

CAPTURA DE DIOXIDO DE CARBONO PELA TÉCNICA DE ABSORÇÃO REATIVA COM AMINAS

Carbon dioxide capture by reactive absorption with amines

Rarine Félix de Vasconcelos¹; Cláudia Ferreira da S. Lirio¹; Roseantony Rodrigues Bouhid²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Paracambi. Rua Sebastião Lacerda, s/n, centro, Paracambi, RJ. CEP: 26.600-000. ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Rio de Janeiro. Rua Senador Furtado, 121/125, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20.270-021. E-mail: claudia.silva@ifrj.edu.br

Palavras-Chave: captura de CO₂, aquecimento global, absorção reativa.
Keywords: CO₂ capture, global warming, reactive absorption.

INTRODUÇÃO

O elevado volume de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera, um dos principais Gases do Efeito Estufa (GEE), tem como uma das principais causas, o fato da matriz energética mundial estar baseada no consumo de combustíveis fósseis. Consequentemente, ele também aponta para um dos maiores desafios da sociedade moderna: diminuir as emissões dos GEE sem deixar de atender a crescente demanda por energia. Nesse sentido, além da substituição das tecnologias de geração de energia convencionais, por outras classificadas como mais limpas, os processos de captura através de reações com aminas e posterior armazenamento de CO₂ surgem como uma forma de mitigar os efeitos desse gás na atmosfera. Segundo YAMASAKI (2003), a recuperação de CO₂ utilizando a técnica com a monoetanolamina (MEA) como reagente pode chegar a 98%.

O processo de captura de CO₂ a partir do gás de queima é dividido em duas etapas. A primeira acontece na Torre de Absorção, na qual o gás é borbulhado em contracorrente a uma solução aquosa de amina, possibilitando a reação direta e reversível entre esta e o dióxido de carbono, formando como produto um composto intermediário. A solução obtida nesta etapa passa por um trocador de calor e na sequência é enviada para a Torre de Dessorção ou *Stripper*. Nesta segunda etapa, a solução é aquecida, favorecendo a recuperação de CO₂ e da amina saturada na etapa anterior. Esta retorna ao processo, sendo reaproveitada até que seja degradada, enquanto que o CO₂ separado dos demais componentes do gás de queima seguirá para o armazenamento geológico. O fluxograma deste processo industrial pode ser visto através da Figura 1.

Embora a tecnologia de absorção reativa seja utilizada há algumas décadas pela indústria do gás natural, para remoção de seus gases ácidos, a sua aplicação é recente para a obtenção de CO₂ a partir de correntes industriais denominadas por gás de queima. Assim, com características totalmente diferentes, a técnica ainda apresenta alguns desafios relacionados, em especial, a estabilidade das aminas e ao consumo de energia, que repercutem diretamente no custo do processo industrial.

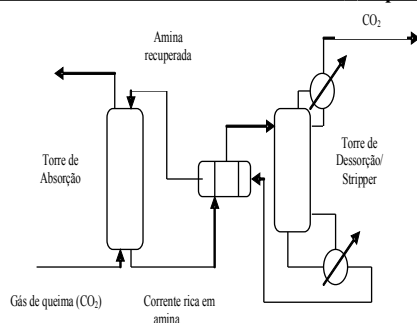


Figura 1: Fluxograma de processo para captura de CO₂ a partir de gás de queima usando absorção reativa com aminas.

Desta forma, este trabalho tem por objetivo investigar os parâmetros de maior influência para o processo de captura de dióxido de carbono através da absorção reativa utilizando aminas. Para isto, foram adotadas duas metodologias para o estudo. A primeira consistiu na utilização de um kit didático e a segunda na projeção de uma coluna de borbulhamento. O kit desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa em um trabalho anterior de transposição didática é mais bem detalhado em MARTINS & MIRANDA (2007) e BOUHID *et al.* (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram comparados os valores de pressão de vapor das três principais aminas estudadas para este processo: monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA) e metildietanolamina (MDEA). Os valores de pressão de vapor para as possíveis temperaturas operacionais (298,15; 333,15; 338,15 e 343,15 K) foram obtidos através da equação (1). Os parâmetros A, B, C, D e E são apresentados através da tabela 1. As Figuras 2 e 3 exibem as curvas de pressão de vapor em função da temperatura.

$$P^{vapor} = \exp \left[A + \frac{B}{T} + C \cdot \ln(T) + D \cdot T^E \right] \quad (1)$$

A sequência obtida, em ordem crescente, dos valores calculados para a pressão de vapor em função da temperatura são DEA, MDEA e MEA. Como uma das características de um bom solvente para este tipo de processo é apresentar uma baixa pressão de vapor, pode-se concluir que a mesma sequência seria a indicada para seleção do solvente visando evitar perdas por evaporação durante o processo. Vale ressaltar, entretanto, que outras características que dependem da composição da corrente gasosa a ser tratada devem ser consideradas no momento da escolha do solvente. Talvez seja por este motivo que, mesmo a MEA apresentando maiores valores para a pressão de vapor seja amplamente utilizada neste tipo de processo, já que ela é facilmente recuperável, enquanto que a DEA exige destilação a vácuo para sua recuperação. A MDEA, por sua vez, é menos seletiva ao CO₂ sendo mais indicada ao uso de remoção de H₂S em correntes gasosas que também contenham CO₂; o que não é foco do nosso estudo.

Tabela 1: Parâmetros da equação (1) para o cálculo da pressão de vapor. Fonte: DIPPR - Information and Data Evaluation Manager.

Parâmetros	MEA	DEA	MDEA
A	92,624	106,38	253,07
B	-10367	-13714	-18378
C	-9,4699	-11,06	-33,972
D	1,90E-18	3,26E-18	2,33E-05
E	6	6	2
Validade/K	283,65-678,2	301,15-736,6	252,15-675,15

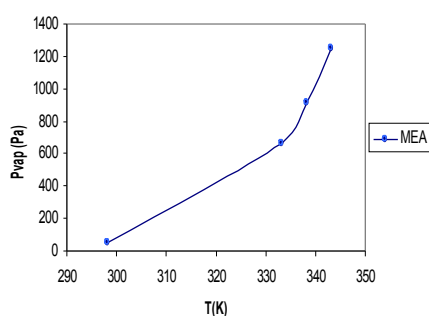


Figura 2: Curva de pressão de vapor em função da temperatura para MEA.

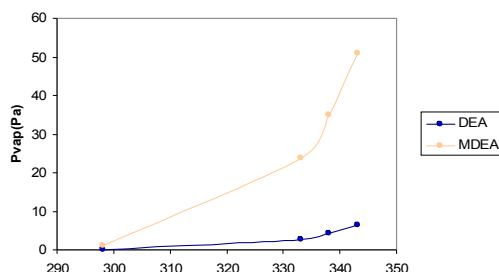


Figura 3: Curvas de pressão de vapor em função da temperatura para DEA e MDEA.

Desta forma, a fim de avaliar a capacidade de absorção das aminas, iniciou-se o estudo com a utilização do kit didático para soluções de MEA e DEA a 10%. O CO₂ utilizado no processo foi gerado a partir da reação expressa através da equação (2).



O CO₂ proveniente da reação entre HCl e CaCO₃ foi conduzido através de uma mangueira para uma proveta com a solução aquosa de amina. A proveta também continha timolftaleína que foi utilizada como indicador para a percepção do término da reação. Assim que a solução aquosa atingiu a sua saturação o processo foi interrompido. Numa segunda fase, a solução saturada de amina foi transferida para um balão volumétrico e com o auxílio de uma manta de aquecimento foi promovida a regeneração, que consistiu na liberação do CO₂ capturado e no reaproveitamento da amina utilizada. O uso do kit permitiu a avaliação qualitativa do processo e a percepção de que o processo sofre grande influência da temperatura e vazão do gás alimentado, já que este repercute diretamente no tempo de contato entre os reagentes. Como o kit não permite o controle da vazão, nem da concentração do gás gerado *in situ* foi projetada uma coluna de borbulhamento.

A coluna de borbulhamento é composta por 2 tubos cilíndricos concêntricos, perfazendo um encamisamento para que seja utilizada a circulação de fluido com vistas ao controle de temperatura. Ela apresenta ainda um *sparger* posicionado no centro da coluna formado por um prato com orifícios para permitirem a distribuição do gás através do borbulhamento. A coluna de vidro tem como dimensões: 1,0 metro de altura, 0,50 m de diâmetro interno e 0,53 m de diâmetro externo. O projeto da coluna foi executado a partir de informações da literatura com projetos similares, porém a partir de materiais diferentes. As próximas etapas deste trabalho consistirão na montagem da coluna e execução dos ensaios para avaliar quantitativamente a influência da vazão de gás e da temperatura no processo de captura.

CONCLUSÕES

Os parâmetros de maior influência num processo de captura de dióxido de carbono a partir do borbulhamento de gás de queima em soluções de aminas são aqueles atrelados as características do solvente/reagente e da corrente gasosa.

Embora a pressão de vapor não seja a única característica a ser considerada, no que diz respeito ao solvente, a avaliação desta é de real significância já que valores mais altos para esta propriedade significam maiores perdas do solvente por evaporação. Percebeu-se que a MEA possui maior pressão de vapor, embora seja a mais comumente usada pelas indústrias para esse processo de absorção, provavelmente devido ao fato de ser mais reativa, já que é uma amina primária. A DEA apresentou menor pressão de vapor, e em seguida a MDEA, então elas são mais vantajosas nesse aspecto, pois gerarão menores perdas por evaporação.

A utilização do kit didático para captura de CO₂ através de soluções aquosas de aminas permitiu a avaliação qualitativa das etapas de absorção e dessorção. Foi possível observar o ponto de saturação da solução de amina e identificar os pontos mais relevantes para a execução do projeto da coluna de borbulhamento em escala piloto. Esta será utilizada para a avaliação, em termos quantitativos, quanto a influência da vazão do gás e da temperatura, já que a partir desta será possível o controle destes parâmetros; o que não foi possível com o uso do kit didático.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ/CNPq/FAPERJ e FINEP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUHID, RR; MIRANDA, JL; MOURA, LC; SILVA, CF, PERROTA, D; KAUFFMAN, M; MARTINS, RC. Contextualizando a captura de gás carbônico por aminas com alunos de nível médio/técnico da rede federal de ensino tecnológico. In: **XV Encontro Nacional de Ensino de Química - A formação do professor de Química e os desafios da sala de aula**. ISSN - 2179-5355, 2010.
- MARTINS, C; MIRANDA, JL. **Contextualização do aquecimento global e da captura de CO₂ no Ensino de Química**. Monografia de Conclusão do Curso de licenciatura em Química. Rio de Janeiro, RJ: Instituto de Química, UFRJ, 2007.
- YAMASAKI A. An overview of CO₂ mitigation options for global warming – Emphasizing CO₂ sequestration options. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, 36(4), p.361-375, 2003.

PRODUÇÃO DE EXOGLUCANASES EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O “PÓ” DA CASCA DO COCO VERDE EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.

Exoglucanasis production in solid state fermentation using coconut green powder in different sources of carbon and nitrogen

Caroline Teixeira do Nascimento; Edmir Fernandes Ferreira; Gustavo Saavedra; Ivanilton Almeida Nery; Rosângela da Costa Teixeira *

*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Nilópolis, RJ. Rua Lúcio Tavares, 1045, Nova Cidade, Nilópolis. CEP: 26530-060. E-mail: edmirf@gmail.com

Palavras-chave: celulase, côco verde, fermentação, *Thichoderma harzianum*.

Keywords: cellulasis, green coconut, fermentation, *Thichoderma harzianum*.

INTRODUÇÃO

A água de coco traz consigo o apelo do produto natural e saudável. Sua composição é rica em carboidratos e sais minerais, o que a torna bastante apreciada, além de ser considerada um reservatório eletrólitos. O resíduo vem sendo disposto em aterros e lixões, o que vem provocando um enorme problema aos serviços municipais de coleta de lixo, em função, principalmente, do grande volume. O desenvolvimento de alternativas de aproveitamento da casca de coco verde possibilita a redução da disposição de resíduos sólidos em aterros sanitários e proporciona uma nova opção de rendimento junto aos sítios de produção. Uma das idéias é utilizar a sua casca em estudos para a utilização do mesmo em pesquisas biotecnológicas de interesse industrial, como a produção enzimática. A definição de enzima foi dada pro KHUNE em 1878, que significa “em leveduras” em grego, enzimas são proteínas de alto peso molecular, com uma estrutura química especial e sólida capaz de catalisar reações bioquímicas (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Algumas das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos são: a sua alta especificidade na ação catalítica, alta eficiência em moderadas condições de temperatura, pressão e pH e minimização de problemas toxicológicos e ambientais (WISEMAN, 1975).

A fermentação em estado sólido é definida como um processo onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem sobre uma matriz sólida, insolúvel em água, com ausência de moléculas de água livres, ou seja, a água, necessária ao crescimento microbiano, deve estar associada aos compostos poliméricos da matriz. O substrato das enzimas celulolíticas é a celulose, que é o principal constituinte da parede celular dos vegetais superiores, associada com lignina e hemicelulose. A celulose é o polissacarídeo mais frequentemente encontrado na natureza, sendo uma estrutura polimérica sob arranjo linear de glicose unida por ligação glicosídica- β -1,4.

Admite-se a existência de cinco tipos de celulases, das quais ao menos três formam um complexo sinérgico, responsável pela hidrólise da celulose: (1) endocelulase – responsável pelo rompimento de ligações intercadeias poliméricas que conferem estrutura cristalina à celulose; (2) exocelulase, cliva segmentos das cadeias expostas pela endocelulase, gerando celobiose (dissacarídeo) ou celotetrose (tetrassacarídeo); (3) beta-glicosidase, hidrolisa celobiose e celodextrinas, gerando monômeros de glicose.

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. A celulose, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira de lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação.

Reconhecidamente, as células microbianas produzidas pelo processo de fermentação são fontes potenciais de enzimas, oferecendo uma série de vantagens: a produção de células microbianas pode ser aumentada facilmente, permitindo um aumento na produção em menor tempo, ditado pelo mercado; as células microbianas têm natureza diversificada, permitindo a produção de um complexo enzimático; facilidade de cultivo em ambiente controlado e sensibilidade a alterações genéticas, o que permite obtenção de linhagens melhoradas em relação a produção e qualidade da enzima requerida.

Este trabalho tem como objetivo apresentar as melhores condições na produção de exoglucanase a partir do pó da fibra do coco verde em meio de fermentação semi-sólido. Para se avaliar a produção de exoglucanases foi necessário produzir um sistema de fermentação composto de pó da fibra de coco verde associado a soluções umidificadoras, contendo diferentes fontes de nitrogênio e carbono, e uma suspensão de *Trichoderma harzianum* com crescimento de 7 dias e número de esporos igual a 5×10^7 esporos/mL, após período de incubação procedeu-se a verificação da produção enzimática e obtendo as melhores fontes de nutrientes bem como os melhores inibidores do crescimento fúngico. Realizou-se este mesmo procedimento para uma linhagem de cepas de *Aspergillus niger*.

As soluções umidificadoras utilizadas com concentração 0,1% (p/v) foram: glicose, glicose com nitrato, glicose com sulfato, glicose com peptona, glicose com extrato de levedura, sacarose, sacarose com nitrato, sacarose com sulfato, sacarose com peptona, sacarose com extrato de levedura, maltose, maltose com nitrato, maltose com sulfato, maltose com peptona, maltose com extrato de levedura e água (branco da análise).

Após a obtenção dos extratos enzimáticos, realizou-se a filtração dos mesmos e em seguida fez-se a técnica do DNS (3,5-Dinitrosalicílico) para a dosagem de açúcares redutores e por fim a leitura em espectrofotômetro a 570nm.

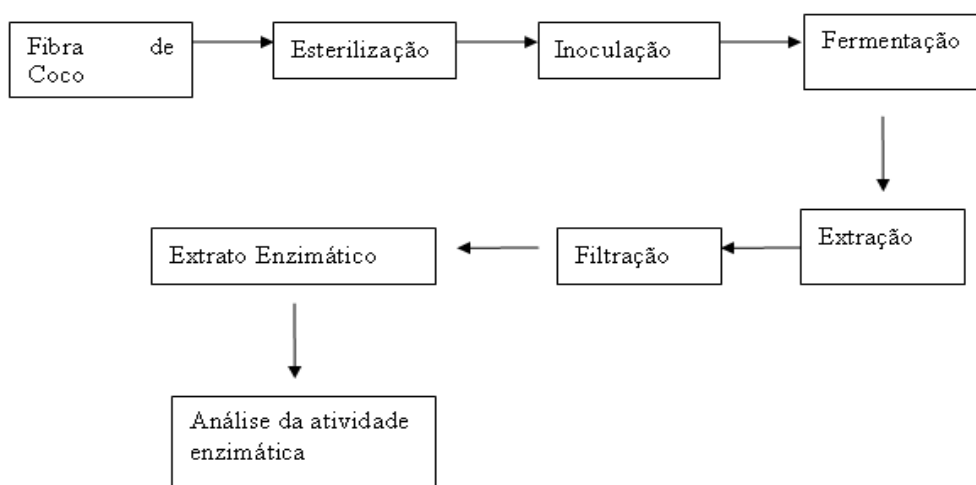


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades da fibra de coco conferem ao seu substrato características de boa qualidade. A grande percentagem de lignina (35-45%) e de celulose (23-43%) e a pequena quantidade de hemicelulose (3-12%), que é a fração prontamente atacada por microorganismos, conferem ao substrato de fibra de coco uma grande durabilidade (NOGUEIRA *et al.*, 1998). Após o processo para obtenção da enzima o resíduo sólido é descartado como adubo, já que este é recomendável para cultivos ornamentais e de hortaliças sem o uso do solo, pois não sofre o processo de degradação acelerado causado pela intensa aplicação de água e fertilizantes. Portanto, a utilização da casca do coco verde processada, além da importância econômica e social, é também importante do ponto de vista ambiental, já que esta é um material de difícil decomposição levando mais de 8 anos para se decompor.

De todos os organismos, os microrganismos são os os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Para crescer, todos os organismos necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes. Estes elementos são necessários tanto para a síntese como para as funções normais dos comportamentos celulares. Eles existem na natureza em grande variedade de compostos, que são inorgânicos ou orgânicos.

Os meios de cultura simulam as condições naturais para que o microrganismo possa crescer e os principais elementos químicos para o crescimento das células incluem carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. O carbono é um dos elementos químicos mais importantes necessários para o crescimento microbiano, já que o carbono forma o esqueleto das três maiores classes de nutrientes orgânicos: carboidratos, lipídeos e proteínas, tais compostos fornecem energia para o crescimento da célula e servem como unidade básica do material celular.

Todos os organismos também necessitam de nitrogênio em alguma forma, o elemento é uma parte essencial dos aminoácidos que juntos formam as proteínas. Outros elementos essenciais para todos os organismos são o hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo. O hidrogênio e o oxigênio fazem parte de muitos compostos orgânicos. O enxofre é necessário para a biossíntese dos aminoácidos cisteína, cistina e metionina. O fósforo é essencial para a síntese de ácidos nucleicos e adenosina trifosfato, um composto que é extremamente importante para o armazenamento e a transferência de energia.

A utilização da fermentação em estado semi-sólido (FES) é devido referir-se a cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido (meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegura o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida.

A fermentação em estado semi-sólido apresenta algumas vantagens, como por exemplo, há uma aceleração na taxa de reação devido ao contato direto entre o substrato e o microrganismo; as condições de crescimento empregadas são, em geral, similares às condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos; o produto final encontra-se mais concentrado; entre outros.

As enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica. A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte proteica, porém a ela podem estar integradas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. A ação catalítica das enzimas se faz, como a dos catalisadores inorgânicos, através da redução de energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Além de reduzirem significativamente a energia de ativação, incrementando a velocidade da reação, as enzimas apresentam elevada especificidade. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato.

A primeira etapa na purificação de uma enzima para posteriormente ser medida a sua atividade enzimática, é a obtenção de um extrato (extrato bruto) contendo a enzima na forma solúvel. Para uma enzima extracelular, ou seja, secretada no meio de fermentação, qualquer outra partícula como as próprias células devem ser removidas para as etapas subsequentes. Para isso é utilizada uma filtração e, neste caso, deve-se tomar o cuidado para não haver lise celular, o que poderia causar uma contaminação desnecessária. As células obtidas por fermentação devem ser concentradas para um rompimento eficiente, sendo realizada através de *mixers*.

A biodegradação de celulose é um tópico bem elucidado do ponto de vista bioquímico. A biodegradação do polímero é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente. Esses grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- β -glucanases, as exo-1,4- β -glucanases e as 1,4- β -glucosidases. Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma cooperativa, causando a hidrólise completa da celulose até a glicose.

As endo-glucanases rompem a molécula de celulose ao acaso e liberam fragmentos menores, que servem de substrato para as exo-glucanases. As exo-glucanases hidrolisam, pelas pontas, os fragmentos de menor massa molar. As β -glucosidases hidrolisam a celobiose até glicose. O grau de sinergismo das celulases é bastante grande e a atividade relativa de cada grupo de enzimas atuando de maneira isolada é mais baixa quanto aos três grupos em conjunto, para a hidrólise total da celulose.

Após a fermentação há a formação de glicose, através da celulose, e esta é detetada através da técnica de DNS para açúcares redutores. Os monossacarídeos (glicose e frutose) são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os dissacarídeos que não possuem essa característica sem sofrerem hidrólise da ligação glicosídica são denominados de açúcares não redutores. Diversos reativos são utilizados para demonstrar a presença de grupos redutores, em açúcares. De fato, os monossacarídeos podem ser oxidados por agentes oxidantes relativamente suaves tais como os íons férricos (Fe^{3+}) e cúprico (Cu^{2+}).

A química da reação do DNS com açúcares redutores está elucidada em parte. O DNS é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, enquanto que, no caso mais simples o grupamento aldeído parece ser oxidado a ácido aldônico. Entretanto a equivalência entre o ácido aminonitrossalicílico produzido e a quantidade do açúcar não é exata e diferentes açúcares produzem diferente intensidade na cor desenvolvida. Isso sugere que a química da reação deva ser mais complexa que a apresentada, podendo estar relacionada com as reações de decomposição de açúcares em solução alcalina. Com os valores obtidos no espectrofotômetro de cada fermentador pôde-se calcular a atividade enzimática do *T. harzianum* e *A. niger* nas diferentes soluções umidificadoras e verificou-se assim o comportamento deste podendo analisar o melhor meio para o crescimento quanto para sua inibição.

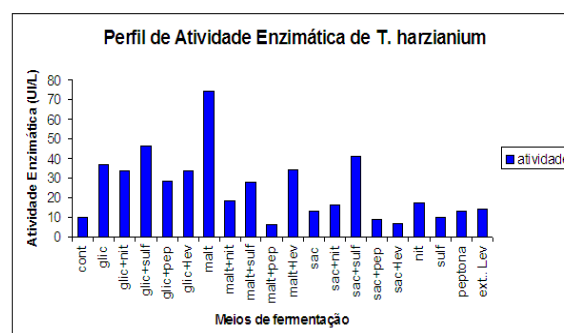


Figura 2 - gráfico da atividade enzimática *T.harzianum*

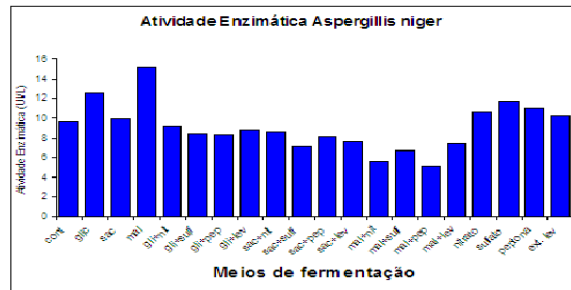


Figura 3 - gráfico da atividade enzimática do *A. niger*

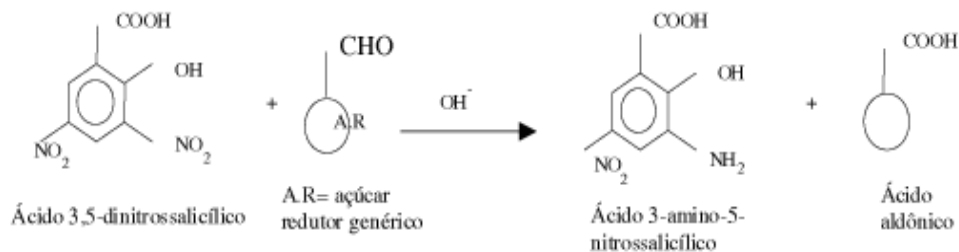


FIGURA 4- O ácido dinitrossalicílico é reduzido pelo açúcar redutor em meio alcalino a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico formando ácido aldônico.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que houve atividade enzimática utilizando o pó da casca do coco verde umedecido com água, em cultivo de *Trichoderma harzianum*, porém nos meios com glicose e maltose observamos maior atividade. Em relação às fontes de nitrogênio ocorreu maior atividade se comparar ao controle. Já no caso do *Aspergillus niger* a maior atividade enzimática também dá-se no meio com maltose, logo em ambos os microorganismos houve maior atividade quando o meio está enriquecido com maltose. Entretanto, foi verificado que com fontes de carbono e nitrogênio combinadas ocorreu uma diminuição da atividade e também foi observado que o pH e a temperatura influenciam muito na produção de celulase. Tendo a casca do coco verde um potencial de recursos ociosos, o estudo de sua utilização como matéria-prima para produção de enzimas torna-se interessante por deixar de ser resíduo para tornar-se recurso para obtenção de produtos de alto valor agregado.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ/CNPq/Embrapa pelo apoio financeiro e disponibilização de material e instrumentos para a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KÄMPF, AN; FERMINO, MH. **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 2000, Porto Alegre. Anais ... Porto Alegre: Genesis, 2000. 312p.
- NOGUERA, P; ABAD, M; NOGUERA, V; PURCHASES, R; MAQUIERA, A. Coconut coir waste, a new and viable ecologically-friendly peat substitute. *Acta Horticulturae*, **517**: 279-286. 2000.
- MICHAEL J; PELCZAR JR., ECS; CHAN, NRK. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, volume I, 2ª ed.; tradução YAMANDA, SF; NAKAMURA, TU; DIAS-FILHO, BP. São Paulo, SP: Makron Books, 1996.
- VERMELHO, AB; PEREIRA, AF; COELHO, RRR; PADÓN, TCBSS. **Práticas de Microbiologia**; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LEVANTAMENTO DOS PONTOS DE COLETA DO RIBEIRÃO CACHIMBAL E SEUS PRINCIPAIS AFLUENTES

Survey of Cachimbal river sampling points and its main affluents.

Harison da Silva Ventura; Rayla Dias Gaspar; Allana de Souza Izidório; Thiago Andrade Bernini; Daniele Gonçalves Nunes; José Arimathéa Oliveira*

*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Nilo Peçanha. Rua José Breves, 550, Centro, Pinheiral/RJ. CEP:27197-000. E-mail: danielle.nunes@ifrj.edu.br

Palavras-chave: Ribeirão cachimbal, diagnóstico, levantamento.

Keywords: Cachimbal river, diagnosis, survey.

INTRODUÇÃO

As preocupações ambientais crescentes colocam a água em foco nas questões mundiais. Os recursos hídricos atualmente sofrem com a deterioração da sua qualidade e com o aumento da escassez que já atinge inúmeras regiões ao redor do planeta. O lançamento de efluentes sem tratamento, disposição inadequada de resíduos, uso irracional da água, manejo inadequado de bacias hidrográficas e a falta de adoção de práticas de conservação do solo, são causas para a poluição de mananciais que já vêm ocorrendo a centenas de anos, sendo o homem, o maior agente causador dessas alterações. As interferências antrópicas, associadas aos fenômenos naturais, alteram a qualidade da água, resultado também das ações de uso e ocupação das bacias hidrográficas.

Em meio aos fundamentos da Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH), instituída pela Lei nº 9.433/97, encontra-se a bacia hidrográfica, definida como unidade territorial de planejamento, onde todas as ações do quadro normativo, assim como as ações de manejo deverão ser implementadas respeitando o limite natural e suas características. Isso se torna importante para o reconhecimento da água como fator de ordenamento territorial, sendo elemento fundamental para a garantia de qualidade de vida e fator restritivo de desenvolvimento econômico e social.

O presente projeto foi desenvolvido na microbacia do ribeirão Cachimbal, sendo este, afluente do rio Paraíba do Sul, na região do Médio Vale Paraíba, sul do estado do Rio de Janeiro. Esta microbacia é de importância estratégica para o abastecimento público de algumas cidades, como Pinheiral, pois em caso de problemas com a qualidade e o fornecimento da água oriunda do rio Paraíba do Sul, passa a ser a única fonte de abastecimento. Além disso, é essencial a preservação e conservação dos afluentes de cursos de água como o rio Paraíba do Sul, já que grande parte da carga orgânica afluente a esses rios é originada da degradação das bacias hidrográficas afluentes. A área analisada no presente estudo contempla a microbacia do ribeirão Cachimbal, constituinte da bacia do rio Paraíba do Sul, situada na região do Médio Paraíba Fluminense, abrangendo os municípios de Pinheiral, Piraí e Volta Redonda no estado do Rio de Janeiro, como mostra a figura 1. O ribeirão Cachimbal situa-se entre as coordenadas geográficas 22°33' e 22°38' de latitude sul e 43°57' e 44°05' oeste (OLIVEIRA, 1998).

Este estudo teve como objetivos: seleção dos principais afluentes do ribeirão Cachimbal e dos pontos de coleta no rio principal (ribeirão Cachimbal); mapeamento das nascentes dos principais afluentes e do rio principal; medições de vazão e análises dos parâmetros de qualidade nos pontos selecionados. Este último terá seus resultados apresentados posteriormente, pois ainda faltam os resultados referentes ao período de estiagem das chuvas. Desse modo, neste resumo serão apresentados resultados parciais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levantamento dos principais pontos de coleta

O reconhecimento da área da bacia hidrográfica do ribeirão Cachimbal foi realizado através de pesquisa de campo, utilizando-se um equipamento receptor GPS (Global Positioning System). Foram coletados dados de coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator). Pode-se observar, através das visitas de campo, a predominância de pastagens degradadas, além de pontos de poluição por despejo de dejetos, como na região de Arrozal, no ponto próximo à Praça Anita Abreu. Foram observados 21 pontos importantes dentro da bacia, entre pontos dentro do ribeirão Cachimbal e pontos relacionados aos seus afluentes, sendo demarcados até o presente momento 12 destes pontos. Serão utilizados como pontos de coleta 10 pontos. Isto devido à logística de análises de qualidade de água e medições de vazão. Os quadros 1 e 2 mostram os dados coletados dos 12 pontos já demarcados.

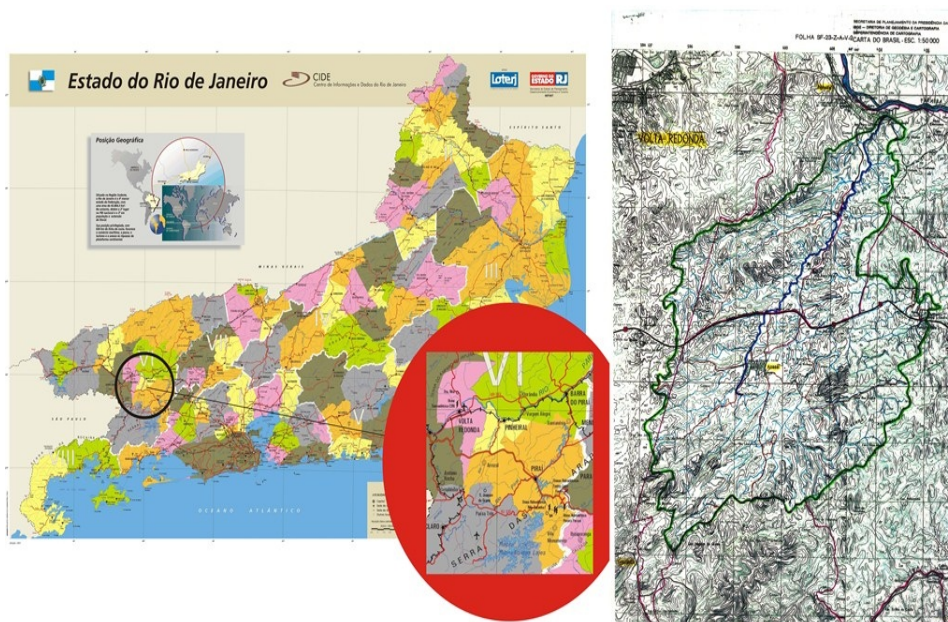


Figura 1 – Mapa político do estado do Rio de Janeiro, destacando-se os municípios de Volta Redonda, Pinheiral e Piraí. (Fonte: Adaptado de Fundação CIDE e IBGE – Projeto RADAM 1983)

Quadro 1 – Descrição dos pontos da bacia hidrográfica do ribeirão Cachimbal.

Pontos	Descrição	Coordenadas UTM (m)*		Altitude (m)
		Coordenadas L	Coordenadas N	
N1 FGrama	Nascente córrego Pau d'algo	598745	7496259	456
N2 Arrozal	Nascente	596917	7498935	424
N3 Cachimb	Nascente Cachimbal	597274	7499324	398
P1 FGrama	Córrego Pau d'algo (ponte)	599064	7498585	444
P2 Afl Cac	Afluente Sítio do Angico	598026	7499748	396
P3 Cachimb	Próximo a Pça Anita Abreu	598411	7500663	397
P4 Pedreir	Córrego da Pedreira	598405	7500670	395
P5 Cachimb	Cachimbal Sítio do Márcio	598569	7500925	396
P6 JRO	Córrego Pau d'algo (Varjão)	601054	7501601	394
P7 União	Confluência Pau d'algo e Cachimbal	600554	7503526	388

*Zona 23K

Quadro 2 – Descrição dos pontos da bacia hidrográfica do ribeirão Cachimbal (continuação).

Pontos	Descrição	Coordenadas UTM (m)		Altitude (m)
		Coordenadas L	Coordenadas N	
P6 Cachimb	Ponte (pista reta)	602307	7505830	
P7 FNader	Ponte	601946	7505896	
P8 Afl Cac	Ponte (curva)	602864	7507040	
P9 Curva	Confluência com afl	602908	7507046	
P10 Cachimb	Apicultura	604120	7509242	
P11 Cachimb	Ponte (piscicultura)	604012	7509102	
P12 Cachim	Ponte (ETA)	603905	7508826	

*Zona 23K

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que é de fundamental importância o reconhecimento da área da bacia hidrográfica para a pesquisa e que todas as ações realizadas sobre essa área influenciam nas características e dinâmicas da bacia.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, J.A. **Caracterização física da bacia do ribeirão Cachimbal – Pinheiral, RJ e de suas principais paisagens degradadas.** 154p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.

FUNDAÇÃO CIDE. Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro [on line]. disponível via URL. http://www.zonu.com/brasil_mapas_esp/Mapa_Division_Politica_Administrativa_do_Rio_Janeiro_Brasil.htm (capturado em 22 de out. 2010).

ANÁLISE DE MUTANTES DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 DEFICIENTES EM GENES RELACIONADOS COM MECANISMOS DE QUIMIOTAXIA BACTERIANA

Study of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 mutants, deficient in genes related with bacterial chemotaxis mechanisms

N.C. Maia¹, J.C.S. Santos¹, V.L.M. Pádua², S.H. Seabra², A.S. Hemerly³, J.I. Baldani⁴, A. Coelho³, M.M. Loureiro^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Duque de Caxias, RJ. Av. República do Paraguai, 120, Bairro Sarapuí, Duque de Caxias, RJ. CEP 25050-100. E-mail: marcio.loureiro@ifrj.edu.br. ²Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO). ³Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). ⁴Embrapa – Agrobiologia, Seropédica, RJ.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Quimiotaxia; Interação planta-bactéria
Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Chemotaxis, Plant-bacteria interaction

INTRODUÇÃO

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria Gram negativa, endofítica, microaeróbica, que apresenta células em forma de bastão com extremidades arredondadas. É considerada um modelo pioneiro de bactéria fixadora de nitrogênio capaz de associar-se com variedades de cana-de-açúcar, inclusive as estirpes utilizadas para produção de etanol, sendo encontrada nos espaços intercelulares do vegetal, realizando associações benéficas com todas as suas estruturas.

G. diazotrophicus PAL5 apresenta grande potencial biotecnológico, relacionado a sua alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio, onde mais de 60% do nitrogênio incorporado à biomassa vegetal pode ser adquirido por este mecanismo em variedades de cana de açúcar, o que reforça sua importância para a agricultura sustentável no Brasil, onde baixas quantidades de fertilizantes nitrogenados são aplicadas nos cultivares. Este endófito apresenta outros potenciais biotecnológicos, pois pode ser utilizado industrialmente para produção de ácido glucônico a partir de glicose, além de produzir e secretar fitormônios (auxina e giberilina) durante a associação endofítica, o que contribui para o desenvolvimento vegetal, e produzem peptídeos com efeito bactericida (bacteriocinas) (Bertalan *et al.*, 2009)

O objetivo deste estudo é selecionar e analisar mutantes deficientes em genes de proteínas relacionados a mecanismo de quimiotaxia bacteriana, que são importantes para motilidade celular, transdução de sinais, divisão celular e interações planta-bactéria, com finalidade de verificarmos os efeitos fisiológicos dos nocautes executados nestes genes e em suas respectivas vias metabólicas.

Neste sentido, estamos utilizando uma biblioteca de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 construída na Embrapa-Agrobiologia – Seropédica – RJ, criada a partir de inserções randômicas, geradas a partir de uma versão do elemento de transposição Tn5 no cromossomo deste endófito, com o kit de mutagênese randômica EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre®), os quais foram submetidos a reações de sequenciamento bi-direcional de DNA genômico com primers transposon específicos, reagente BigDye terminator e sequenciador capilar ABI3130 (Applied Biosystems®).

Para caracterização fenotípica, foram realizados testes de motilidade celular, microscopias eletrônicas de varredura e análises proteômicas em espectrômetro de massas Maldi Q-Tof.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da metodologia de seleção proposta, pudemos realizar o mapeamento das mutações em 63 mutantes. Dentre estes, foram selecionados 02 mutantes de interesse, que tiveram inserções ocorridas em genes que codificam proteínas relacionadas com mecanismos de quimiotaxia bacteriana, (proteína de quimiotaxia CheW e proteína de quimiotaxia MotB) (Figura 1).

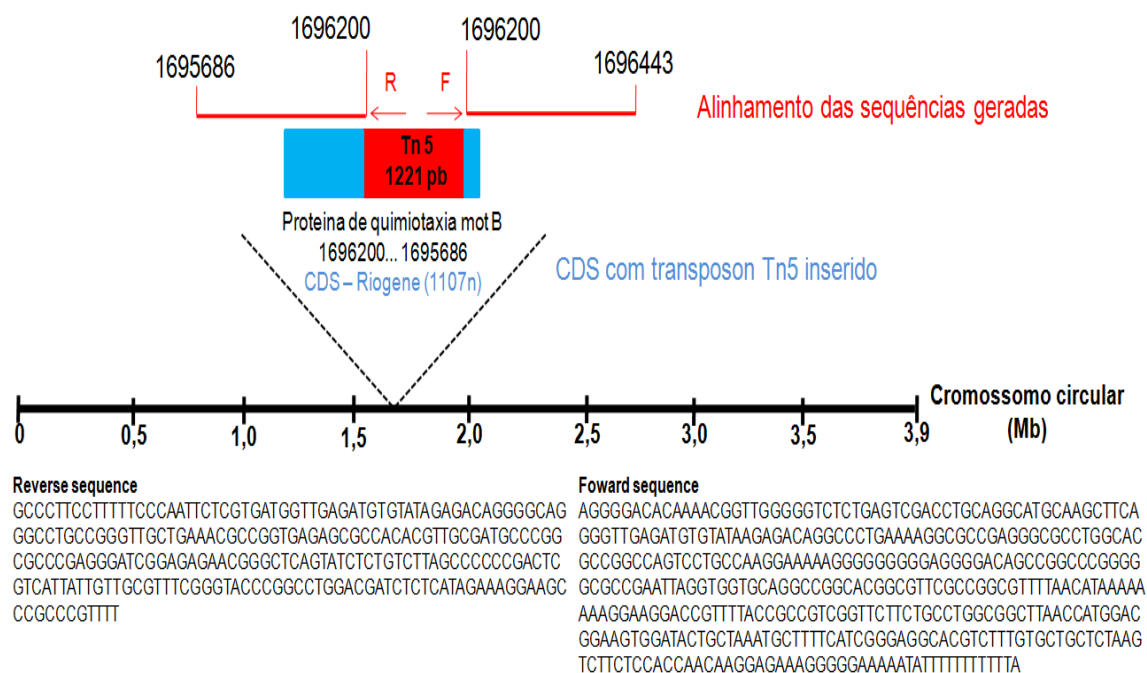


Figura 1. Exemplo de representação esquemática do alinhamento de sequências de DNA, geradas através de sequenciamento bi-direcional, a partir do DNA genômico purificado de um mutante nocauteado no gene da proteína de quimiotaxia MotB.

Visto que a motilidade celular consiste em um dos mecanismos associados com a quimiotaxia bacteriana, resolvemos realizar testes de motilidade celular, em meio de cultura Agar Motility, com finalidade de comparar a cepa selvagem com os mutantes CheW, MotB selecionados neste estudo e um mutante flagelar de *G. diazotrophicus* PAL5 (mutante FlgA), descrito por Rouws *et al.* 2008, o qual foi cordialmente cedido ao grupo.

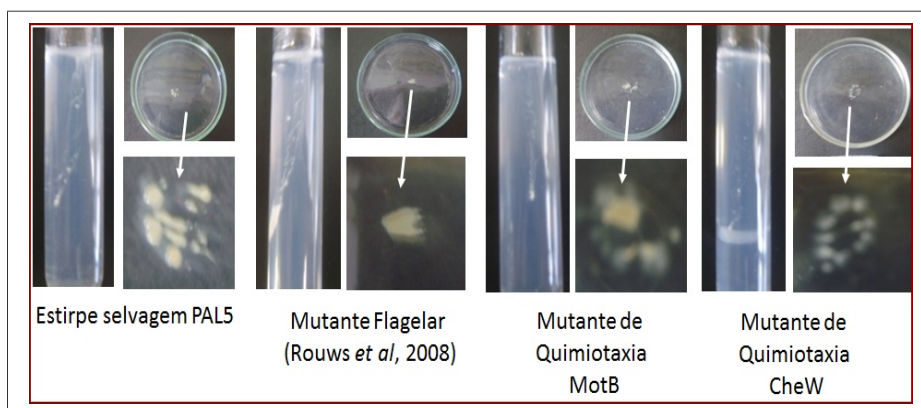


Figura 2. Testes de Motilidade Celular realizados com a cepa selvagem e os mutantes (MotB, CheW e FlgA) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, em meio de cultura Agar Motility.

Nestes experimentos verificamos que o mutante MotB e CheW apresentaram motilidade, mesmo sendo mutantes deficientes em genes relacionados com biossíntese, montagem e funcionamento de flagelos. Como controle deste experimento, pudemos verificar que o mutante FlgA apresentou crescimento apenas nos locais de inóculo, como anteriormente descrito na literatura (Rouws *et al*, 2008) (Figura 2).

Cabe ressaltar que o motor flagelar bacteriano, é uma nanomáquina rotativa natural, que transforma filamentos helicoidais, criando uma força propulsora para que as bactérias nadem, e que este motor é formado por proteínas de membrana MotB e MotA, que se associam em complexos dispostas circunferencialmente em torno do rotor, onde o domínio periplasmático de MotB, liga-se à zona de stress de suporte altamente reticulada de peptidoglicano de parede celular, o qual imobiliza o anel do estator do motor flagelar bacteriano. Neste sentido, acreditamos que o fato destes mutantes terem apresentado motilidade, esteja associado com complementação da via de biossíntese de flagelos, por outros genes presentes no genoma de *G. diazotrophicus* PAL, ou ainda que estes mutantes possam ter tido o seu número de flagelos reduzidos, visto que crescimento em meio de cultura Agar Motility é apenas um teste qualitativo. Para testagem da segunda hipótese, atualmente estamos submetendo tais mutantes a análises através de microscopias eletrônicas de transmissão.

Tendo conhecimento de que os genes de proteína MotB e CheW são envolvidos com a formação de flagelos bacterianos, bem como transdução de sinais, e que o mutante flagelar FlgA é deficiente para produção de biofilme, submetemos os mutantes a um teste colorimétrico de quantificação de produção de biofilme, baseado na utilização do corante cristal violeta, em comparação com a cepa selvagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (Figura 3).

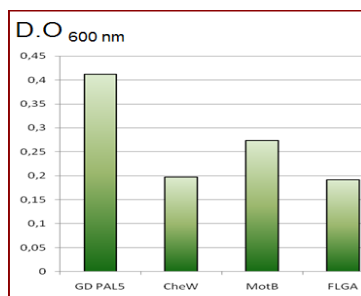


Figura 3. Teste Colorimétrico de Formação de Biofilme obtidos com as cepas selvagem, em comparação com os mutantes MotB, CheW e FlgA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

Nestes experimentos, verificamos diferenças expressivas na produção de biofilme, quando comparamos a cepa selvagem e os mutantes, onde os mutantes produziram uma quantidade muito menor de biofilme, o que sugere a possibilidade dos genes das proteínas de quimiotaxia CheW e MotB, estarem direta ou indiretamente associados a este mecanismo.

Devido aos resultados obtidos nos testes de motilidade, resolvemos realizar a análise ao microscópio eletrônico de varredura, com o objetivo de verificarmos a ocorrência de qualquer anormalidade na superfície celular bacteriana. Os resultados revelaram que os mutantes apresentavam células alongadas, quando comparadas com a cepa selvagem, sendo que as alterações morfológicas mais drásticas, foram observadas no mutante MotB, que exibiu células muito longas, que formavam aglomerações com ramificações em diversas direções, similar a observações microscópicas obtidas com fungos filamentosos, o que sugere o envolvimento destes genes no mecanismos de divisão celular de *G. diazotrophicus* PAL5.

Como os resultados de microscopia eletrônica de varredura sugeriram o envolvimento dos genes das proteínas de quimiotaxia MotB e CheW no mecanismo de divisão celular, resolvemos realizar curva de crescimento destes mutantes, do mutante FlgA e da cepa selvagem, num intervalo de tempo variando de 0 a 78 horas, onde foram realizadas medições de D.O_{600 nm} e contagens de colônias, com finalidade de observarmos alterações nas taxas de crescimento bacteriano de forma temporal (Figura 4 e Tabela 1). Além disso, coletamos frações das culturas com 24, 36, 48, 60 e 70 horas de crescimento bacteriano da cepa selvagem e mutantes, para procedermos novas análises em microscopia eletrônica de varredura (dados não exibidos).

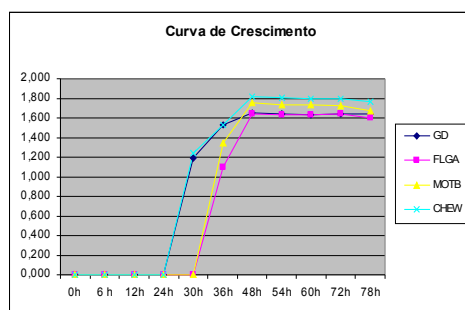


Figura 4. Curva de crescimento da cepa selvagem e dos mutantes CheW, MotB e FlgA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

AMOSTRA	24 H	36 H	48 H	60 H	72 H
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	$207 \times 10 \times 10^5$	$230 \times 10 \times 10^7$	$108 \times 10 \times 10^7$	$265 \times 10 \times 10^9$	$1202 \times 10 \times 10^5$
Mutante FlgA	$34 \times 10 \times 10^5$	$406 \times 10 \times 10^5$	$90 \times 10 \times 10^7$	$67 \times 10 \times 10^9$	$1494 \times 10 \times 10^5$
Mutante CheW	$159 \times 10 \times 10^7$	$75 \times 10 \times 10^9$	$908 \times 10 \times 10^5$	$194 \times 10 \times 10^9$	$1190 \times 10 \times 10^5$
Mutante MotB	$157 \times 10 \times 10^5$	$754 \times 10 \times 10^5$	$810 \times 10 \times 10^5$	$135 \times 10 \times 10^9$	$1020 \times 10 \times 10^5$

Tabela 1. Contagem de colônias da cepa selvagem e dos mutantes CheW, MotB e FlgA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

Com os resultados obtidos ao longo da curva de crescimento ($D.O_{600nm}$ e contagem de colônias), pudemos observar que os mutantes FlgA e MotB só começaram a apresentar crescimentos expressivos a partir de 30 horas de cultura, e que com 36 horas, o mutante CheW, apresentava elevadas taxas de crescimento celular, o que novamente sugere o envolvimento dos genes das proteínas de quimiotaxia Chew e MotB, no mecanismo de divisão celular de *G. diazotrophicus* PAL5.

Paralelamente, foram realizadas análises proteômicas da cepa selvagem de *G. diazotrophicus* PAL5 e dos mutantes CheW e MotB, através da metodologia de SDS Page (Figura 5), onde pudemos excisar 05 bandas do mutante CheW e 02 Bandas do mutante MotB, as quais foram tripsinizadas e analisadas em espectrômetro de massas Maldi Q-Tof, com finalidade de identificarmos proteínas diferencialmente expressas entre os perfis protéicos obtidos, a partir de extratos protéicos totais, purificados de amostras cultivadas em condições ótimas de crescimento bacteriano.

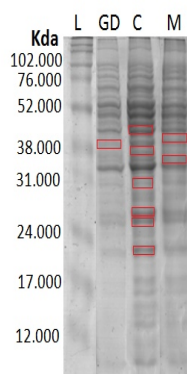


Figura 5. Gel de SDS Page de extrato total de proteínas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e mutantes Tn5 dos genes das proteínas de quimiotaxia CheW e MotB. Os quadrados em vermelho sinalizam as bandas submetidas a análises proteômicas em espectrômetro de massas Maldi Q-Tof. **L**- Marcador de peso molecular. **GD**- Cepa Selvagem de *G. diazotrophicus* PAL5. **C**- Mutante Tn5 com inserção no gene da proteína de quimiotaxia CheW. **M**- Mutante Tn5 com inserção no gene da proteína de quimiotaxia MotB. Nas análises proteômicas realizadas, foram identificadas 30 e 51 proteínas diferencialmente expressas nos mutantes MotB e CheW, respectivamente (Dados não exibidos). Dentre as proteínas identificadas no mutante MotB, podemos destacar a proteína FtsZ, a qual geralmente encontra-se relacionada à divisão celular bacteriana, a qual é orquestrada por este peptídeo que apresenta estrutura em forma de um anel contrátil conhecido como o anel Z, o qual atua como uma espécie de andaime para a montagem de uma proteína multi-complexo chamada divisomo.

O fato da proteína FtsZ ser detectada nas análises proteômicas associados com os dados de microscopia eletrônica de varredura, sugere a participação da proteína MotB no mecanismo de divisão celular de *G. diazotrophicus* PAL5.

CONCLUSÕES

Com os experimentos conduzidos até o presente momento, pudemos verificar alterações morfológicas nos mutantes analisados, as quais são sugestivas do envolvimento dos genes nocauteados, com o mecanismo de divisão celular. Cabe ressaltar que no caso do mutante do gene da proteína de quimiotaxia MotB, este resultado é bastante expressivo, pois este gene normalmente é associado com mecanismos de locomoção celular, portanto, não existem relatos na literatura, descrevendo a associação do mesmo com mecanismos de divisão celular.

Tendo conhecimento da importância desse mecanismo para o processo de colonização vegetal, pretendemos submeter esses mutantes a interação com plântulas de cana de açúcar, para estimarmos as taxas de colonização vegetal, bem como analisarmos tecidos vegetais colonizados, através de microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. Paralelamente, iremos iniciar os experimentos de complementação dos mutantes em análise, com finalidade de revertermos as mutações produzidas.

AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro: IFRJ, Finep-MCT, Faperj, Capes e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, DW; WU, LJ; CZAPLEWSKI, LG *et al.* Multiple effects of benzamide antibiotics on FtsZ function. **Molecular Microbiology**, doi:10.1111/j. 1365-2958. 2011.
- BERTALAN M. *et al.* Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **BMC Genomics**. **10**: 450-459, 2009.
- MOHAMMADI, T; VAN DAM, V; SIJBRANDI, R *et al.* Identification of FtsW as a transporter of lipidlinked cell wall precursors across the membrane. **EMBO Journal**, 2011. Disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.
- ROUJEINIKOVA, A. Crystal structure of the cell wall anchor domain of MotB, a stator component of the bacterial flagellar motor: Implications for peptidoglycan recognition. **PNAS**, **30**(105): 10348-10353, 2008.

EFEITO DE COMPOSTOS PURIFICADOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRO NA ATIVIDADE DA PDR5P DE MEMBRANAS PLASMÁTICAS DE LEVEDURAS

Gabriellen M. M. de Castro^{1,2}, Beatriz dos Anjos F.S. da Silva^{1,2}, Antonio Ferreira-Pereira²,
Ana Claudia Tassis¹; Leandro F. Reis de Sá²; Cinzia Lotti³; Anna Lisa Piccinelli³; Luca
Rastrelli³

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Rio de Janeiro. Rua Senador Furtado, 121/125, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20.270-021. E-mail: ana.tassis@ifrj.edu.br;

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ³Università degli Studi di Salerno, Itália.

Palavras-chave: MDR, Própolis, Pdr5p.

Keywords: MDR, Propolis, Pdr5p.

INTRODUÇÃO

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é encontrada tanto em células cancerosas quanto em microrganismos patogênicos, sendo a principal responsável pela falha na quimioterapia, devido a super expressão de bombas de efluxo pertencentes a super família dos transportadores ABC. Em *S. cerevisiae*, o gene PDR5 codifica o transportador Pdr5p, um membro da super família dos transportadores ABC. Esta proteína é homóloga a glicoproteína-P e a transportadores presentes em fungos, como CDR1p e CDR2p de *Candida albicans*, tornando-a um modelo de estudo do processo de MDR. Uma das estratégias usadas para reverter este fenômeno consiste na utilização de inibidores específicos, porém as drogas existentes apresentam alta toxicidade, dificultando seu uso na clínica. Estratégias mais recentes buscam em fontes naturais, como extratos de plantas, novos compostos capazes de inibir tais transportadores relacionados com efluxo de drogas. Neste estudo, avaliamos o efeito de uma série de compostos isolados a partir de própolis vermelho do Brasil, sobre a atividade ATPásica da Pdr5p e o acúmulo de rodamina 6G.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO) de todos os compostos obtidos a partir da purificação dos extratos de própolis vermelho, coletado no Brasil, os mesmos foram testados frente à atividade ATPásica da Pdr5p de leveduras, em uma concentração final de 100 μ M. Como pode ser observado na Figura 1, dentre os cinco compostos testados, apenas o CZ-01 foi capaz de abolir completamente a atividade da enzima. O IC₅₀ do composto é de 1,35 μ M, calculado a partir da curva dose resposta para a atividade ATPásica, com concentrações até 20 μ M (Figura 2).

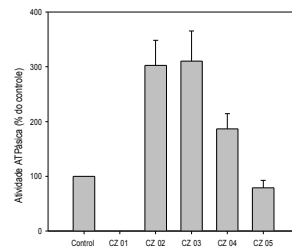


Figura 1: Efeito dos compostos, com concentração final de 100 μ M, na atividade da Pdr5p.

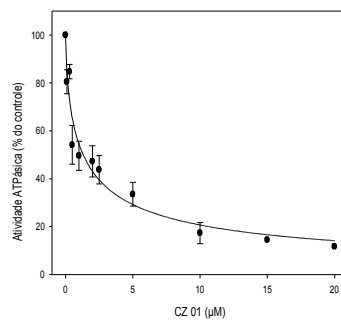


Figura 2: Curva de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p na presença do composto CZ-01.

Verificamos, a partir do dado da inibição da atividade, a capacidade do CZ-01 em inibir o transporte de Rodamina 6G (R6G) através do bloqueio do transportador Pdr5p. O resultado obtido mostra que o CZ-01 (na concentração de 100 μ M) foi capaz de impedir o efluxo da R6G, quando comparado com a célula que superexpressa o transportador Pdr5p, mostrando assim a capacidade de bloquear por completo a ação de extrusão de compostos, do interior da célula, promovida pelo mesmo (Figura 3).

Como é sabido que o própolis pode ser muito tóxico para bactérias e células humanas, foi testado a toxicidade do composto frente à levedura. A Figura 4 mostra que mesmo na presença de alta concentração de CZ-01 (100 μ M), não foi observado nenhum efeito tóxico nas células de *S. cerevisiae*.

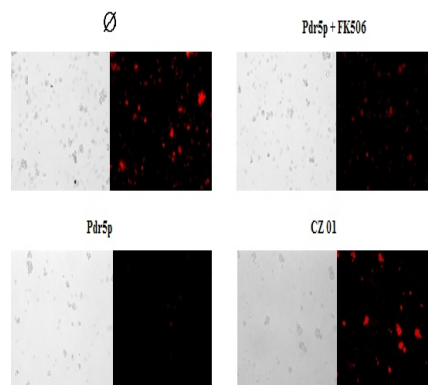


Figura 3: Efeito do composto CZ-01 na captação de Rodamina 6G.

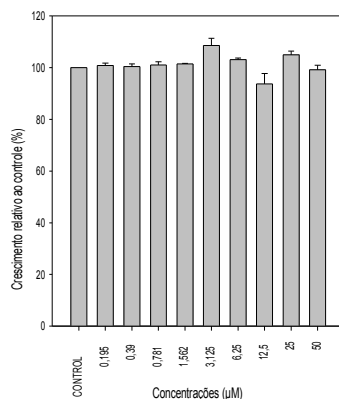


Figura 4: Avaliação da toxicidade do composto CZ-01.

CONCLUSÕES

Concluímos, com base nos resultados obtidos, que o composto CZ01 obtido dos extratos de própolis, originados do Brasil, é capaz de inibir o transportador Pdr5p, que promove o fenótipo de resistência múltipla em leveduras e fungos, sem causar danos à estes. Os dados são bastante promissores pois demonstram que o composto pode servir, no futuro, como possível medicamento para reversão da resistência múltipla em infecções fúngicas.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ/CNPq/FAPERJ/CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANNON *et al.* Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** 22(2), 291-321, 2009.
- LAMPING *et al.* Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function. **Fungal genetics and biology,** 47, 127-142, 2010.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM TRANSPORTADOR DA FAMÍLIA ABC EM *Oncopeltus fasciatus* E O SEU ENVOLVIMENTO NA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

Identification and characterization of an ABC family transporter in *Oncopeltus fasciatus* and its involvement in the insecticides resistance.

Beatriz dos Anjos F.S. da Silva^{1,2}; Gabriellen M.M. de Castro^{1,2}; Júlia Araújo de Freitas²; Ana Claudia Tassis^{1*}; Antônio Ferreira-Pereira²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Rio de Janeiro, RJ. Rua Senador Furtado, 121/125, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 20.270-021. E-mail: ana.tassis@ifrj.edu.²Laboratório de Bioquímica Microbiana, Dept. Microbiologia Geral, IMPPG/CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ.

Palavras-chave: Transportador ABC, MDR, Inseticidas
Keywords: Transporter, ABC, MDR, Inseticides

INTRODUÇÃO

Os inseticidas químicos são um importante mecanismo de controle dos vetores transmissores de doenças humanas e de agropecuária. Em geral, são drogas capazes de agir no sistema nervoso central dos insetos. O seu uso contínuo, indiscriminado e não-seletivo tem levado ao aparecimento de linhagens de insetos resistentes a várias classes de inseticidas. A resistência pode surgir por muitos mecanismos, um deles denominado de resistência metabólica, sendo causado pelo aumento de enzimas detoxificantes, tais como: glutathione-S-transferase, esterases e oxidases de função mista. Um mecanismo adicional é a resistência a múltiplas drogas (MDR). Neste trabalho utilizaremos a espécie *Oncopeltus fasciatus* (Figura 1) como modelo de MDR em insetos.

1. Manutenção dos insetos

Os insetos são mantidos em potes plásticos a temperatura ambiente, e alimentados com água filtrada e sementes de girassol descascadas, as quais foram mantidas previamente a -18 °C por 48 horas, com objetivo de matar ovos de carunchos.

2. Indução de resistência

A partir da colônia original são separados ovos no mesmo estágio de maturação para a formação de uma nova colônia (colônia controle). Desta colônia são separados, sempre que necessário, insetos no quinto estágio de ninfa para o tratamento com o inseticida Deltametrin. A colônia controle é mantida até o fim do trabalho.

Diferentes concentrações do inseticida serão aplicadas na região dorsal do abdome de cada inseto. O primeiro grupo tratado (F0) será mantido até a fase adulta, para que possam copular e produzir ovos, que serão separados e darão origem a uma nova colônia (F1). As ninfas F1 serão tratadas com uma concentração maior da droga, para a obtenção da F2. As próximas gerações serão tratadas com concentrações crescentes do inseticida, até a obtenção da F5 resistente ao Deltametrin.

3. Identificação de transportadores ABC

Os insetos resistentes (F5) e sensíveis (Controle) serão submetidos a dissecação para retirada de tubo digestório e corpos gordurosos, os quais serão solubilizados em SDS. A concentração de proteínas dos extratos será analisada pela metodologia descrita por Bradford e col. (1976).

As proteínas dos extratos serão separadas em SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose para posterior imunoblotting com anticorpo JSB1.

4. Expressão diferencial de proteínas de resistência a múltiplas drogas

A avaliação da expressão diferencial das proteínas relacionados ao fenótipo de MDR será realizada pela análise da diferença da densitometria das bandas marcadas no filme fotográfico após a marcação com anticorpo.

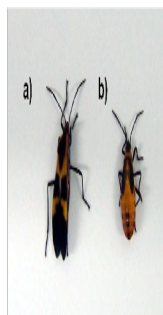


Figura 1: *Oncopeltus fasciatus*. (a) Adulto e (b) ninfa de estágio 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos insetos submetidos a tratamentos com concentrações crescentes de um organofosforado, será avaliada a expressão de proteínas relacionadas ao processo de MDR em seu trato digestivo e corpos gordurosos. Em trabalhos anteriores de nosso grupo, já foi evidenciada a ocorrência de uma expressão diferencial dessas proteínas relacionadas à MDR nos extratos da cabeça, tórax e abdômen dos insetos resistentes. (Figura 2).

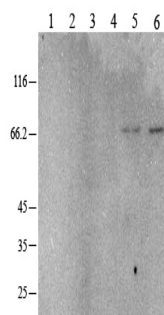
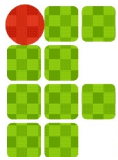


Figura 2. Western blot utilizando anticorpos JSB1 contra proteínas do extrato proteicos total de cabeça, tórax e abdome de insetos controle (lanes 1, 2 e 3, respectivamente) e do extrato proteico total de cabeça, tórax e abdome de insetos resistentes (lanes 4, 5 e 6, respectivamente). A massa molecular das proteínas padrões estão indicadas em quilodaltons, à esquerda das figuras.



CONCLUSÕES

A avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo de MDR nos diferentes órgãos isolados do inseto, assim como a caracterização desse processo, são objetivos do projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ/CNPq/CAPES/FAPERJ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**, 248-254, 1976.



PRODUÇÃO DE MINIMILHO COMO ESTRATÉGIA PARA INSERÇÃO DA ADUBAÇÃO VERDE EM UNIDADES ORGÂNICAS DE PRODUÇÃO DE HORTALIÇAS

Minicorn production like a strategy to inserption of the green fertilization in organic unities of vegetables production

Aramis Paes Pena Barcellos¹, Wallace Rodrigues de Oliveira¹, Shaiene Costa Moreno², Ana Amélia dos Santos Cordeiro³, Ednaldo da Silva Araújo³, José Guilherme Marinho Guerra³

¹Estudante do curso Técnico em Agropecuária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Nilo Peçanha (IFRJ). Rua José Breves, 550, Centro, Pinheiral/RJ. CEP: 27197-000. bolsista PIBIC Jr-CNPq-IFRJ. E-mail: shaiene.moreno@ifrj.edu.br. ²Professora do IFRJ, *campus* Nilo Peçanha, Pinheiral, RJ. ³Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ.

Palavras-chave: milho, fixação biológica de nitrogênio, sustentabilidade, agricultura familiar.
Keywords: corn, Nitrogen biological fixation, sustainability, familiar agriculture.

INTRODUÇÃO

O cultivo de hortaliças, principalmente no sistema de produção orgânico, é bastante dependente do aporte de adubos orgânicos. Todavia, face às dimensões reduzidas das unidades familiares de produção orgânica, o emprego de adubos orgânicos de origem animal é um fator limitante quando a integração pecuária-lavoura não é possível em nível de propriedade. Nesse sentido, a adubação verde com leguminosas torna-se particularmente importante, visto que o cultivo de plantas para tal fim confere ao agricultor certa autonomia em relação à disponibilidade de matéria orgânica, além de auxiliar no controle da erosão hídrica e da vegetação espontânea (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005). A introdução da técnica da adubação verde no cultivo de hortaliças pode proporcionar expressivos benefícios relacionados tanto à melhoria das características do solo, quanto à nutrição e desempenho agrônômico dos cultivos comerciais. Apesar disso, a adoção desta técnica ainda é bastante restrita nas unidades agrícolas dedicadas ao cultivo de hortaliças. Uma das razões mais relevantes é a dificuldade que o agricultor encontra para compatibilizar, no tempo e no espaço, a presença de adubos verdes e dos cultivos comerciais. Nesse contexto, o uso de leguminosas adubos verdes consorciadas com o milho pode resultar em geração de renda para o produtor, através da produção de minimilho, e também em produção de biomassa de qualidade para adubação verde, minimizando a problemática da adubação orgânica no cultivo de hortaliças em pequenas propriedades familiares. O minimilho é o nome dado à inflorescência feminina do milho (*Zea mays* L.) antes da polinização da espigeta da planta de milho. É a inflorescência do milho em desenvolvimento e não fertilizada. O minimilho é um produto industrializado na forma de conservas e encontrado em mercados destinados à culinária oriental, supermercados e em restaurantes, sendo usado principalmente como elemento decorativo em saladas vegetais, possuindo grande valor comercial (PEREIRA-FILHO *et al.*, 1998). Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar estratégias de manejo da cultura do milho para produção de minimilho, consorciado com leguminosas adubos verdes como uma estratégia para inserção da adubação verde em sistemas de produção de hortaliças.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de avaliação de técnicas de manejo de adubação verde associada à produção de mimimilho foi instalado no Módulo Agroecológico do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, *campus* Nilo Peçanha em Pinheiral-RJ. Inicialmente a área foi dividida em blocos em função da homogeneidade e foram colhidas amostras de solo para caracterização química da área experimental. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 1.

Após realização da amostragem de solo, a área experimental foi preparada e o experimento foi implantado em blocos casualizados com cinco tratamentos e cinco repetições. A leguminosa estudada foi a mucuna verde (*Mucuna pruriens*). Os tratamentos foram: monocultivo de milho; monocultivo de mucuna; consórcio de milho e mucuna semeados simultaneamente; consórcio de milho e mucuna, com semeadura da mucuna 15 dias após semeadura do milho; e consórcio de milho e mucuna, com semeadura da mucuna 30 dias após semeadura do milho. A semeadura do milho foi feita de forma a atingir densidades de 200.000 e 100.000 plantas ha⁻¹, respectivamente, no monocultivo e no consórcio com mucuna. As densidades de mucuna foram de 100.000 e 50.000 plantas ha⁻¹, respectivamente, no monocultivo e no consórcio com milho.

A colheita das espigas foi feita aos três dias após a emissão da inflorescência feminina. Foram colhidas espigas em uma área útil de 10 m² por parcela. As espigas colhidas foram contadas e pesadas a cada colheita. Após colheita do minimilho, por ocasião do pleno florescimento da mucuna, as plantas foram roçadas para o plantio do brócolis, hortaliça utilizada para mensurar o benefício da adubação verde. A colheita do brócolis foi realizada logo após a formação completa das cabeças. Foram colhidas e pesadas 10 plantas de cada parcela.

Os dados experimentais submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (P>0,05) (Scott & Knott, 1974).

Tabela 1. Caracterização química do solo (0-20 e 20-40 cm) da área experimental em diferentes blocos (subáreas que contém todos os tratamentos).

Subárea	pH	Al ³⁺	H ⁺ + Al ³⁺	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P	K ⁺	C	MO	N
		cmol _c dm ⁻³						mg kg ⁻¹		%	
0-20 cm											
Bloco 1	6,1	0,0	2,72	1,5	0,7	0,9	260,9	140,0	0,07	0,12	0,07
Bloco 2	6,2	0,0	2,03	2,3	1,1	1,2	272,1	82,0	0,55	0,94	0,15
Bloco 3	6,1	0,0	1,35	2,5	1,4	1,1	232,1	88,0	0,35	0,60	1,06
Bloco 4	6,1	0,0	2,56	2,0	1,0	1,0	172,4	84,0	0,54	0,93	0,12
Bloco 5	6,1	0,0	2,05	2,1	1,5	1,2	184,2	88,0	0,45	0,83	0,20
20-40 cm											
Bloco 1	6,1	0,0	1,96	1,5	0,6	0,9	295,7	220,0	0,83	1,42	0,095
Bloco 2	6,2	0,0	1,86	2,1	1,1	1,0	163,9	96,0	0,11	0,19	0,094
Bloco 3	6,2	0,0	3,10	1,0	0,4	0,7	112,4	88,0	0,16	0,28	0,089
Bloco 4	6,2	0,0	1,98	1,8	0,9	0,9	112,8	52,0	0,15	0,25	1,161
Bloco 5	6,2	0,0	1,75	2,0	0,8	1,0	111,4	86,0	0,16	0,26	0,098

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento que apresentou maior resposta na produção de minimilho foi o milho solteiro, o que já era esperado em função da densidade de plantio ser maior neste tratamento. A densidade de plantio do milho solteiro é o dobro do consórcio, entretanto, quando comparamos a produtividade do milho solteiro com a do consórcio milho + mucuna 30 dias, que foi o segundo melhor tratamento, o consórcio (com metade da densidade do milho solteiro) produziu bem mais que a metade da produção apresentada pelo milho solteiro, o que mostra um ganho proporcionado pela presença do adubo verde (Tabela 2). Esta resposta pode ser explicada pelo processo de fixação de nitrogênio realizado pelo adubo verde, o que pode ter beneficiado as plantas de milho.

O consórcio milho+mucuna 0 dias e 15 dias, apresentaram baixa produtividade. Foi observado visualmente que a competição da mucuna com o milho foi muito alta no período inicial de desenvolvimento da cultura e que as plantas de milho foram muito prejudicadas por esta competição, o que pode justificar esse resultado. Nesses dois casos, as plantas de mucuna se sobressaíram sobre as plantas de milho, o que aconteceu em maior intensidade no consórcio de 0 dias, ou seja, de plantio simultâneo, onde a mucuna interferiu inclusive na operação de colheita, não sendo este portanto, um sistema a ser recomendado para adoção por produtores rurais.

Tabela 2. Produção de minimilho (espigas comercializáveis) em 10 metros quadrados de área, plantados com milho solteiro e milho em consórcio com mucuna com densidades de 200.000 e 100.000 plantas ha⁻¹, respectivamente.

TRATAMENTO	ESPIGAS COMERCIALIZÁVEIS		
	NÚMERO (±EPM) ¹	PESO EM GRAMAS (±EPM) ¹	
Mucuna solteira	0 ± 0 c	0 ± 0 c	
Milho solteiro	220,2 ± 11,56 a	3.394,63 ± 189,78 a	
Milho + Mucuna 0 dias	102,8 ± 7,28 b	1.734,85 ± 40,71 c	
Milho + Mucuna 15 dias	112,8 ± 10,72 b	1.659,63 ± 68,12 c	
Milho + Mucuna 30 dias	136,2 ± 11,14 b	2.080,56 ± 115,59 b	

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P>0,05).

De acordo com os resultados obtidos, o sistema mais adequado, considerando apenas o cultivo de minimilho, é o sistema de consórcio de milho + mucuna 30 dias, ou seja, com o plantio da mucuna 30 dias após o plantio do milho, uma vez o milho se desenvolve inicialmente livre da competição com mucuna e se beneficia posteriormente da fixação de nitrogênio, com reflexo positivo na produtividade.

O tratamento que proporcionou a maior produtividade de brócolis foi a mucuna solteira. Tal resultado se deve ao fato deste ser o tratamento controle de abubação verde, ou seja, de mucuna solteira. O segundo melhor resultado foi observado com o consórcio milho + mucuna 0 dias e em seguida temos o tratamento milho + mucuna 15 dias (Tabela 3). Esse resultado pode ser justificado pelo fato de nestes tratamentos a mucuna ter se desenvolvido muito bem, em detrimento do milho, que “perdeu” a competição com a mucuna no início do desenvolvimento.

Este fato fez com que tenha se produzido nestes tratamentos um alto teor de massa verde da leguminosa, beneficiando a hortaliça. Tal fato não ocorreu no consórcio milho + mucuna 30 dias (Tabela 3), onde houve uma pequena produção de biomassa de adubação verde e conseqüentemente, menor aporte de nitrogênio no solo, resultando em menor produção de brócolis.

Tabela 3. Produção de brócolis (peso de 10 cabeças) após plantio de milho solteiro, adubação verde com mucuna solteira e com mucuna consorciada com milho em diferentes sistemas de plantio.

TRATAMENTO	PESO EM GRAMAS (\pm EPM) ¹
Mucuna solteira	5.21 \pm 0,27 a
Milho solteiro	2.56 \pm 0,16 d
Milho + Mucuna 0 dias	4.07 \pm 0,17 b
Milho + Mucuna 15 dias	3.42 \pm 0,03 c
Milho + Mucuna 30 dias	2.24 \pm 0,15 d

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P > 0,05$).

CONCLUSÕES

- O consórcio de milho com mucuna verde para produção de minimilho se mostrou uma técnica eficiente para introdução da adubação verde em pequenas unidades de produção orgânica de hortaliças.
- O brócolis, hortaliça testada neste trabalho, apresentou resposta positiva à adubação verde que antecedeu ao plantio, com aumento significativo na produtividade, atestando o benefício da adubação verde para a produção agrícola. O sistema de consórcio que melhor contribuiu para o desenvolvimento das hortaliças foi o consórcio em que a mucuna foi plantada simultaneamente com o milho. Entretanto, como tal sistema proporciona dificuldades à colheita devido ao elevado crescimento da mucuna, o consórcio milho + mucuna 15 dias pode ser, na prática, o sistema mais adequado.
- O consórcio milho + mucuna 30 dias, apesar de apresentar boa produção de minimilho quando comparado aos outros sistemas de consórcio, não apresentou benefícios para a produção de brócolis, sendo estatisticamente igual ao tratamento milho solteiro e portanto não indicado caso o interesse seja a adubação verde visando a produção da hortaliça.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ESPINDOLA, JAA.; GUERRA, JGM.; ALMEIDA, DL de. Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org.). Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura orgânica sustentável. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2: 435-451, 2005. PEREIRA-FILHO, IA; GAMA, EEG; FURTADO, AAL. A produção do minimilho. **EMBRAPA – CNPMS (Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo). Comunicado Técnico**, 7: 1-4, 1998.

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIOFILMES PREPARADOS A PARTIR DE AMIDO

Preparation and evaluation of biofilms prepared by starch

Juliana de Carvalho do Couto¹; Paula de Miranda Costa Maciel¹; Maria Inês Bruno Tavares²

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *Campus Realengo*, R. Carlos Wenceslau, 343, Realengo, Rio de Janeiro, RJ. CEP: 21.715-000. ²Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA/UFRJ). E-mail: paula.maciel@ifrj.edu.br

Palavras-chave: Biofilme, amido, análise sensorial, biodegradação.

Keywords: Biofilm, starch, sensorial analysis, biodegradation.

INTRODUÇÃO

No início do século XXI, a sociedade se deparou com um problema ainda inexistente que era a poluição ambiental. Este grande problema, que perdura até os dias de hoje pode ser atribuído a duas causas principais: o contínuo aumento da população e o vertiginoso desenvolvimento industrial. Dentre os causadores desta poluição ambiental estão os resíduos sólidos onde podem ser citados: metais, vidros, papel, plástico, entre outros (MANO *et al.*, 2005).

A intensidade desta poluição foi observada e sentida pela sociedade quando começaram a constituir problema os imensos volumes de objetos plásticos utilizados e descartados aleatoriamente. Para se ter uma ideia a produção mundial de plásticos é estimada em 70 milhões de toneladas por ano, das quais um terço é lançado no lixo municipal. Os plásticos ocupam o seu lugar no mercado de embalagens, representando aproximadamente 40% de todo plástico consumido atualmente no Brasil.

A preocupação com a poluição ambiental então, aumentou muito devido ao fato destes resíduos de polímeros sintéticos apresentarem elevada resistência à destruição pelas intempéries (MANO *et al.*, 2005). Uma forma de amenizar a produção de novos resíduos plásticos no meio ambiente seria a criação de alternativas que viessem a substituir este tipo de material.

Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos em relação aos filmes biodegradáveis, principalmente quando se considera o desenvolvimento de novos produtos que provoquem menor impacto ambiental (ROSA *et al.*, 2001; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). No entanto, para a maioria das empresas, a utilização destes materiais ainda é inviável, devido tanto às perdas de propriedades quanto ao seu alto custo quando comparados aos polímeros sintéticos convencionais (ROSA *et al.*, 2001).

Os filmes biodegradáveis podem ser produzidos a partir de polissacarídeos e proteínas cujas cadeias são longas e capazes de produzir matrizes contínuas que dão estrutura ao filme. Os principais polissacarídeos de interesse comercial são celulose e amido (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

O amido é um polímero natural, renovável e biodegradável, e é armazenado pelas plantas na forma de pequenos grânulos, cujos tamanhos médios variam entre 0,5 e 100 μm de acordo com a fonte. O amido é composto usualmente por dois tipos de macromoléculas que se apresentam bem diferentes entre si, tanto em termos de estrutura quanto em termos de propriedades. Uma delas é a amilose, que se apresenta como uma molécula essencialmente linear consistindo de unidades de anidroglicose que são interligadas por ligações glicosídicas do tipo $\square - (1 \rightarrow 4)$. A amilopectina apresenta a mesma cadeia principal que a amilose, mas apresenta pontos de ramificação que são unidos a cadeia principal por ligações glicosídicas do tipo $\square - (1 \rightarrow 6)$.

O amido pode servir como base para a preparação de biofilmes, que seria uma alternativa bastante viável, já que partiria de um componente totalmente biodegradável.

Uma possibilidade para a produção deste tipo de material pode advir do fato de no Brasil ocorrer um desperdício de frutas bastante acentuado, e o amido proveniente destas frutas pode ser uma boa fonte para a produção dos biofilmes.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo a preparação e a avaliação de biofilmes. Na preparação foram utilizados dois tipos de amido, o de milho (obtido comercialmente) e o amido da semente de um fruto, conhecido como cumbaru (fruto abundante na região do Mato Grosso). Para uma avaliação minuciosa destes filmes, alguns testes foram realizados, como: a análise sensorial, testes de vida de prateleira, de conservação e de biodegradabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na parte experimental deste trabalho, vários biofilmes foram preparados variando-se o teor de amido e de água destilada, até ser alcançada a concentração ideal (o método de obtenção foi o mesmo para os dois tipos de amido). Os biofilmes obtidos estão sendo mostrados na Figura 1.

Posteriormente, os filmes foram avaliados através da análise sensorial, testes de vida de prateleira, de conservação e de biodegradabilidade. Estes resultados são apresentados a seguir:

1. Análise sensorial:

Nesta etapa os filmes foram avaliados através dos seguintes métodos:

- Descritivo:

Os biofilmes preparados a partir do amido de milho se apresentaram transparentes e com ausência de odor. Já os que foram preparados a partir do amido do cumbaru apresentaram coloração amarelada e também não apresentaram odor.

- Discriminativo:

Os biofilmes preparados a partir do amido de milho se apresentaram mais transparentes, homogêneos e resistentes quando comparados aos do amido do cumbaru.

- Afetivo:

Segundo os aspectos avaliados anteriormente, como os biofilmes preparados a partir do amido de milho apresentaram transparência, ausência de odor, homogeneidade e resistência, eles tiveram maior aceitação frente aos filmes preparados a partir do amido de cumbaru.

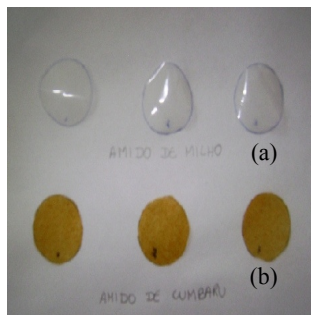


Figura 1. Biofilmes preparados a partir do amido de milho(a) e de cumbaru (b)

2. Teste de biodegradabilidade

Um problema que surge com o uso e a comercialização de polímeros biodegradáveis é a ausência de métodos padronizados que avaliem a biodegradação desse tipo de material e que sejam reconhecidos nos diversos países e comunidades (ROSA, 2003).

Para um polímero biodegradável ser utilizado para certa aplicação, ele deve degradar no meio em que terá seu destino final, ou seja, após o descarte (ROSA, 2003). Desse modo, o meio escolhido para avaliar a biodegradabilidade dos filmes de amido de milho e de cumbaru foi o composto orgânico (húmus).

O solo (húmus) ficou em repouso por sessenta dias para que ocorresse fermentação aeróbia, e durante este tempo, a temperatura do mesmo foi observada. Ao final do processo, a mesma estabilizou em aproximadamente 25°C. O composto foi peneirado utilizando-se uma peneira com malha de 2,4mm.

Após a preparação, o solo foi analisado, através da determinação de pH, teor de umidade e porcentagem de matéria orgânica. Em seguida, os filmes de amido, tanto de milho como de cumbaru foram inoculados no composto orgânico.

Após quarenta e oito horas os filmes foram retirados do solo para análise e nenhuma alteração aparente foi observada. Porém, após seis dias, os filmes foram novamente retirados do solo e observou-se que eles estavam totalmente degradados (Figura 2).

Uma nova análise do solo foi feita para comparar as características do mesmo antes e após o processo de biodegradação. Esta análise tem a finalidade de confirmar a presença de atividade microbiológica responsável pelo desgaste dos biofilmes.

3. Teste de vida de prateleira

Neste teste, filmes de amido de milho e cumbaru foram preparados e deixados expostos em uma bancada, para avaliar seu comportamento sob condições ambientes. Após sessenta dias nenhuma alteração foi observada.

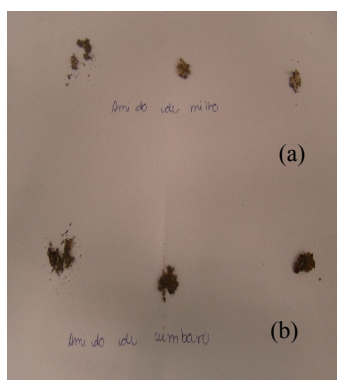


Figura 2. Biofilmes de amido de milho (a) e de cumbaru (b), após o teste de biodegradabilidade

4. Teste de conservação em geladeira

Neste teste, os dois tipos de biofilmes foram deixados em geladeira para avaliar o comportamento dos mesmos neste meio. Após sessenta dias, os filmes não mostraram alteração aparente.

CONCLUSÕES

A metodologia foi empregada com êxito sendo possível preparar os biofilmes em diferentes teores de amido/água e determinar a concentração ideal.

Os testes realizados permitiram uma avaliação minuciosa dos filmes. Pela análise sensorial foi possível fazer uma observação quanto à coloração, o odor, a aceitação e preferência acerca dos biofilmes. Os testes de vida de prateleira e de conservação permitiram analisar o comportamento dos filmes sob diferentes condições. Através do teste de biodegradabilidade observou-se o tempo de degradação destes filmes no solo.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro e ao IMA/UFRJ pela colaboração na parte experimental do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MANO, EB; PACHECO, EBAV; BONELLI, CMC. **Meio ambiente, poluição e reciclagem**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgarg Blücher, 2005, 182 p.
- ROSA, DS; FRANCO, BLM; CALIL, MR. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, **11**: 82-88, 2001.
- FRANCHETTI, SMM; MARCONATO, JC. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, **29**: 811-816, 2006.
- ROSA, DS. **Biodegradação: um ensaio com polímeros**. São Paulo, SP: Universidade São Francisco Editora, 2003. 61 p.

ESTUDO DE MUTANTES DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 DEFICIENTES EM GENES RELACIONADOS COM PRODUÇÃO DE BIOFILME

Study of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 mutants, deficient in genes related with biofilm production

Santos, J.C.S.¹, Maia, N.C.¹, Pádua, V.L.M.², Seabra, S.H.², Hemerly, A.S.³, Baldani, J.I.⁴, Coelho, A.³ & Loureiro MM^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, IFRJ, *campus* Duque de Caxias. Av. República do Paraguai, 120, Bairro Sarapuí, Duque de Caxias, RJ. CEP 25050-100; ²Centro Universitário da Zona Oeste, UEZO; ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ; ⁴Embrapa-Agrobiologia-RJ. E-mail: marcio.loureiro@ifrj.edu.br

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Biofilme; Interação Planta-Bactéria.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; biofilm; plant-bacteria interaction.

INTRODUÇÃO

Diversas cepas bacterianas são muito criativas em seus mecanismos regulatórios, especialmente os relacionados à adaptação a mudanças súbitas na disponibilidade de nutrientes e a respostas de defesa secundárias do hospedeiro. Um exemplo particular de adaptação bacteriana é a capacidade de crescer como biofilme formando uma matriz expolissacarídica.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica que promove o crescimento vegetal e coloniza os espaços intercelulares da cana-de-açúcar sem proporcionar sintomas de doença. Cabe ressaltar que o vegetal favorece a interação com o microrganismo ao produzir glicoproteínas em suas raízes, criando um ambiente favorável a uma colonização bacteriana inicial, para posteriormente vir a colonizar os espaços intercelulares do vegetal, com isso o *Gluconacetobacter diazotrophicus* é considerado um modelo de interação planta-bactéria com a cana-de-açúcar.

Adicionalmente, este endófito é comumente detectado em associação com outras espécies de vegetais como: batata doce, café e abacaxi, o que enfatiza sua importância para outros hospedeiros vegetais, pois além de fornecer nitrogênio fixado biologicamente, também auxilia no desenvolvimento vegetal através da síntese de fitohormônios (auxina e giberilina), além de possuir atividade antagonista a fitopatógenos através da produção de bacteriocinas (ROJAS *et al.* 2005).

O sequenciamento completo do genoma do *G. diazotrophicus* PAL5 foi realizado pelo consórcio Riogene (BERTALAN *et al.* 2009), e paralelamente a este trabalho, foi gerada uma biblioteca de mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5 na Embrapa-Agrobiologia, Seropédica, RJ, criada a partir de inserções randômicas, geradas com uma versão do elemento de transposição Tn5 no cromossomo deste endófito, utilizando o kit de mutagênese randômica EZ-Tn5 TM <KAN-2>Tnp TransposomeTM (Epicentre®).

Este trabalho tem como base, a seleção e análise de mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5, com reduzida capacidade de formação de biofilme. Para seleção destes mutantes, utilizou-se culturas em placas de poliestireno de 96 poços, contendo 1 mL de meio LGIP suplementado com superfície teste de lã de vidro, os quais foram submetidos a ensaios colorimétricos com cristal violeta.

Além disso, para caracterização das mutações, tais mutantes selecionados foram submetidos a reações de sequenciamento bi-direcional de DNA genômico com primers transposon específicos, reagente BigDye terminator e sequenciador capilar ABI3130 (Applied Biosystems®).

Adicionalmente, para caracterizações fenotípicas, realizamos novos ensaios colorimétricos com cristal violeta e pelo método Dubois (fenol sulfúrico), assim como microscopia eletrônica de varredura e análises proteômicas em espectrômetros de massas Maldi Tof, Maldi Tof Tof e Maldi Q-tof.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram pré-selecionados 15 mutantes com baixa produção de biofilme, a partir de 02 placas da biblioteca de mutantes. Posteriormente, estes 15 mutantes foram submetidos a novos testes de quantificação de produção de biofilme (cristal violeta e método Dubois) (Figura 1).

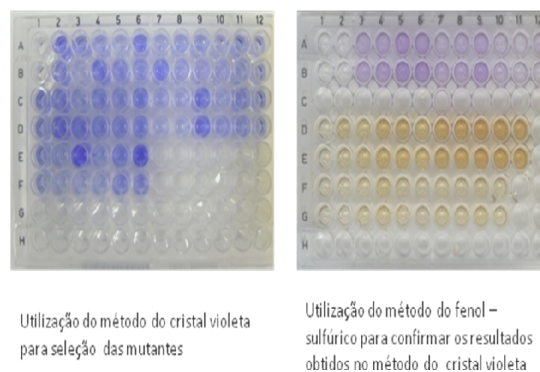


Figura 1. Ensaio comparativo através de espectrofotometria para comparação quantitativa da produção de biofilme da cepa selvagem em relação a 15 mutantes Tn5 de *G. diazotrophicus* PAL5 selecionados de nossa biblioteca.

Dentre esses 15 mutantes foram selecionados dois como objeto de estudo. Um destes mutantes sofreu mutação em um gene de um regulador transcricional com domínio LacI. Enquanto no outro mutante, foi detectada uma inserção no gene da proteína diguanilato ciclase, a qual possui um domínio GGDEF, e geralmente encontra-se associada com regulação da síntese di-GMPc (Figura 2).

Estes mutantes e a bactéria selvagem foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura, onde pudemos observar expressivas alterações do processo de produção de biofilme. O mutante com inserção no gene da proteína diguanilato ciclase (GGDEF) apresentou baixa produção de biofilme, enquanto que o mutante com inserção no gene de um regulador transcricional LacI apresentou anormalidades na estrutura do biofilme formado, bem como na sua manutenção, quando comparados com a cepa selvagem de *G. diazotrophicus* PAL5, o que indica a possibilidade destes mutantes apresentarem baixa colonização vegetal, visto que os biofilmes são descritos na literatura, como importantes mecanismos para o estabelecimento de interações benéficas planta-bactéria (Figura3).

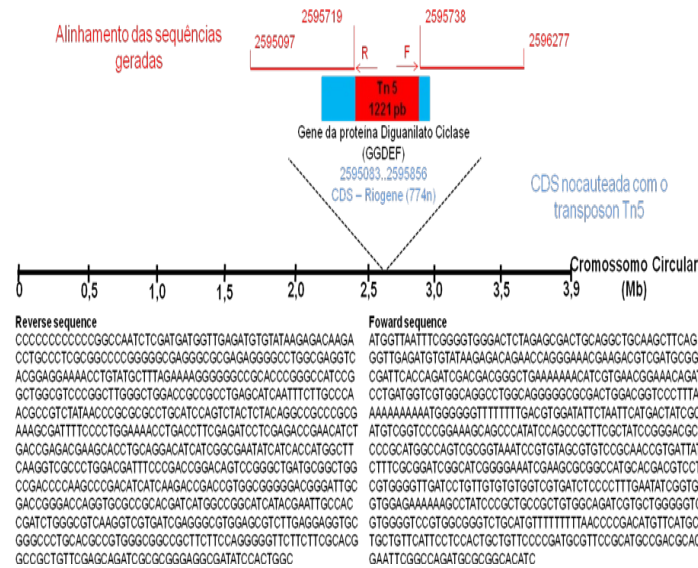
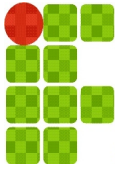


Figura 2. Exemplo de representação esquemática do alinhamento de seqüências de DNA geradas através de sequenciamento bidirecional, a partir de DNA genômico purificado de um mutante nocauteado no gene da proteína Diguanylato Ciclase (GGDEF).

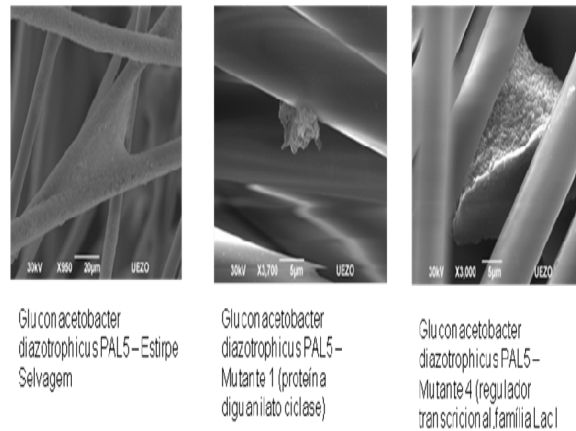


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura da cepa selvagem de *G. diazotrophicus* PAL5 e das linhagens mutantes GGDEF e Lac I.

Estes mutantes estão sendo submetidos a análises proteômicas, para realizamos uma análise global das proteínas diferencialmente expressas, observadas através de análises comparativas entre os perfis protéicos gerados pelas linhagens mutantes e selvagem, em condições ótimas de crescimento bacteriano. Para execução destas análises, realizamos extração e purificação de extratos protéicos totais, seguido de quantificação e análises de perfis protéicos gerados através das metodologias de SDS Page e géis bidimensionais.

Através da metodologia de SDS Page (Figura 4), excisamos 05 bandas de proteínas diferencialmente expressa do mutante GGDEF e 02 bandas do mutante LacI, o que possibilitou a identificação de 121 proteínas no mutante com inserção no gene da proteína diguanilato ciclase (GGDEF) e 11 proteínas no mutante do regulador transcricional com domínio LacI (Dados não exibidos).

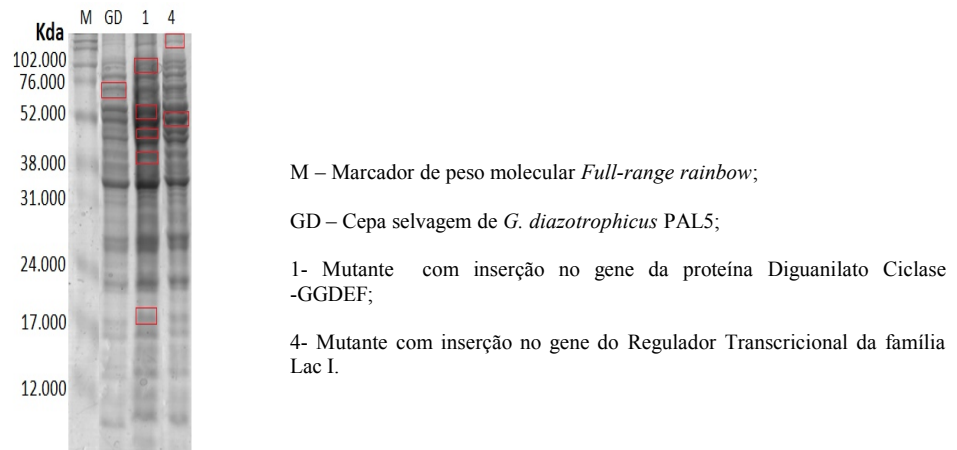


Figura 4. Gel de SDS page de extrato total de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 e mutantes GGDEF e LacI.

Através da análise de géis bidimensionais, pudemos verificar a presença de diversas proteínas diferencialmente expressas, nos mutantes analisados (Figura 5), entretanto, até a presente data só conseguimos identificar 114 proteínas no mutante do regulador transcricional com domínio LacI (Dados não exibidos).

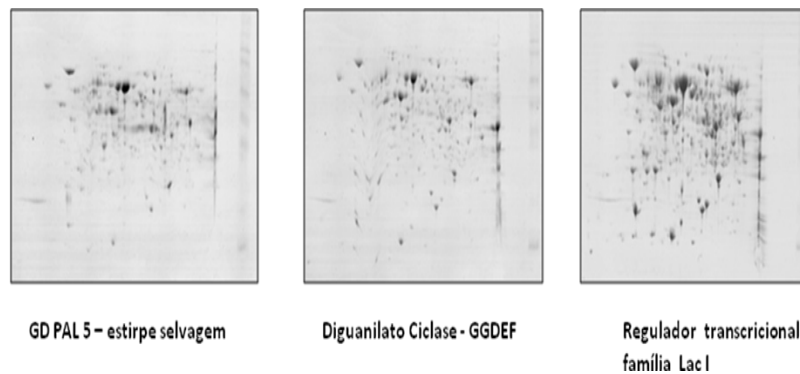


Figura 5. Géis bidimensionais de extrato total de proteínas da cepa selvagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e das bactérias mutantes GGDEF e Lac I.

Através da análise em espectrômetro de massa Madi Tof-Tof das proteínas diferencialmente expressas excisadas de geis bidimensionais do mutante LacI, identificamos um regulador de duplo componente, o qual geralmente funciona como um complexo sistema de transdução de sinais e monitoramento, que permite os mais variados microorganismos se adaptarem e sobreviverem as mudanças do meio em que se encontra. Este sistema geralmente é composto por uma proteína histidina quinase, que possui um domínio de reconhecimento de sinal, que se autofosforila quando adequadamente estimulada, a qual passa atuar diretamente relacionada a mobilidade e produção exopolissacarídeos (JERS *et al.*, 2011). Este dado corrobora com as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, onde o mutante LacI apresentou grande produção de biofilme, sendo que aparentemente este biofilme, apresenta aspecto instável e possui baixa capacidade de adesão a superfície teste de lã de vidro (Figura 3). Neste sentido, acreditamos que o nocaute do gene do regulador transcricional LacI, possa ter induzido uma elevada expressão deste receptor, acarretando uma maior produção e secreção de exopolissacarídeos, porém esta produção aumentada não foi capaz de manter o biofilme estável.

Além disso, verificamos nas análises proteômicas de bandas excisadas de géis de SDS Page do mutante da enzima diguanilato ciclase, uma elevada produção da enzima histidinol dehidrogenase, a qual é um produto do gene *HisD*, que geralmente é utilizado como um mediador na etapa final da via metabólica de histidina (PAHWA *et al.*, 2010), cujo esta via metabólica é de suma importância para o funcionamento da histidina quinase, a qual é utilizada como um domínio de reconhecimento de sinal que se autofosforila e também está diretamente ligada a mobilidade e produção de exopolissacarídeos (JERNAL & SCHIRMER, 2009), entretanto, no caso deste mutante quando submetido a microscopia eletrônica de varredura, apresentou baixa produção de biofilme em contato com a superfície teste de lã de vidro (Figura 3), pois provavelmente o gene da diguanilato ciclase e da histidinol dehidrogenase devam estar atuando dentro da mesma via metabólica, a qual possivelmente deva estar sendo regulada pela enzima diguanilato ciclase.

CONCLUSÕES

Com os experimentos conduzidos até este momento, podemos verificar diversas alterações fenotípicas produzidas através das mutações randômicas realizadas, porém ainda se sabe muito pouco sobre os processos que envolvem a produção, maturação e desenvolvimento do biofilme de *G. diazotrophicus* PAL5.

Tendo conhecimento da importância desse mecanismo para o processo de colonização vegetal, pretendemos submeter esses mutantes a interação com plântulas de cana de açúcar, para estimarmos as taxas de colonização vegetal, bem como analisarmos tecidos vegetais colonizados, através de microscopias eletrônicas de transmissão e varredura. Paralelamente, iremos iniciar os experimentos de complementação dos mutantes em análise, com finalidade de revertermos a mutação produzida.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ, Finep-MCT, Faperj, Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTALAN M. *et al.*. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **BMC Genomics**, **10**: 450-459, 2009.

JENAL U; SCHIRMER T. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signaling, **NATURE**. doi:10.1038/nrmicro2203, 2009.

JERS C, KOBIR A, SØNDERGAARD EO, JENSEN PR & MIJAKOVIC I. *Bacillus subtilis* Two-Component System Sensory Kinase DegS Is Regulated by Serine Phosphorylation in Its Input Domain. **PLoS ONE**, 6(2): 1-10, 2011.

MUNÕZ-ROJAS J; FUENTES-RAMÍREZ LE; CABALLERO-MELLADO J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 54: 57-66, 2005.

PAHWA S; KAUR S; JAIN, R. Structure based design of novel inhibitors for histidinol dehydrogenase from *Geotrichum candidum*. **Elsevier Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, doi:10.1016/j.bmcl.2010.04.116, 2010.

ESTUDOS PRELIMINARES VISANDO O APROVEITAMENTO DO “PÁRA-RAIO” (*Melia azedarach* L. - MELIACEAE)

Preliminaries studies aiming the “para-raio” use (*Melia azedarach* L. - MELIACEAE)

John Lee Alves Melo¹; Joyce Cristina Castro¹; Sara Godinho de Lima¹; Tamara de Souza N. Pinto¹;
Maria Inês Teixeira^{2*}; Carlos Alexandre Marques¹; Flávio de Almeida Violante^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Nilópolis. Rua Lúcio Tavares, 1045, Nova Cidade, Nilópolis, Rio de Janeiro, RJ. CEP 26.530-060. E-mail: flavio.violante@ifrj.edu.br. ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Duque de Caxias. Avenida República do Paraguai, 120, Sarapuí, Duque de Caxias, RJ. CEP 25.050-100. E-mail: maria.teixeira@ifrj.edu.br

Palavras-chave: *Melia azedarach*, para-raio, Nim.

Keywords: *Melia azedarach*, para-raio, Nim.

INTRODUÇÃO

Melia azedarach L. é uma espécie da família Meliaceae, chamada popularmente de “Pára-raio” no estado do Rio de Janeiro. Diversos autores apontam diferentes atividades atribuídas a constituintes químicos distintos desta família. São atribuídas a ela atividades antifúngica, bactericida, carrapaticida, inseticida, contra nematóides, além de ser considerada, em alguns países, tóxica ao homem (ARAÚJO *et al.*, 2009; VIEGAS-JÚNIOR, 2003). A espécie mais conhecida desta família é o Nim (*Azadirachta indica*), muito explorada como inseticida natural, inclusive com diversos estudos feitos pela Embrapa (NEVES *et al.*, 2008). As duas espécies foram trazidas do continente asiático e se adaptaram muito bem ao território brasileiro. No entanto, a falta de estudos comparativos entre Nim e Pára-raio suscita dúvidas quanto ao potencial de utilização da última, visto que o Nim ainda é bastante explorado. Com isso, o Pára-raio talvez seja uma espécie cujo aproveitamento econômico pode estar aquém do seu potencial como produto natural. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos, a realização de uma busca bibliográfica mais ampla, além da execução de extrações de folhas e frutos, seguidas de testes de atividade biológica, a fim de se obter informações mais precisas sobre sua atividade biológica. Além disso, experimentos foram realizados visando obter um protocolo de cultivo e produção de mudas de *Melia azedarach*.

Para realização deste trabalho, ramos com folhas, flores e frutos (verdes e maduros) foram coletados em Nilópolis, RJ, às margens da rodovia via-Light. Após coleta, esses ramos foram separados para a confecção de exsiccatas (Figura 1) e posterior análise morfológica de autenticidade botânica, comparando-se as características observadas no material coletado com as descritas na literatura.

O cultivo foi realizado com o plantio de sementes que foram submetidas a três condições distintas: (i) escarificação; (ii) cocção em água por aproximadamente 2 minutos ou (iii) plantados sem tratamento prévio. Foram usados 20 tubetes plásticos para cada tratamento, tendo-se plantado 1 semente por tubete, conforme o caso. Como substratos foram usados terra preta ou um “leito de cultivo” composto por terra preta, esterco bovino e argila, na proporção 3:1:1. Em tubetes contendo ambos os substratos plantaram-se sementes escarificadas; sementes fervidas em água por aproximadamente 2 minutos e sementes sem tratamento, totalizando 120 tubetes. O tempo necessário para germinação e o número de sementes germinadas foram avaliados. Paralelamente, foram realizadas extrações das folhas e frutos coletados. Essas extrações foram realizadas em etanol e em hexano, à quente, com o auxílio do Soxhlet, por aproximadamente seis horas e à frio, no qual as folhas e frutos foram deixados nesses solventes por sete dias. Para a realização dos testes de atividade biológica, utilizou-se giz escolar embebido nos extratos e, posteriormente, banhado em óleo usado para frituras pelos restaurantes locais. Papéis de filtro foram riscados com o giz, previamente preparado, e colocados em placas de Petri, onde foram colocadas baratas (*Periplaneta americana*) que foram coletadas através de armadilhas espalhadas pelo *campus* do IFRJ em Nilópolis. Observou-se, por uma hora e meia, a reação apresentada pelas baratas ao “giz mata-baratas” confeccionado conforme descrito. Também foram realizados testes de atividade tóxica contra caramujos-africanos (*Achatina fulica*) coletados no *campus* Nilópolis e em São João de Meriti, RJ, no qual foi utilizado extrato etanólico da folha, extraído à frio, realizando-se, simultaneamente, um ensaio controle utilizando apenas a mistura de álcool e água, usada para solubilizar o extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do exame das características morfológicas confirmou-se a autenticidade botânica da espécie (*Melia azedarach*) (Figuras 4-8). Os frutos armazenados no laboratório mostraram-se naturalmente muito sensíveis à infestação por fungos, contrariando informações de que esta espécie teria atividade fungicida (Figuras 2-3). Os experimentos de cultivo foram bem sucedidos, pois foi possível quebrar a dormência da semente, já relatada em estudos anteriores (NEVES *et al.*, 2008). Em 19 dias, houve germinação de duas das sementes escarificadas e uma semente fervida, ambas cultivadas na mistura de esterco bovino, terra preta e argila (leito). Após 28 dias de plantio, 11 tubetes de sementes escarificadas (55%), cultivadas no leito, germinaram. Três sementes sem tratamento, cultivadas em leito, também germinaram e apenas 1 semente fervida, em um tubete com leito, germinou. Nenhuma semente em terra pura, independente do tipo de tratamento para quebra de dormência, germinou. Com isso, estabeleceu-se um protocolo de cultivo para esta espécie.

O resultado do teste de atividade moluscicida foi negativo para o extrato etanólico da folha. Novos testes com novos métodos para solubilização dos extratos serão posteriormente feitos. O teste de atividade inseticida (contra baratas), feito com giz previamente produzido usando-se os extratos hexânico e etanólico da folha (feitos à frio) e com extratos hexânico e etanólico dos frutos (feitos à frio), posteriormente embebidos no óleo usado em frituras, revelaram resultado negativo, pois mesmo após uma hora e meia de exposição aos extratos não houve reações de repelência ou morte. Novos métodos para confecção do giz, bem como novas metodologias para realização desses testes serão executados na continuidade do presente trabalho. Testes para verificação da atividade antimicrobiana dos extratos também estão sendo realizados a fim de avaliarmos seu potencial de inibição sobre micro-organismos distintos.

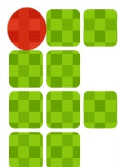
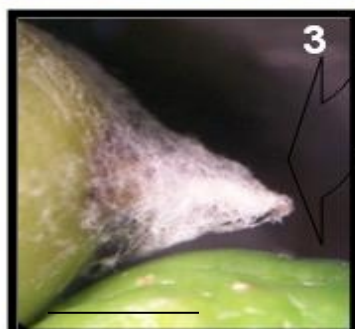
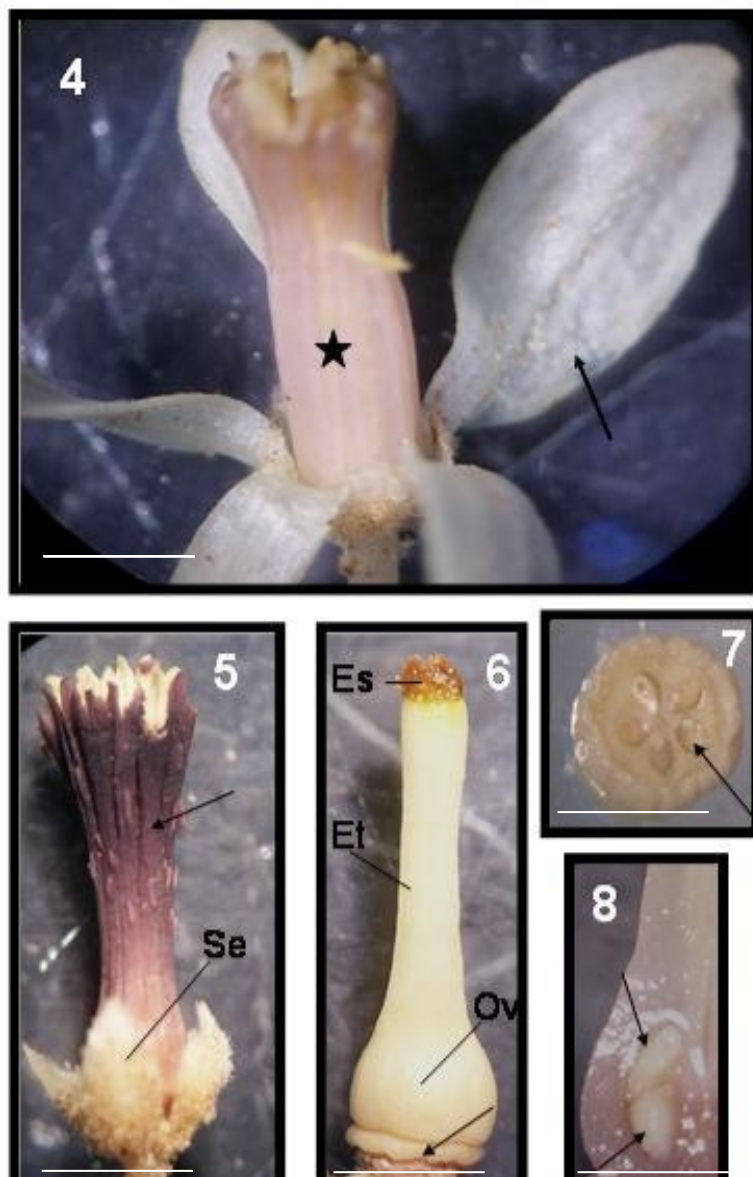


Figura 1. Ramo florífero de *Melia azedarach* após prensagem e secagem para confecção de exsicata.
Barra = 2cm



Figuras 2-3. Frutos de *M. azedarach*. Figura 2. Frutos em diferentes estádios de maturação, mostrando infestação por fungos mesmo após secagem em estufa. Barra = 2cm. Figura 3. Detalhe dos fungos infestando um fruto. Barra = 4mm.



Figuras 4-8. Aspectos morfológicos da flor. Figura 4. Flor andrógina em detalhe, mostrando as cinco pétalas (seta) e o tubo formado pela soldadura dos filetes (estrela). Figura 5. Tubo formado pelos filetes (seta) e sépalas em detalhe (Se). Figura 6. Pistilo em detalhe, mostrando o estigma (Es), o estilete (Et) e o ovário (Ov) seguido pelo nectário floral (seta). Figura 7. Secção transversal da nervura mediana do ovário, mostrando os óvulos distribuídos em cinco lóculos (seta). Figura 8. Detalhe dos dois óvulos que ocorrem em cada lóculo em secção longitudinal (seta). Barras = 2cm.

CONCLUSÕES

- No que diz respeito à análise das características morfológicas das folhas, frutos e, principalmente, das flores, confirmou-se a autenticidade botânica do material coletado (*Melia azedarach* L. – Meliaceae).
- Concluiu-se que a melhor forma de cultivo para esta espécie é a utilização do “leito de cultivo” como substrato e sementes escarificadas, pois o leito fornece mais nutrientes e a quantidade de água para germinação. Além disso, a escarificação proporciona a quebra da dormência, facilitando a germinação das sementes.
- Os resultados obtidos relativos aos testes de atividade biológica ainda não são conclusivos, pois tanto no ensaio feito com baratas quanto nos testes de atividade moluscicida não houve resultado positivo. Logo, concluiu-se que a metodologia de análise necessita ser revista, aprimorada e ampliada.
- Devido ao crescimento de fungos nos frutos e nos extratos aquosos das folhas e frutos questiona-se a atividade fungicida da referida espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao IFRJ e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO SAC.; TEIXEIRA MFS; DANTAS TVM *et al.* Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (Meliaceae): um levantamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, **76**: 141-148, 2009.
- NEVES EJM; CARPANEZZI AA; VIANA PA *et al.* **A cultura do nim**. Coleção Plantar, 1ª edição. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, **26**(3): 390-400, 2003.