0001620
Total	86	
Média geral		0,8114
CV (%)		15,688

(NS), (*), (**), respectivamente, não significativo e significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste F

TABELA 10 Resumo da análise de variância dos resultados dos índices de % de inibição do isolado G088 submetido ao teste de seletividade dos produtos fitossanitários.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio
Produto	28	2451,144**
Erro	58	39,769
Total	86	
Média geral		57,6447
CV (%)		10,940

(NS), (*), (**), respectivamente, não significativo e significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

TABELA 11 Resumo da análise de variância dos resultados de atividades PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min), para o ensaio com três gêneros de fungos e quatro diferentes tempos de cultivo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio	
		PME	PG
Fungo	2	5.081.458,3333**	86.770,7338**
Tempo	3	11.921,2963 (NS)	2.642,9048**
Fungo vs Tempo	6	98.194,4444*	4.338,7144**
Erro	24	5.625,0000	306,5415
Total	35		
Média geral		854,17	181,72
CV (%)		8,78	9,63

(NS), (*), (**), respectivamente, não significativo e significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 12 Resumo da análise de variância dos resultados de atividades PME (nmol/g.min) e PG (nmol/g.min), para o ensaio com três gêneros de fungos e quatro diferentes tempos de cultivo.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio
Dia	6	255,2747**
Resíduo	175	0,5747516
Total	181	
Média geral		3,110440
CV (%)		10,940

(NS), (*), (**), respectivamente, não significativo e significativo, a 5% e 1% de probabilidade, pelo teste F.