

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

ESTUDO DA MISTURA
CARBOXIMETILCELULOSE/LITHOTHAMNIUM
COMO VEÍCULO PARA INOCULANTES
RIZOBIANOS

JÉSSICA FEITOZA DA ROCHA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO DA MISTURA
CARBOXIMETILCELULOSE/LITHOTHAMNIUM COMO VEÍCULO
PARA INOCULANTES RIZOBIANOS**

JÉSSICA FEITOZA DA ROCHA

Sob a Orientação do Professor
Paulo Jansen de Oliveira

e Co-orientação da Pesquisadora
Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Janeiro, 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R672e Rocha, Jéssica Feitoza da, 1992-
Estudo da mistura
carboximetilcelulose/Lithothamnium como veículo
para inoculantes rizobianos. / Jéssica Feitoza da
Rocha. 2018.
65 f.: il.

Orientador: Paulo Jansen de Oliveira.
Coorientadora: Norma Gouvêa Rumjanek.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Engenharia Química, 2018.

1. Inoculantes Rizobianos. 2. Lithothamnium. 3.
Viabilidade Celular. 4. Misturas Poliméricas. 5.
Carboximetilcelulose. I. Oliveira, Paulo Jansen de,
1965-, orient. II. Rumjanek, Norma Gouvêa, -,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Engenharia Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JÉSSICA FEITOZA DA ROCHA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/01/2018

Dr. Paulo Jansen de Oliveira – DEQ/UFRRJ
(Orientador)

Dr. Marcelo Ferreira Leão de Oliveira – INT

Dr. Hélio Fernandes Machado Junior – DEQ/UFRRJ

*Dedico esta dissertação
aos meus pais Jorge e
Luciana, e à minha irmã
Larissa, que sempre
acreditaram e torceram
por mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelo seu infinito amor e por nunca ter me desamparado em todos os momentos durante a pós-graduação;

Aos meus pais Jorge e Luciana e à minha irmã Larissa, por sempre apoiarem as minhas escolhas e terem sido a minha rocha nos momentos de fraqueza;

Ao meu namorado Alan Pereira, por me fortalecer todos os dias e auxiliar em tudo que fosse possível. Muito obrigada por tudo!

Ao Professor D.Sc. Paulo Jansen de Oliveira, por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientanda e trabalhar em seu projeto onde adquiri grande conhecimento profissional e pessoal;

À pesquisadora D.Sc. Norma Gouvêa Rumjanek, pela co-orientação, disponibilidade para tirar todas as dúvidas, paciência, carinho e contribuição para a realização do presente trabalho.

Às irmãs e parceiras do Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia: Jaqueline Carvalho, Nainicelle Chantre e Natália Ferreira, por todo companheirismo, ajuda e amizade que levarei para a vida! E também aos demais companheiros de laboratório: Osmário, Rulfe, Marcelo, Dani, Thamires e Victória, que sempre me proporcionaram um excelente ambiente de trabalho!

Às meninas do Laboratório de Tecnologia de Polímeros da UFRRJ: Érica Barbosa, Jéssica Balthazar, Paula Aurora e Fabíola Machado, por toda força, companheirismo nos momentos difíceis, todas as risadas e amizade construída.

À Beatriz Rosas (um amor de pessoa) por toda ajuda, carinho e paciência nas análises de reologia.

A todo o corpo técnico da Embrapa Agrobiologia, que me ajudou na realização deste trabalho, em especial ao Claudinho por toda ajuda, suporte e carinho sem igual.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por todo conhecimento que foi compartilhado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“Amo ao Senhor, porque ele ouviu a minha voz e a minha súplica. Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”

Salmos 116:1 e 12

RESUMO

ROCHA, Jéssica Feitoza da. **Estudo da mistura carboximetilcelulose/Lithothamnium como veículo para inoculantes rizobianos**. 2018. 50p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Inoculantes podem ser definidos como sendo formulações compostas por uma ou mais estirpes bacterianas que promovem o crescimento das plantas. O veículo de inoculação mais utilizado é o turfoso, entretanto, a turfa é um recurso natural não renovável, sendo necessário investir em novas formulações de veículos de inoculação. Formulações contendo misturas poliméricas vem ganhando destaque, pois é possível reunir propriedades específicas de cada componente em um único material. Dessa forma, o estudo do efeito da alga *Lithothamnium calcareum* em conjunto com polímeros naturais como veículos de inoculação se mostrou relevante. O *Lithothamnium* é uma alga marinha, onde sua principal característica é a deposição de carbonato de cálcio em sua parede celular, além de possuir mais de 20 microelementos em sua composição. Assim, esta dissertação teve como objetivo investigar a ação da alga *Lithothamnium calcareum*, na preparação da mistura a base de Carboximetilcelulose/Lithothamnium (CMC/Litho) e seu potencial uso na agricultura como veículo de inoculação bacteriano. Foram preparadas diferentes composições da mistura CMC/Lithothamnium, com e sem a adição de fósforo, e avaliadas quanto à capacidade de manutenção de células viáveis. Essas amostras foram submetidas também ao estudo do comportamento reológico e à caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho. Resultados obtidos nos ensaios reológicos mostraram que na região de baixas frequências a presença de *Lithothamnium* confere um caráter viscoso a mistura. Entretanto, observou-se uma predominância da componente elástica na região de maiores frequências, tendendo ao valor apresentado pela CMC pura. Através dos resultados obtidos por Espectroscopia na Região do Infravermelho foi possível constatar a presença de carbonato de cálcio presente na alga. Os resultados de viabilidade celular indicaram que o ponto ótimo de teor de *Lithothamnium* a ser utilizado foi o de 50ppm, revelando valores de sobrevivência próximos ao veículo de inoculação turfoso, em torno de 10^7 ucf/mL. Verificou-se que a mistura CMC/Litho mantém a viabilidade celular de células rizobianas e a alga proporciona maior estabilidade dimensional à mistura. Desse modo, a mistura CMC/Litho possui potencial como veículo de inoculação.

Palavras-chave: inoculantes, *Lithothamnium*, carboximetilcelulose, viabilidade celular.

ABSTRACT

ROCHA, Jessica Feitoza da. **Study of carboxymethylcellulose/Lithothamnium blends as a vehicle for rhizobium inoculants.** 2018. 50p. Dissertation (Master in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Inoculants can be defined as formulations composed of one or more bacterial strains that promote the plant growth. The inoculation vehicle most used is peat, however, peat is a non-renewable natural resource and it is necessary to invest in new formulations of inoculation vehicles. Formulations containing polymer blends have been gaining notoriety because it is possible to assemble specific properties of each component in a single material. Thus, the study of the effect of *Lithothamnium calcareum* algae with natural polymers as inoculation vehicles proved to be relevant. Lithothamnium is a seaweed, where its main characteristic is the deposition of calcium carbonate in its cell wall and has more than 20 microelements in its composition. The aim of this dissertation was investigating the action of the *Lithothamnium calcareum* algae in the preparation of Carboxymethylcellulose/Lithothamnium (CMC/Litho) blends and its potential use in agriculture as a bacterial inoculating vehicle. Different compositions of CMC/Lithothamnium blend containing phosphorus or not were prepared and evaluated for the ability to maintain viable cells. These samples were also submitted to the study of the rheological behavior and the characterization by Spectroscopy in the Infrared Region. Results obtained in the rheological tests showed that in the region of low frequencies Lithothamnium confers a viscous character to the blend. However, a predominance of the elastic component was observed in the region of higher frequencies, tending to the value presented by the pure CMC. Through the results obtained by Spectroscopy in the Infrared Region it was possible to verify the presence of calcium carbonate present in the algae. The cell viability results indicated that the great point of Lithothamnium content to be used was 50ppm, revealing survival values close to the peat, around 10^7 ucf/mL. It was verified that The CMC / Litho blend maintain the cell viability of rhizobial cells and the algae provides greater dimensional stability to the blend. Thus, the CMC/Litho blend has potential as an inoculating vehicle.

Key words: inoculants, Lithothamnium, carboxymethylcellulose, cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação da viabilidade de células da estirpe BR3267 em misturas CMC/EPS contendo 0%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 4% e 8,0% de EPS extraídos de meio de cultura com volumes de 250 mL, a temperatura ambiente.....	9
Figura 2 - Alga marinha <i>Lithothamnium calcareum</i> (matéria-prima natural e em pó).	10
Figura 3 - Xilogalactanas sulfatadas.....	11
Figura 4 - Polímero do ácido algínico.	11
Figura 5 - Microscopia eletrônica de <i>Lithothamnium</i> sp. apresentando estrutura do tipo “favos de mel”.....	13
Figura 6 - Estrutura química da Carboximetilcelulose (β -(1,4)-D-glucopiranoose).	16
Figura 7 - Variação do módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência, da composição CMC/amido (60/40). (A) não compatibilizado, (B) compatibilizado com 1% MgO e (C) compatibilizado com 1% de ZnO.....	17
Figura 8 - Variação do módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência, da composição CMC/amido (50/50). (A) não compatibilizado, (B) compatibilizado com 1% MgO e (C) compatibilizado com 1% de ZnO.....	18
Figura 9 - Diagrama de blocos das atividades realizadas.....	22
Figura 10 - Viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske.....	24
Figura 11 - Obtenção de colônias para inoculação.....	26
Figura 12 - Obtenção da suspensão bacteriana para inoculação.....	27
Figura 13 - Processo de inoculação.....	28
Figura 14 - Procedimento para realização de diluição seriada.....	29
Figura 15 - Modelo de placa dividida em seis setores.....	29
Figura 16 - Espectro de FTIR da CMC pura.....	30
Figura 17 - Espectro de FTIR da alga <i>Lithothamnium</i> pura.....	31
Figura 18 - Espectro de FTIR do comparativo das composições poliméricas contendo a alga <i>Lithothamnium</i>	32
Figura 19 - Espectro de FTIR do comparativo entre o <i>Lithothamnium</i> puro e o <i>Lithothamnium</i> enriquecido com fósforo.....	32
Figura 20 - Variação da viscosidade cinemática em função da porcentagem de <i>Lithothamnium</i> em massa.....	33
Figura 21 - Comportamento de G' e G'' em função da frequência para a CMC pura.....	34
Figura 22 - Gráfico das curvas do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência da mistura CMC/Litho contendo: (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 2%, (d) 4%, (e) 8% e (f) 16% em massa de <i>Lithothamnium</i>	36

Figura 23 - Variação do módulo elástico (G') em função da frequência, variando a composição da mistura CMC/Lithothamnium.	37
Figura 24 - Gráfico do comparativo da fluência e recuperação em função do tempo para a CMC pura e para as misturas CMC/Litho contendo: 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8% e 16% em massa de Lithothamnium.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais materiais testados na literatura como veículos de inoculação alternativos a turfa.....	5
Tabela 2 - Sobrevivência de células de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> após 12 semanas de incubação, inoculadas em misturas poliméricas a base de CMC e amido.	7
Tabela 3 - Sobrevivência de <i>Bradyrhizobium</i> sp. BR3262 nas misturas poliméricas CMC/amido e EPS/amido em comparativo com a turfa.	8
Tabela 4 - Composição de nutrientes de dois produtos comerciais de farinha de algas calcárias (<i>Lithothamnium</i> sp.).....	12
Tabela 5 - Teor de óxidos do <i>Lithothamnium</i> obtidos em espectrometria por fluorescência de raio-x.....	13
Tabela 6 - Composição das misturas poliméricas produzidas utilizando a concentração mássica de 64g/L.	23
Tabela 7 - Composição do meio YMA Sólido.	27
Tabela 8 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> em veículo CMC/ <i>Lithothamnium</i> após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.....	39
Tabela 9 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> em veículo CMC/ <i>Lithothamnium</i> contendo teores de 5 e 50 ppm de fósforo após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.....	40
Tabela 10 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> em veículo CMC/ <i>Lithothamnium</i> 2% e 4% contendo teores de 5, 50 e 500 ppm de fósforo após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.....	41
Tabela 11 - Avaliação do pH das composições CMC/ <i>Lithothamnium</i> inoculadas com células da estirpe BR3262 de <i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>	42

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CMC	Carboximetilcelulose
Litho	Lithothamnium
PPC	Perda por calcinação
ufc	unidades formadoras de colônia
YMA	<i>Yeast Manitol Agar</i>
YM	<i>Yeast Manitol</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Veículo de Inoculação e Inoculantes	3
2.1.1 Breve histórico.....	3
2.1.2 Legislação e comercialização	3
2.1.3 Veículos de inoculação.....	4
2.2 A alga <i>Lithothamnium</i>	9
2.3 Carboximetilcelulose (CMC)	15
2.4 Aspectos reológicos de misturas poliméricas.....	16
3 OBJETIVO	19
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 Reagentes.....	21
5.2 Equipamentos	21
5.3 Materiais de consumo	22
5.4 Diagrama de blocos das atividades.....	22
5.5 Preparação das misturas CMC/ <i>Lithothamnium</i>	23
5.6 Preparação das misturas CMC/ <i>Lithothamnium</i> diluídas.....	23
5.7 Preparação das misturas CMC/ <i>Lithothamnium</i> contendo fósforo	23
5.8. Ensaio de viscosimetria	24
5.9 Ensaio reológicos	25
5.10 Análise por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	25
5.11 Análise de manutenção rizobiana	25
5.11.1 Preparação de inóculo bacteriano e inoculação.....	26
5.11.2 Avaliação de sobrevivência da estirpe BR3262 no veículo de inoculação CMC/Litho e CMC/Litho/Fósforo	28
5.12 Diluição seriada	28
5.13 Avaliação do pH das misturas CMC/ <i>Lithothamnium</i>	29
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	30
6.2 Ensaio de viscosidade das misturas diluídas	33
6.3 Análise reológica das misturas CMC/ <i>Lithothamnium</i>	34
6.3.1 Ensaio de varredura de frequência.....	34
6.3.2 Teste de fluência e recuperação (<i>creep/recovery</i>)	37
6.4 Sobrevivência da estirpe BR3262 nos veículos de inoculação CMC/Litho	38
6.4.1 Efeito do teor de <i>Lithothamnium</i> na sobrevivência da estirpe BR3262.....	38
6.4.2 Efeito do teor de Fósforo na sobrevivência da estirpe BR3262	39
6.5 Valores de pH das misturas CMC/Litho e CMC/Litho/Fósforo.....	41

7 CONCLUSÃO	43
8 SUGESTÕES	44
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial vem gerando uma maior demanda por produtos de origem vegetal, aumentando a produção agrícola. No entanto, suprir esta demanda é um desafio, devido a alguns fatores como alterações climáticas e pragas em culturas, podendo gerar perdas de rendimento significativas na produção. Para contornar esses problemas adversos e aumentar a produtividade agrícola, é comum a aplicação de fertilizantes sintéticos nas culturas. Porém, esses produtos trazem riscos para a saúde dos trabalhadores agrícolas e para o consumidor, além de causar graves danos ao meio ambiente. Devido a esses fatores, há a necessidade da utilização de produtos que sejam sustentáveis, como por exemplo o uso de microrganismos.

A associação de plantas com microrganismos benéficos tem sido um grande objeto de estudo. Um exemplo de sua eficácia é a crescente produção e utilização de inoculantes. Inoculantes são formulações compostas por uma ou mais estirpes bacterianas que proporcionam o crescimento vegetal, promovendo o crescimento das plantas. No Brasil, os inoculantes são formulações à base de estirpes selecionadas que são posteriormente aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Por muitos anos o tipo de inoculante mais utilizado foi o turfoso, pois esta formulação é rica em matéria orgânica, sendo uma importante fonte de nutrientes que favorecem o crescimento de células bacterianas, quando inoculadas na semente. Entretanto, a turfa é um recurso natural não renovável, podendo se tornar escasso futuramente. Devido a esse fato, a necessidade de investir em novas formulações de inoculantes é crescente atualmente.

Pesquisas científicas têm sido realizadas, a fim de investigar a eficiência de diferentes materiais como veículo de inoculação. Diversas substâncias têm sido analisadas como suporte para a inoculação como: carvão vegetal, argila, fosfato de rocha, gomas naturais, entre outras. Entretanto, dos materiais já testados, poucos apresentaram resultados favoráveis para uma futura aplicação tecnológica. Este fato se deu devido a impossibilidade de um único material apresentar todas as propriedades químicas e físicas encontradas na turfa.

Nos últimos anos, formulações contendo misturas de polímeros naturais ou sintéticos, vem apresentando maior destaque, devido as suas propriedades físico-mecânicas, térmicas e reológicas, fornecendo características desejáveis para a inoculação.

As aplicações tecnológicas dos polímeros são vastas, abrangendo diversas áreas de estudo, como a farmacêutica, agrônômica, medicina, entre outras. A literatura evidencia que, na agricultura, a utilização de polímeros tem auxiliado na produtividade, tornando-a mais eficaz. Os polímeros de origem natural possuem ampla aplicabilidade devido sua biocompatibilidade, além de não causar danos tanto ao meio ambiente como ao homem e serem de fácil obtenção, tornando sua utilização como veículo de inoculação promissora.

A elaboração de novos materiais a partir de misturas poliméricas é um método importante para de reunir as propriedades específicas de cada componente em um único material, com despesas reduzidas. O grupo de pesquisa da Embrapa Agrobiologia/UFRRJ vem investigando a estabilidade dimensional de diferentes misturas poliméricas, além de sua eficiência como veículos de inoculação alternativos à turfa.

Nesse contexto o estudo do efeito da alga *Lithothamnium* em conjunto com polímeros naturais como suporte para inoculação, pois a literatura mostra que esta alga é rica em nutrientes se mostrou promissor.

O *Lithothamnium calcareum* é uma espécie de alga vermelha não articulada pertencente à família Corallinacea. Uma característica dessa família é a deposição de carbonato de cálcio em sua parede celular. Estas algas são compostas principalmente por

carbonato de cálcio e de magnésio, contendo também mais de 20 microelementos, dos quais destacam-se: ferro, cobre, zinco, manganês, boro, níquel, molibdênio, selênio e estrôncio.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a estabilidade e as propriedades das misturas poliméricas contendo Carboximetilcelulose/Lithothamnium (CMC/LITHO) e seu potencial como veículo de inoculação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Veículo de Inoculação e Inoculantes

2.1.1 Breve histórico

Há mais de um século, os estudos voltados para utilização de inoculantes com a finalidade de favorecer o crescimento das plantas têm recebido destaque especial dos centros de pesquisa e indústrias em todo o mundo. Seu início data de 1895 quando Nobbe e Hiltner implantaram uma cultura de rizóbio denominada “Nitragin” em crescimento laboratorial, dando início a indústria de inoculantes para leguminosas. A produção dessa bactéria para uso em escala se deu em 1896 e a sua comercialização em 1898 (SILVA, 2009).

No final do século XIX, os primeiros inoculantes comerciais eram produzidos em ágar, na forma líquida, solo esterilizado ou em culturas secas em algodão. Entretanto, no final da década de 1920 houve progresso na utilização de inoculantes, com a utilização da turfa como veículo de inoculação (BRANDÃO JUNIOR; HUNGRIA, 2000).

No Brasil, a indústria de inoculantes começou na década de 1950, no Rio Grande do Sul, na Secretaria de Agricultura do estado, onde foi realizada pela primeira vez a seleção de estirpes de *Rhizobium* para aplicação em leguminosas de clima temperado, onde eram utilizadas culturas líquidas e sobre ágar. Entretanto, o veículo turfoso (turfa) foi utilizado pela primeira vez no ano de 1954, sendo o único inoculante disponível e importado dos Estados Unidos em pequenas quantidades. Em 1956 foi fundada a primeira indústria privada de inoculantes no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, com apoio do grupo FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa e Agropecuária (FREIRE; VERNETTI, 1997). Na década de 60 iniciou-se a seleção de estirpes para a soja, devido ao crescimento da cultura no estado do Rio Grande do Sul. Na década seguinte, a produção de soja avançava para a região central do Brasil onde foram criadas novas fábricas. Entretanto, as estirpes que eram utilizadas no Sul do Brasil não foram eficazes no Cerrado, sendo necessários novos processos de seleção de estirpes microbianas (ARAUJO, 2013).

Com o impulso dos investimentos agrícolas no Brasil, em 1980 já haviam seis indústrias que produziam cerca de 6 milhões de doses de inoculante (FREIRE; VERNETTI, 1997). Até esse ano, os inoculantes ainda eram produzidos sem uma regulamentação ou fiscalização, o que muitas vezes contribuía para a perda de qualidade e eficácia dos produtos (ARAUJO, 2013). Para contornar esse problema, um marco importante na regulamentação desse setor se deu no ano de 1985 com a criação da RELARE – Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. A partir desse momento os inoculantes passaram a ser registrados somente quando produzidos com estirpes recomendadas por instituições públicas de pesquisa, como estabelecido anteriormente pelo Artigo 23 do Decreto nº. 75583, de 9 de abril de 1975 (Estatuto Social da RELARE, 2012).

Nos últimos anos a indústria nacional de inoculantes não tem medido esforços para melhorar a qualidade dos produtos comercializados. Através das rigorosas fiscalizações realizadas pelo MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a qualidade dos inoculantes obteve uma melhora significativa a partir de 1996 e falhas na inoculação, decorrentes do número insuficiente de células de rizóbio exigidas no inoculante, tornaram-se incomuns (SCHUH, 2005).

2.1.2 Legislação e comercialização

Na literatura podemos encontrar várias definições para os inoculantes, Bashan (1998), por exemplo, define inoculantes como formulações compostas por uma ou mais estirpes bacterianas benéficas que proporcionam o crescimento vegetal, podendo incluir a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas, biocontrole de patologias transmitidas pelo solo, promoção de crescimento através da produção de fitormônios, aumento da absorção de nutrientes e minerais, entre outros benefícios. Além disso, os inoculantes devem ser econômicos e de fácil aplicação, podendo ser orgânico, inorgânico ou sintético (SILVA, 2009).

No Brasil, os inoculantes são formulações à base de estirpes selecionadas que são posteriormente aprovadas pelo MAPA. Existem estirpes selecionadas e aprovadas para a produção de inoculantes para aproximadamente 100 espécies de leguminosas, incluindo o feijão-caupi (SOUSA, 2011).

A Embrapa Agrobiologia está entre os responsáveis pela manutenção e controle das estirpes usadas nos inoculantes, produzindo principalmente inoculantes para leguminosas, que são posteriormente comercializados em todo o país. Anualmente, representantes dessa área de pesquisa realizam a RELARE visando o controle e estabelecimento de normas para a produção de inoculantes no país (BITTENCOURT; SANTOS, 2010).

O Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (DOU 10/08/2004, Anexo 1) determina que os inoculantes que serão comercializados necessitam de uma viabilidade celular mínima, de 10^9 células por mililitro ou grama do produto final. Esta viabilidade celular deve se manter estável até o final do seu prazo de validade determinado pelo fabricante. O inoculante deve proporcionar à semente uma quantidade de células rizobianas em torno de 6×10^5 células/semente, sendo permitida a presença de células não rizobianas desde que não seja observada a presença dessas células a partir da diluição 10^{-5} em contagem em placa. Na produção de soja, esta concentração de células equivale à quantidade de inoculante adicionado à 50kg de semente, proporcionando, no mínimo, 600 mil células bacterianas viáveis por semente (SCHUH, 2005; FERNANDES JUNIOR, 2006).

A validade para os inoculantes à base de turfa contendo células de rizóbio é de 180 dias após a inoculação na turfa, como recomendado pelo MAPA, no qual o decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004 aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura (SILVA, 2009).

A elaboração dos inoculantes deve ser com suporte estéril, estes devem ser livres de microrganismos não especificados, possuindo um prazo de validade mínimo de seis meses a contar da data de fabricação (BITTENCOURT; SANTOS, 2010).

2.1.3 Veículos de inoculação

As formas de veículos de inoculação disponíveis atualmente no mercado brasileiro são bem variadas, podendo ser encontrados inoculantes líquidos, turfosos, pó molhável e gel (BITTENCOURT; SANTOS, 2010; CORREIA, 2015). Os quais:

- a) Líquido – composto de um substrato aquoso estéril onde as bactérias são veiculadas;
- b) Pó molhável – composto de um substrato sólido contendo bactérias liofilizadas que devem ser hidratadas antes de sua aplicação nas sementes;
- c) Turfoso – se apresenta na forma sólida, sendo proveniente de solos aluviais orgânicos e ácidos que são corrigidos, elevando o pH para próximo da neutralidade (6,5 – 7,0);
- d) Gel – composto de um substrato na forma gel, estéril, onde as bactérias são veiculadas.

O veículo de inoculação mais utilizado tem sido o turfoso, pois esta formulação apresenta uma capacidade maior de retenção de água, além de proteger e promover o

crescimento do rizóbio, quando inoculado na semente (SOUSA, 2011). A turfa é rica em matéria orgânica, sendo uma importante fonte de nutrientes para as bactérias (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A Argentina e o Canadá são os países com as melhores fontes de turfa, a turfa proveniente desses territórios possui conteúdo de matéria orgânica variando entre 40-50%. (HUNGRIA et al 2005). Porém para outras fontes de turfa é possível realizar a adição de húmus para melhorar a sua qualidade (SILVA, 2009).

Embora a turfa apresente elevado desempenho como veículo de inoculação, é importante destacar que a turfa é um recurso natural não renovável. A produção de turfas requer longo período geológico de formação, o que aponta para sua escassez no futuro (SILVA, 2009). Devido a essa limitação, a utilização da turfa já está proibida na Europa, gerando assim demandas por novos materiais e formulações de inoculantes (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Na tabela 1 estão apresentados os principais materiais já testados na literatura como veículos de inoculação alternativos a turfa.

Tabela 1 – Principais materiais testados na literatura como veículos de inoculação alternativos a turfa.

Referência	Veículo de inoculação	Estirpe
Dommergues, Diem e Divies (1979)	Poliacrilamida	<i>Rhizobium japonicum</i>
Jung et al (1982)	Alginato e a goma xantana	<i>Rhizobium japonicum</i>
Sparrow e Ham (1983)	Poliacrilamida, espiga de milho, casca de amendoim, carvão e vermiculita	<i>Rhizobium phaseoli</i>
Jawson et al (1989)	Hidroxietilcelulose	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Figueiredo et al (1992)	Vinhaça seca, pó de coco, diatomita, vermiculita e composto urbano	<i>Bradyrhizobium</i> sp
Daza et al (2000)	Perlita	<i>Bradyrhizobium</i> sp. e <i>Rhizobium</i> spp.
Ferreira et al (2003)	Glicerol e caldo bacteriano	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Burkholderia brasiliensis</i>
Santos (2010)	Exopolissacarídeo e xantana	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>

No ano de 1979, Dommergues, Diem e Divies, realizaram testes pioneiros na utilização de polímeros como veículos de inoculação alternativos a turfa. Foi utilizada a poliácridamida como veículo de inoculação para a estirpe rizobiana *Rhizobium japonicum*. A análise da sobrevivência dessa estirpe foi avaliada em duas temperaturas: 4°C e 30°C, para

avaliar a melhor temperatura para armazenamento durante um período de 75 dias. Os resultados mostraram que a sobrevivência de *Rhizobium japonicum* inoculado em poliacrilamida foi de 83%, sendo comparável ao inoculante turfoso preparado em laboratório que proporcionou a sobrevivência de 62% das estirpes rizobianas, a 4 °C durante 75 dias. Jung et al (1982), realizaram um estudo onde além da poliacrilamida, foram estudados outros dois polímeros: o alginato e a goma xantana, como veículos de inoculação para três estirpes de rizóbio. Os autores observaram que a sobrevivência foi igual para os inoculantes a base de goma xantana e turfa, aos 100 dias de incubação.

Sparrow e Ham (1983) avaliaram diferentes materiais: turfa, poliacrilamida, espiga de milho moída, casca de amendoim moída, carvão e vermiculita, como veículos de inoculação para três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (3644, CIAT 75 e 650R), em três temperaturas: 4, 25 e 45°C, por um período de 30 semanas de incubação. O estudo apontou que a casca de amendoim e a espiga de milho não possuem potencial como veículo de inoculação de *R. phaseoli*, devido a contaminação por fungos, especialmente quando armazenados a 25°C. O gel de poliacrilamida apresentou melhores resultados de sobrevivência a 25°C, apresentando número de células viáveis próximas a 10^8 células/g. A turfa, o carvão e a vermiculita apresentaram número de células viáveis iguais ou superiores a 10^8 células/g a 4 °C e 10^7 células/g a 25 °C, para a estirpe 3644.

Jawson e colaboradores (1989) investigaram a utilização de hidroxietilcelulose como veículo de *Bradyrhizobium japonicum* para inoculação de soja (*Glycinemax* (L.) Merr.). Os autores observaram que as populações das estirpes de rizóbio, em géis de celulose, apresentaram sobrevivência entre 10^7 e 10^8 células/semente, durante pelo menos 70 dias, ocorrendo maior crescimento a 25 °C.

Figueiredo et al (1992) avaliaram o desempenho de composto urbano, vinhaça seca, pó de coco, diatomita e vermiculita como veículo de inoculação para a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. por um período de 240 dias. Com exceção do pó-de-coco, os materiais testados podem ser considerados de boa qualidade para uso como inoculante, pois mantiveram a viabilidade celular próxima a 10^8 células/g. Além disso, a estirpe rizobiana apresentou melhor sobrevivência em diatomita, atingindo uma população de $3,6 \times 10^9$ células/g de inoculante aos seis meses de incubação, sendo comparada com a turfa.

Daza et al (2000) avaliaram inoculantes a base de perlita e turfa na sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* spp. A sobrevivência das estirpes foi semelhante para a turfa e para a perlita quando sacarose foi usada como agente adesivo, fornecendo mais do que 10^4 células/semente após 3 semanas de inoculação.

Ferreira et al (2003) avaliaram o desempenho dos veículos turfoso, glicerol e caldo bacteriano, com o objetivo de selecionar o melhor veículo para a inoculação de cultura de arroz inundado, utilizando-se estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasilensis*. Os resultados mostraram que não houve diferença no número de células viáveis quando utilizado inoculante turfoso e o glicerol, nos testes de sobrevivência realizados por 110 dias, ficando em torno de 10^8 células/g ou mL. No que se refere ao caldo bacteriano, este manteve a viabilidade em torno de 10^8 células/g das células bacterianas apenas durante 30 dias de armazenamento, após esse período houve uma queda na viabilidade celular.

Santos (2010), verificou a sobrevivência da estirpe *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) em biopolímeros (exopolissacarídeo e xantana) como veículos de inoculação microbianos alternativos à turfa para inoculação de feijão-caupi. Os resultados dos testes de inoculação mostraram que os veículos testados, incubados em diferentes tempos mantiveram a maior densidade populacional na faixa de $1,12 \times 10^7$ a $0,25 \times 10^6$ bactérias viáveis e a menor densidade populacional na faixa de $0,39 \times 10^7$ a $0,09 \times 10^6$ bactérias viáveis, sendo comparáveis ao veículo de inoculação turfoso.

A busca por novas formulações e veículos de inoculação alternativos a turfa tem sido uma demanda atual. Nesse contexto, a utilização de formulações a base de misturas poliméricas tem se mostrado bastante promissora, uma vez que permite reunir as propriedades físico-mecânicas e de biocompatibilidade necessárias para um veículo a custos reduzidos (SOARES; OLIVEIRA, 2003, ROHR, 2007).

Nos últimos anos, a Embrapa Agrobiologia e o Laboratório de Tecnologia de Polímeros da UFRRJ vêm desenvolvendo pesquisas voltadas para busca de materiais alternativos e formulações para veículos de inoculação em substituição a turfa. A seguir serão apresentados os trabalhos de relevância obtidos nessas pesquisas.

Fernandes Junior (2006) avaliou a sobrevivência da estirpe *Bradyrhizobium yuanmingense* (BR3267) em inoculantes poliméricos a base de carboximetilcelulose e amido. Os resultados mostraram que as composições contendo MgO (50/50 1% MgO e 60/40 1% MgO) apresentaram resultados de sobrevivência superiores aos obtidos pela turfa (Tabela 2).

Tabela 2 – Sobrevivência de células de *Bradyrhizobium japonicum* após 12 semanas de incubação, inoculadas em misturas poliméricas a base de CMC e amido.

Composição polimérica (CMC/Amido)	Log n° células/mL
50/50 não compatibilizado	8,64
50/50 1% ZnO	7,23
50/50 1% MgO	9,23
60/40 não compatibilizado	8,21
60/40 1% ZnO	5,85
60/40 1% MgO	9,41
Turfa	8,96

Fonte: Adaptado de FERNANDES JUNIOR (2006)

Silva (2009) realizou um estudo sobre a sobrevivência de bactérias diazotróficas em misturas poliméricas compostas por CMC/amido na inoculação de cana-de-açúcar. Resultados de testes de sobrevivência mostraram que estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentou concentração de células em torno de 10⁹ células/mL, por 120 dias de incubação, mostrando que este veículo possui uma compatibilidade com células de bactérias diazotróficas. Além disso, em experimentos em casa de vegetação as plântulas de cana-de-açúcar, quando inoculadas com os polímeros, apresentaram aumentos médios de até 181% na produção de fitomassa seca e aumento médio de 122% no nitrogênio total, quando comparado ao controle não inoculado.

Estudos envolvendo a preparação de veículos de inoculação a base de exopolissacarídeos (EPS), produzidos por diferentes estirpes de rizóbio, mostram que estas misturas possuem boa biocompatibilidade com *Bradyrhizobium* sp. (BR3267), manifestando sobrevivência semelhante à observada na utilização de inoculante turfoso (SANTOS, 2010; COUTINHO, 2013).

Coutinho (2013), realizou estudos sobre o efeito do uso da carboximetilcelulose (CMC) de média e de alta viscosidade em composição CMC/Amido, com e sem 1% de ZnO,

na inoculação de *Bradyrhizobium sp.* (BR 3262). Os resultados mostraram que ambos CMC apresentaram desempenho semelhante; entretanto o decaimento da viabilidade celular ao longo das semanas de incubação é mais lento na composição que contém CMC de alta viscosidade. Misturas não compatibilizadas, contendo CMC de alta viscosidade apresentaram número de células viáveis superiores ao da CMC de média viscosidade. No mesmo estudo, misturas produzidas com exopolissacarídeos (EPS) apresentaram resultados de sobrevivência compatíveis ao observado pelo inoculante turfoso (Tabela 3).

Tabela 3 – Sobrevivência de *Bradyrhizobium sp.* BR 3262 nas misturas poliméricas CMC/amido e EPS/amido em comparativo com a turfa.

Composição polimérica	Semanas de Incubação (Log n° células/mL)						
	1 SI	2 SI	4 SI	6 SI	8 SI	10 SI	12 SI
CMC/amido (50/50) ^S	9,35	9,19	8,33	8,40	7,81	8,25	8,64
CMC/amido (50/50) ^{S'}	9,97	8,31	7,72	5,24	8,48	5,21	7,23
CMC/amido (50/50) ^C	9,99	9,89	8,75	8,40	8,51	8,57	8,65
CMC/amido (50/50) ^{C'}	9,98	9,90	8,92	9,01	8,91	8,90	8,88
EPS/Amido ^d	9,46	9,35	8,89	8,76	8,67	8,72	8,70
EPS/Amido ^e	9,74	9,36	8,95	8,85	8,78	8,81	8,79
EPS/Amido ^f	9,79	9,38	8,91	8,90	8,79	8,80	8,75
Turfa	9,93	10,1	9,46	9,99	8,93	8,43	8,96

^S CMC de média viscosidade, ^{S'} CMC de média viscosidade sem 1% ZnO, ^C CMC de alta viscosidade, ^{C'} CMC de alta viscosidade sem 1% ZnO, ^d EPS-BR3262, ^e EPS-BR322, ^f EPS-BR29.

Fonte: Adaptado de COUTINHO, 2013.

Freitas et al (2014), investigaram o desempenho de composições Espirulina/CMC contendo 2,5%, 10% e 40% em massa de Espirulina, como suporte para inoculação da estirpe *Bradyrhizobium pachyrhizi* (BR3262), por um período de 30 dias. Os resultados obtidos mostraram um aumento do número de células viáveis a partir do 14° dia de incubação, passando de 10⁸ para 10¹¹ no 28° dia. Os autores concluíram que a Espirulina favorece a sobrevivência da estirpe rizobiana utilizada, podendo promover o crescimento devido aos nutrientes fornecidos. Testes de estabilidade dimensional das composições mostraram que a obtenção de misturas homogêneas após autoclavagem das mesmas é possível. Isto contribui para

uma maior sobrevivência de células rizobianas no preparo do inoculante (FREITAS et al, 2014^a e 2014^b).

Sousa (2017) avaliou a sobrevivência de *Bradyrhizobium yuanmingense* (BR3267) em veículos de inoculação poliméricos compostos por CMC/Exopolissacarídeo. Os resultados do estudo da viabilidade celular mostraram que a mistura CMC/EPS foi capaz de manter a viabilidade celular na faixa de 10^8 a 10^9 UFC ml⁻¹, durante um período de até 120 dias de incubação, à temperatura de 25°C (Figura 1).

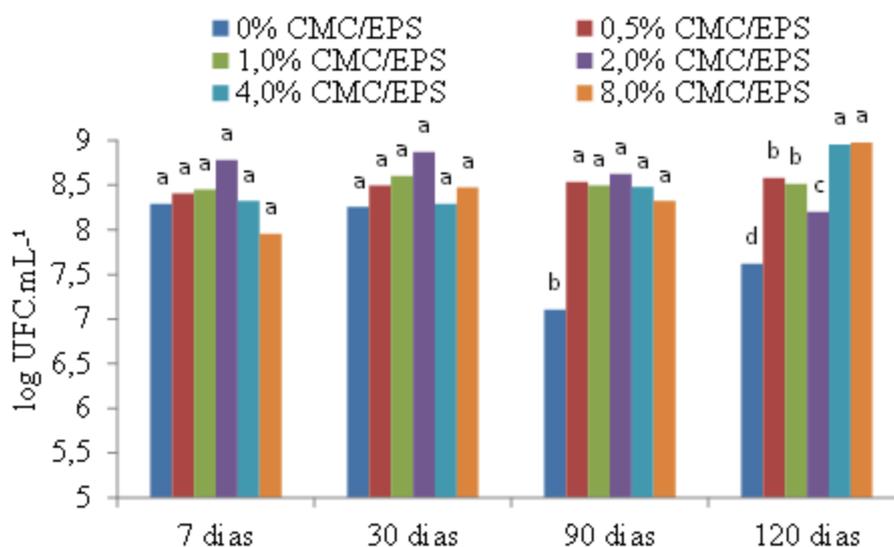


Figura 1 – Avaliação da viabilidade de células da estirpe BR3267 em misturas CMC/EPS contendo 0%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 4% e 8,0% de EPS extraídos de meio de cultura com volumes de 250 mL, a temperatura ambiente. UFC ml⁻¹: Unidades Formadoras de Colônias. *** As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a um nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Sousa, 2017.

A partir da cooperação científica com o grupo de pesquisa de Engenharia Agrícola e Ambiental da UFRRJ, foi identificado o potencial do uso de uma alga denominada *Lithothamnium calcareum* para aplicações em remoção de cátions e ânions de material lixiviado para tratamento de resíduos. Suas características morfológicas, estabilidade térmica, capacidade de retenção de cátions e ânions e boa interação com materiais poliméricos, despertou nossa atenção para o potencial desse material (*Lithothamnium calcareum*) também como veículo de inoculação. Sendo assim, a seguir será realizada uma abordagem mais detalhada sobre a alga *Lithothamnium calcareum*.

2.2 A Alga *Lithothamnium*

O *Lithothamnium calcareum* é uma espécie de alga vermelha não articulada pertencente à família Corallinacea, à ordem das Corallinales e ao filo das Rhodophytas (GRAHAM; WILCOX, 2000). Uma característica da família Corallinacea é a deposição de carbonato de cálcio em sua parede celular. A nomenclatura *Lithothamnium* possui origem grega, onde *litho* significa pedra e *thamnion*, árvore pequena (LOPES, 2012).

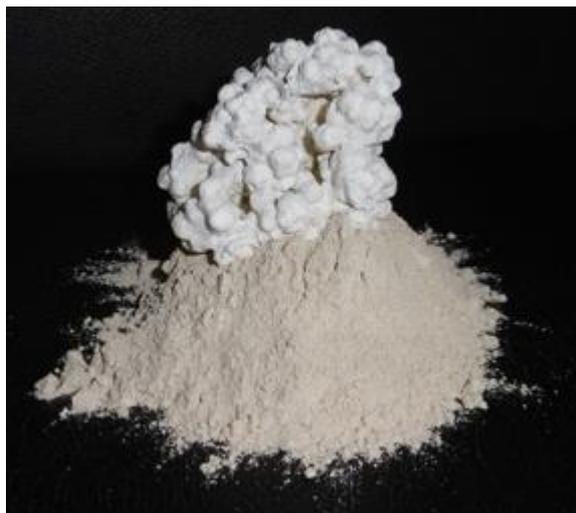


Figura 2 – Alga marinha *Lithothamnium calcareum* (matéria-prima natural e em pó).

Fonte: Sítio Instituições Gangloff

As algas vermelhas apresentam-se nas formas ramificadas, maciças ou condensadas (CAVALCANTI, 2011). A família Corallinaceae possui duas classificações: a forma articulada que representa a subfamília Corallinoideae e a forma nodular e crustosa, que constitui a Melobesioideae. A subfamília Melobesioideae possui talo simples de coloração rosa ou vermelha, sendo amplamente distribuída, vivendo sobre outras algas ou sobre rochedos, podendo ocorrer a formação de crostas densas e fragmentos podem se desprender. Esses fragmentos podem crescer envolvendo pedras, fragmentos de rochas, entre outras formas livres. A forma livre que se desenvolve não aderida a um substrato é conhecida como rodolito (LOPES, 2012).

As algas calcárias são muito estudadas com relação aos seus constituintes inorgânicos e aspectos geológicos, porém são pouco estudadas quanto aos seus constituintes orgânicos. A composição química orgânica da espécie é praticamente desconhecida, no entanto, diversas classes de produtos naturais, como polissacarídeos sulfatados, já foram isoladas de algas da ordem Corallinales (SOARES, 2009).

As algas vermelhas possuem parede celular constituída principalmente por galactanas sulfatadas, ou seja, a cadeia principal dos polissacarídeos apresenta a galactose como monossacarídeo majoritário. No filo das Rhodophytas a ocorrência de polissacarídeos do tipo homogalactanas, polímeros formados majoritariamente por galactose, e heterogalactanas, constituídas por diferentes monossacarídeos (xilose, glicose, manose e arabinose), é elevada (SOARES, 2009; ROCHA, 2013).

Algas da ordem Corallinales possuem polissacarídeos usualmente constituídos por polímeros de xilogalactanas sulfatadas (Figura 3) (SOARES, 2009).

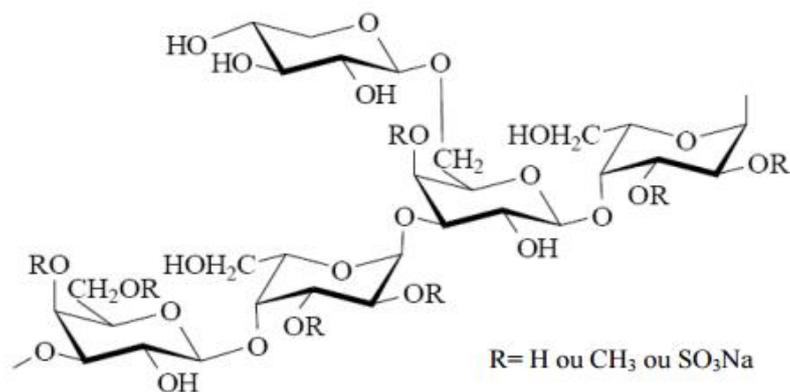


Figura 3 – Xilolactanas sulfatadas.

Fonte: SOARES, 2009

Na família Corallinaceae já foi relatada a presença de polímeros do ácido algínico (Figura 4), constituídos por ligações entre os ácidos gulurônico e manurônico em variadas proporções molares (SOARES, 2009)

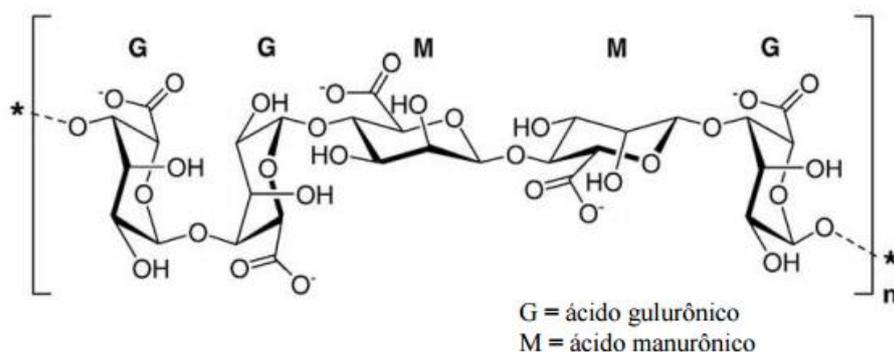


Figura 4 – Polímero do ácido algínico.

Fonte: SOARES, 2009

As algas do gênero *Lithothamnium* são compostas principalmente por carbonato de cálcio e de magnésio, contendo também mais de 20 microelementos, dos quais destacam-se: ferro, cobre, zinco, manganês, boro, níquel, molibdênio, selênio e estrôncio. Estas algas possuem aspecto calcário, pois absorvem o carbonato de cálcio e de magnésio na forma de cristais de calcita, o que representa aproximadamente 80% a 90% de sua biomassa (SÁ, 2014). A farinha de algas calcárias comercializada pode possuir uma pequena variação em sua composição em minerais (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição de nutrientes de dois produtos comerciais de farinha de algas calcárias (*Lithothamnium sp.*).

	Superal ¹	AcidBuf® ²
	%	
Matéria seca	97	95
Cinzas	99	95
Cálcio	32	30
Magnésio	2	5,5
Potássio	0,02	0,7
	mg/kg	
Fósforo	110	500
Boro	20	10
Ferro	710	800
Cobalto	0,8	0,1
Zinco	11	10
Manganês	46	50
Molibdênio	5	0,2
Selênio	1	1,8
Iodo	12	30

¹Superal. Algarea Mineração Ltda., Rio de Janeiro, RJ. ²Acid Buf®. Celtic SeaMinerals, Carrigaline, Irlanda. Fonte: LOPES, 2012.

Em análise semi-quantitativa dos elementos que compõem a alga *Lithothamnium*, através de espectrometria por fluorescência de raio-x, Caletti (2017) constatou que dentre os teores de óxidos obtidos, 46,5% refere-se ao óxido de cálcio e 3,5% refere-se ao óxido de magnésio (Tabela 5). O *Lithothamnium* é composto majoritariamente por carbonado de cálcio, que sob altas temperaturas se decompõe em CaO e CO₂.

Tabela 5 – Teor de óxidos do Lithothamnium obtidos em espectrometria por fluorescência de raio-x.

Óxidos	Teor
P ₂ O ₅	<0,1
K ₂ O	<0,1
TiO ₂	<0,1
SrO	0,39
Fe ₂ O ₃	0,48
ClO	0,52
Al ₂ O ₃	0,56
SO ₃	0,58
Na ₂ O	0,72
SiO ₂	1,6
MgO	3,5
CaO	46,5
PPC	44,9

Fonte: CALETTI, 2017.

A calcificação das algas pode ser vista como uma adaptação que permite a sobrevivência em águas alcalinas e a obtenção de carbono inorgânico suficiente para a fotossíntese. A deposição de cálcio entre as paredes celulares, na forma de cristal hexagonal romboédrico, resulta na estrutura microscópica do tipo “favos de mel”, possuindo alta capacidade de absorção (Figura 5) (LOPES, 2012).

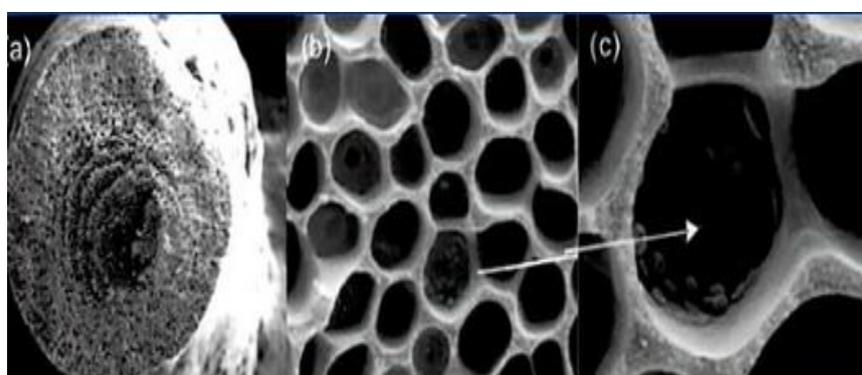


Figura 5 – Microscopia eletrônica de *Lithothamnium sp.* apresentando estrutura do tipo “favos de mel”.

Fonte: Sitio Litho Life

A atuação do Lithothamnium é atribuída tanto pela sua maior biodisponibilidade de micronutrientes que são adsorvidos pelas paredes celulares, sendo assimiláveis pelos animais e plantas com maior facilidade, como também pela sua elevada porosidade, o que proporciona uma superfície de atuação maior (SOUZA, 2012).

Na agricultura as algas são utilizadas para a correção do pH de solos ácidos devido a essa elevada concentração de carbonatos. Além disso, o cálcio e o magnésio otimizam o balanço físico-químico do solo, tornando-o mais fértil (DIAS, 2000).

O maior produtor de granulados para uso industrial é a França. As algas coralinas de principal extração são as espécies *Lithothamnium calcareum* e *Lithothamnium coraloides* (DIAS, 2000). No Brasil, a ocorrência de depósitos de algas vermelhas calcárias na plataforma continental se deu na década de 60, nas regiões Norte e Nordeste. Posteriormente foram confirmadas ocorrências na região Sudeste (SOUZA, 2012). Atualmente, o *Lithothamnium sp.* pode ser encontrado na plataforma continental brasileira partindo do rio Pará estendendo-se ao Rio grande do Sul (CAVALCANTI, 2011). As algas são predominantes nas regiões norte, nordeste e leste, mais precisamente na região do rio Pará até os arredores de Cabo Frio (SÁ, 2014).

Estima-se que na plataforma continental brasileira os depósitos formados por algas calcárias chegam a 2×10^{11} toneladas de sedimentos, onde mais de 75% correspondem a CaCO_3 . Além disso, a composição e as concentrações dos elementos presentes nos granulados marinhos podem sofrer variação de acordo com o local e a profundidade em que são coletados. Em um estudo realizado pela Universidade Federal do Ceará, a granulometria do material coletado ao longo da costa brasileira, na profundidade de 20 a 80 m, variou de acordo com a proximidade da costa e aumentando com a distância, onde o teor de carbonatos do material coletado sofreu variação de 77% a 96% (LOPES, 2012).

A extração pode ocorrer de forma manual, por meio de mergulhadores ou redes de pesca, podendo também de forma mecânica, por meio de sucção da alga em pó acumulada em “ilhas de areia biodentrítica”, utilizando navio aspirador. O material coletado é utilizado em seu estado natural, após passar pelos processos de lavagem, desidratação e moagem (CARLOS et al, 2011).

Na literatura é possível encontrar diversos estudos envolvendo a aplicação da alga *Lithothamnium*. As principais aplicações são na agricultura e pecuária. Além disso, podemos destacar o uso no tratamento de água, agricultura, indústria cosmética, nutrição humana e medicina.

Na agricultura, o *Lithothamnium* contribui para a recuperação e melhoramento do solo nos aspectos: físico, químico e biológico. A alga atua na correção da acidez dos solos, aumenta a eficiência de adubos fosfatados, favorece a retenção de cátions, auxilia no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, proporciona nutrientes para as culturas e aumenta a tolerância a condições hídricas desfavoráveis (SÁ, 2014).

Melo e Furtini Neto (2003) realizaram a avaliação do *Lithothamnium* como corretivo da acidez do solo e fonte de nutrientes para o feijoeiro. Nesse estudo, foi possível obter resultados satisfatórios na correção da acidez do solo como também no crescimento e produção do feijoeiro. Araújo (2005) também realizou estudos de nutrição e correção do pH do solo, constatando que fertilizantes a base de *Lithothamnium* apresentam-se como uma alternativa de incremento nutricional para a adubação de mudas de citrumeleiro Swingle, quando o substrato possui baixo pH e pouca disponibilidade de cálcio e magnésio.

Para Cruz et al. (2008) a utilização do *Lithothamnium* no desenvolvimento de porta enxerto de tangerina Cleópatra aumentou a disponibilidade dos nutrientes no substrato, antecipando o tempo de formação das mudas. Sá (2014) observou os efeitos do *Lithothamnium* cultivo de pimentão e obteve resultados significativos no uso da alga como condicionador do solo e fertilizador deste tipo de cultura.

Na pecuária o *Lithothamnium* é amplamente utilizado como fonte de cálcio, principalmente. Na alimentação do gado, o cálcio, magnésio e fósforo constituem $\frac{3}{4}$ dos minerais necessários às vacas leiteiras. A utilização da alga no alimento otimiza o rendimento econômico da produção de leite (DIAS, 2000).

Na criação de aves, os alimentos de origem vegetal, como milho e soja, constituem a base da alimentação. Estes alimentos possuem teores de cálcio em níveis insuficientes, assim a utilização do *Lithothamnium* como fonte alternativa de minerais realiza a suplementação de cálcio necessária na dieta dos animais (MELO; MOURA, 2009).

Carlos et al. (2011) realizou o estudo do uso de *Lithothamnium* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte, em substituição à fonte de tradicional de cálcio (calcário calcítico), alcançando resultados satisfatórios. A utilização da alga não prejudicou o desempenho zootécnico, principalmente quando utilizada na fase de crescimento e/ou no período de total criação das aves. Para Melo (2006) a utilização de farinha de algas marinhas em rações para codornas japonesas em postura criadas sob condições de calor mostrou sinais de melhora no desempenho e na qualidade do ovo.

Na nutrição humana cápsulas contendo *Lithothamnium* são utilizadas como suplemento alimentar no Brasil e em outros países, sendo recomendadas como fontes de cálcio para a prevenção de osteoporose. Os produtos derivados da alga são indicados para inúmeras finalidades como energéticos e redutores de peso. Porém essas indicações não apresentam fundamentação científica, indicando carência de dados sobre a atividade biológica do *Lithothamnium* em humanos (SOARES, 2009).

No tratamento de água de água o *Lithothamnium* é utilizado na neutralização de água com excesso de ácido carbônico. A alga neutraliza a água sem provocar incrustações e elimina o excesso de ácido causador de corrosão nas tubulações, além de incorporar o Ca e o Mg. A alta porosidade aumenta as trocas entre a água e seus elementos. O *Lithothamnium* também provoca a precipitação de matéria orgânica em putrefação, reestabelecendo as condições aeróbias favoráveis à atividade biológica (DIAS, 2000).

Na medicina o *Lithothamnium* é muito utilizado em cirurgias ósseas (DIAS, 2000). Em experimentos com cães, Teixeira (2008) avaliou a influência da farinha de algas marinhas como suplemento mineral na cicatrização de falha óssea de cortical reconstituída com auto enxerto. Através de avaliações clínicas, radiográficas e histopatológicas da evolução da cicatrização óssea, a autora concluiu que a suplementação a base de *Lithothamnium calcareum* aparentemente contribuiu para uma melhor cicatrização, dado que o grau de radiopacidade e o número de osteoclastos foram maiores nos animais tratados.

De acordo com os estudos bibliográfico realizados, foram encontrados poucos trabalhos que abordassem o estudo de misturas poliméricas envolvendo a alga marinha *Lithothamnium*.

Em seu estudo no desenvolvimento de porta-enxerto de tangerina Cleópatra, Cruz et al. (2008) utilizou polímero hidroabsorvente juntamente com a alga *Lithothamnium*. O trabalho avaliou o efeito do polímero hidroabsorvente e do *Lithothamnium* sobre o desenvolvimento das plantas até a repicagem. A incorporação do polímero hidroabsorvente ao substrato favoreceu o desenvolvimento dos porta-enxertos na fase inicial de produção, devido a retenção de água no substrato, reduzindo a quantidade de água a ser aplicada. A adição do *Lithothamnium* ao substrato de cultivo aumentou a disponibilidade de nutrientes, proporcionando um melhor desenvolvimento das mudas.

2.3 Carboximetilcelulose (CMC)

Obtida através da reação da celulose com o monocloroacetato de sódio, a carboximetilcelulose (CMC) é um típico hidrocolóide que apresenta propriedades de polieletrólito (KÄISTNER et al, 1997).

A estrutura química da carboximetilcelulose baseia-se no polímero β -(1,4)-D-glucopiranosose da celulose, como apresentado na Figura 6. A CMC pode apresentar diferentes graus de substituição, em virtude de diferentes metodologias de preparação. A

Estrutura da celulose permite que em cada molécula de glucose ocorra a substituição de até três grupos hidroxilas (ROHR, 2007). O grau de substituição médio dos grupamentos hidroxila apresenta valor acima de 0,5 OH/glucose, podendo chegar ao grau de substituição de 0,9 OH/glucose (COUTINHO, 2013). Com a substituição dos hidrogênios das hidroxilas por grupamentos carboximetil é possível obter a carboximetilcelulose sódica, forma na qual é normalmente é comercializada (SCHUH, 2005).

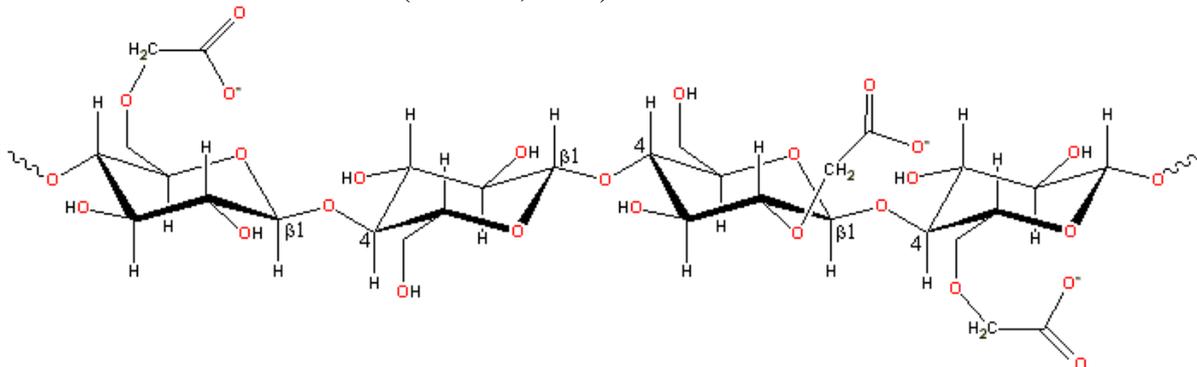


Figura 6 - Estrutura química da Carboximetilcelulose (β -(1,4)-D-glucopiranosose).

Fonte: KÄINSTER et al., 1997.

A presença de grupos carboximetil ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) provoca o afastamento das cadeias poliméricas, permitindo uma maior penetração de água, proporcionando solubilidade da carboximetilcelulose sódica em água a frio (ROHR, 2007).

As moléculas de carboximetilcelulose, quando estão presentes em soluções diluídas, em geral, são encontradas com a estrutura na forma estendida. Este fato ocorre devido à repulsão eletrostática existente na cadeia principal do polímero. Já em soluções concentradas, ocorre o enovelamento das moléculas, formando um gel termo reversível (ROHR, 2007; COUTINHO, 2013).

Devido às suas propriedades, como a solubilidade em água fria e quente, retenção de água, baixa a alta viscosidade em solução, capacidade de formar filme, resistência a óleos e solventes orgânicos, a carboximetilcelulose é amplamente utilizada tanto na formulação de produtos alimentícios, como também no desenvolvimento e processamento de produtos (CANCELA; ÁLVAREZ; MACEIRAS, 2005).

2.4 Aspectos Reológicos de Misturas Poliméricas

No século XVII, a reologia foi definida por Newton e Hooke, porém somente no ano de 1920 que a reologia passou a ter importância industrial. Isso se deu devido a descoberta e criação de materiais como as borrachas sintéticas, cerâmicas, tintas, plásticos e fluidos biológicos. Dessa forma, surgiu a necessidade do estudo mais aprofundado da reologia, sendo de interesse de áreas como a Química, Física e Matemática (TANNER, 1988).

O termo reologia possui origem grega e origina-se da união das palavras *rhein* que significa “escorrer ou deformação” e *logya* que significa “ciência ou estudo”, sendo então, a ciência dos fluidos ou estudo da deformação (CARDOSO, 2014; FREITAS, 2015).

Assim, a reologia é a ciência que estuda a deformação ou escoamento da matéria, quando submetida a forças externas (MACHADO, 2002). Além disso, essa deformação pode ser reversível ou irreversível. A reologia foi sugerida por Bingham e Crawford (1929) para descrever a deformação dos sólidos e o fluxo de líquidos (FREITAS, 2015).

Em teoria, a reologia possui grande importância na compreensão da relação entre a estrutura e as propriedades dos materiais, de forma que a variação das propriedades reológicas

está relacionada diretamente às mudanças na estrutura, quando mantidas as condições de teste (CARDOSO, 2014). As propriedades reológicas das substâncias podem ser dependentes da taxa de cisalhamento e do tempo, podendo ainda variar com a continuidade da deformação (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989).

Na prática, a reologia é direcionada principalmente ao estudo de fluidos cujas propriedades de escoamento são mais complexas do que as de fluidos, que possuem comportamento simples (líquidos ou gases), ou as de um sólido elástico ideal. Entretanto, sabe-se que sob condições restritas de ensaios podem existir materiais de comportamento tipicamente simples que podem apresentar um comportamento diferente e complexo, quando submetidos a outras condições (TATTERSALL; BANFILL, 1983).

No que tange as soluções de polímeros e polímeros fundidos, o comportamento reológico é diferente do observado em fluidos newtonianos, devido a presença de cadeias poliméricas de elevada massa molar e diferentes graus internos de liberdade. Além de possuir um caráter pseudoplástico, os polímeros são também viscoelásticos, possuindo comportamento reológico intermediário ao Hookeano e Newtoniano (VASQUEZ, 2007). Para a caracterização de fluidos não newtonianos, deve-se medir, além da viscosidade, as tensões normais e as respostas viscoelásticas (BIRD; STEWART; LIGHTFOOD, 2004).

Através do estudo reológico de sistemas poliméricos é possível compreender a estrutura molecular de diferentes polímeros e a forma como a conformação estrutural afeta o comportamento reológico, tanto em condições permanentes quanto em condições adversas (ROHR, 2007).

Rohr (2007) realizou um estudo da estabilidade de composições contendo CMC/Amido compatibilizadas ou não com MgO e ZnO. A seguir são apresentados os resultados dos testes reológicos das composições contendo 60/40 (Figura 7) e 50/50 (Figura 8), de CMC/amido. Ele observou em seu estudo que para ambas as composições, quando compatibilizadas com MgO, apresentaram maior estabilidade. Quando o MgO é adicionado às misturas ocorre o cruzamento dos módulos elástico e viscoso em menores frequências, de maneira que o módulo elástico se mantém maior do que o módulo viscoso em maiores frequências. Esse comportamento reológico confere maior estabilidade à mistura e maior resistência à tensão utilizada nos testes.

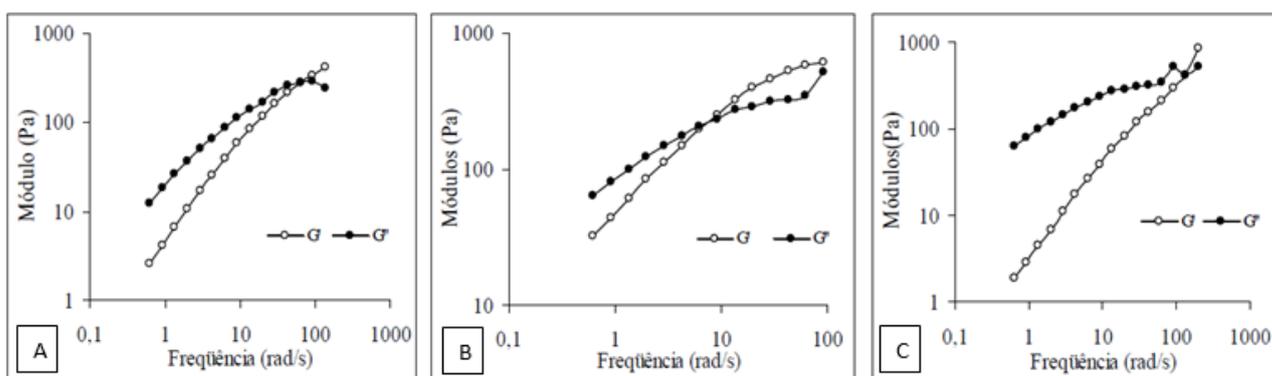


Figura 7 - Variação do módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência, da composição CMC/amido (60/40). (A) não compatibilizado, (B) compatibilizado com 1% MgO e (C) compatibilizado com 1% de ZnO.

Fonte: ROHR, 2007

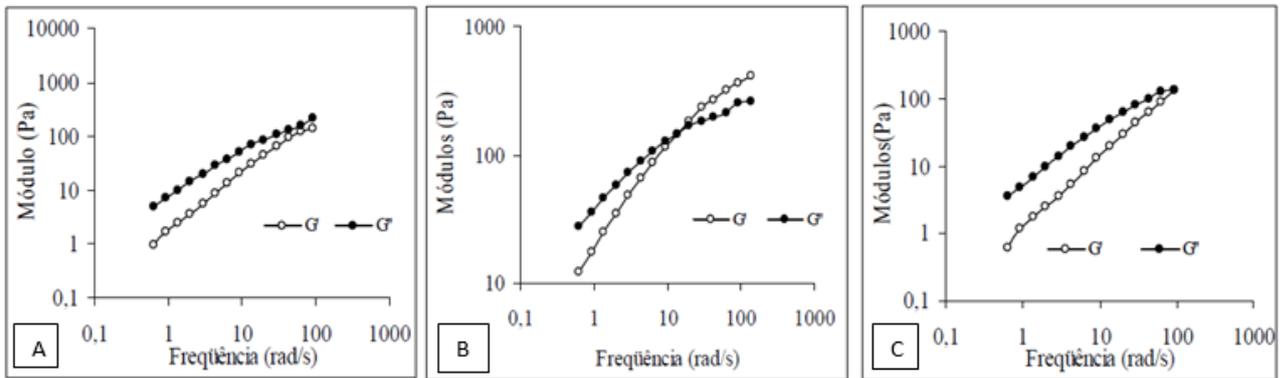


Figura 8 - Variação do módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência, da composição CMC/amido (50/50). (A) não compatibilizado, (B) compatibilizado com 1% MgO e (C) compatibilizado com 1% de ZnO.

Fonte: ROHR, 2007

3 OBJETIVO

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a ação da alga *Lithothamnium calcareum*, na mistura a base de Carboximetilcelulose/Lithothamnium (CMC/Litho) e seu potencial uso na agricultura como veículo de inoculação bacteriano para feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em substituição à turfa. Foram investigados também o potencial de algas *Lithothamnium calcareum* oriundas de processo de lixiviação contendo fósforo em substituição à turfa.

Para melhor entendimento das interações existentes entre os diferentes tipos de estruturas macromoleculares, formadas nas diferentes composições CMC/Litho, adotou-se o estudo do comportamento reológico das misturas, a caracterização dessas matérias através de espectroscopia na região do infravermelho e o estudo da biocompatibilidade dessas misturas com microrganismos rizobianos, a fim de alcançar o objetivo proposto.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Com base na experiência adquirida pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agrobiologia/UFRRJ, no que tange a trabalhos envolvendo a aplicação de misturas CMC/amido e CMC/Espirulina como como veículo de inoculação rizobianos, foi proposto o uso de um novo material a ser testado: a alga *Lithothamnium calcareum*.

A escolha da alga *Lithothamnium calcareum* baseia-se na sua composição química e propriedades físicas identificadas, tais como: biocompatibilidade, biodisponibilidade, elevada porosidade e fonte de macro e micronutrientes como cálcio, magnésio e molibdênio; entretanto, da alga *Lithothamnium calcareum* apresenta baixa resistência mecânica e térmica. Sendo assim, projetou-se a ideia de combinar esse material com um polímero conhecido e de boas propriedades viscoelásticas, boa resistência térmica, boa solubilidade em água e biodegradável, neste caso, a carboximetilcelulose.

Espera-se que a combinação desses dois materiais resulte numa mistura com boas propriedades físico-mecânicas, térmicas, com bom processamento e com boa biocompatibilidade com o microrganismo. Tendo como resultado um novo veículo de inoculação em substituição a turfa na inoculação de feijão-caupi.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

- Carboximetilcelulose (CMC) de média viscosidade (2000-3000 cP) – Quimesp Química LTDA;
- Alga *Lithothamnium calcareum* – Algarea Mineração S/A;
- Alga *Lithothamnium calcareum* enriquecida com fósforo gentilmente cedida pelo Laboratório de Monitoramento Ambiental I, do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro;
- Estirpe bacteriana BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi* fornecida pela Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia;
- Água destilada;
- Capilares tipo Cannon-Fenske-Routine;
- Manitol (crescimento lento);
- K_2HPO_4 ;
- KH_2PO_4 ;
- $MgSO_4$;
- NaCl;
- Extrato de Levedura;
- Vermelho Congo;
- Ágar bacteriológico;
- KOH.

5.2 Equipamentos

- Mixer de alimentos – Philips Walita (300W);
- Shaker rotatório Tecnal, Modelo TE – 420;
- Espectrofotômetro de UV-VIS Shimadzu, Modelo UV – 1201;
- Reômetro de disco oscilatório Haake RheoStress 1
- Unidade de banho Fenix P1 com termômetro
- Viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske – Schott
- Unidade de medida de viscosidade AVS 350 com sensor AVS/SHT
- Banho termostático CT 53 HT/ Termostato CT 52;
- Espectrômetro de infravermelho Bruker, modelo VERTEX 70, com detector DLaTGS;
- Centrífuga – Beckman (Modelo J2-2);
- Balança analítica (4 casas decimais);
- Balança de precisão (3 casas decimais);
- Medidor de pH de bancada – Biovera;
- Capela de fluxo laminar;
- Seladora – Selaplast;
- Pipetas automáticas;
- Cronômetro;
- Autoclave;
- Incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*);
- Vortex;
- Geladeira;

- Freezer;
- Micro-ondas.

5.3 Materiais de Consumo

- Tubos de centrífuga (200 mL);
- Tubos tipo Falcon (50mL);
- Microtubos tipo Eppendorf (1,5 mL);
- Ponteiras para pipeta automática;
- Seringa descartável (3 mL);
- Agulhas para seringa (0,80mm x 25mm);
- Sacos autoclaváveis de polipropileno (12cm x 20cm x 0,10mm);
- Placas de Petri;
- Erlenmeyer;
- Becher.

5.4 Diagrama de Blocos das Atividades

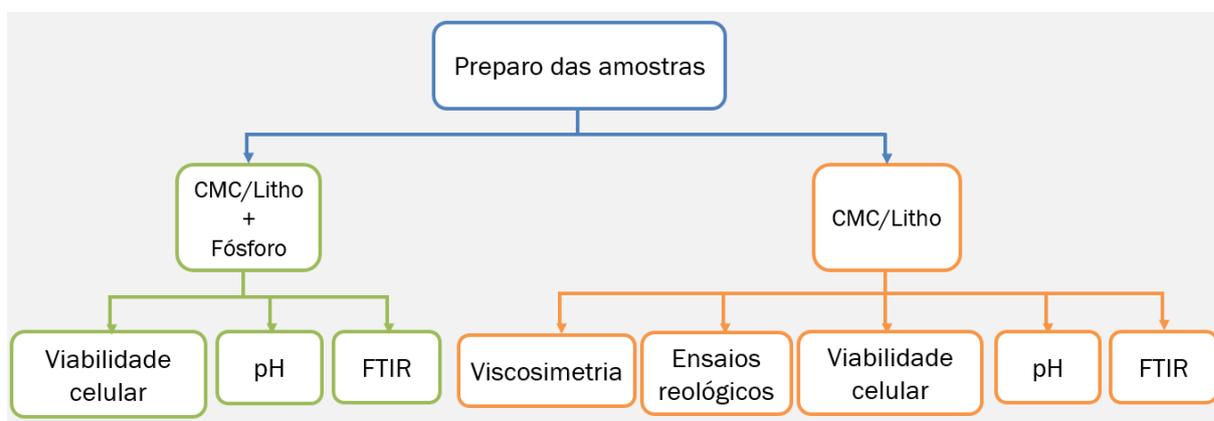


Figura 9 – Diagrama de blocos das atividades realizadas.

5.5. Preparação das Misturas CMC/Lithothamnium

Foram preparadas misturas poliméricas CMC/Lithothamnium contendo 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8% e 16% em massa de Lithothamnium na mistura (Tabela 6). A preparação e escolha da concentração mássica da mistura CMC/Lithothamnium foi baseada no trabalho de ROHR (2007), para preparação de veículo de inoculação com base na mistura CMC/amido. A concentração mássica usada na mistura CMC/Litho foi de 64 gramas de massa seca de mistura polimérica para 1000 mL de água destilada.

Tabela 6 – Composição das misturas CMC/Litho utilizando concentração mássica de 64g/L.

CMC (g)	Lithothamnium (g)	Teor de Lithothamnium na mistura (%)
64,00	0,00	0%
63,68	0,32	0,5%
63,36	0,64	1%
62,72	1,28	2%
61,44	2,56	4%
58,88	5,12	8%
53,76	10,24	16%

Para o preparo das misturas, teremos como exemplo a mistura contendo 0,5% de Lithothamnium na mistura:

Em um bécher de 2000 mL de capacidade, foram adicionados 1000 mL de água destilada e 0,32 g da alga *Lithothamnium calcareum*, passando por uma rápida agitação, com o auxílio de um *mixer*, durante 30 segundos. Em seguida, 63,68 g de carboximetilcelulose foram adicionadas ao bécher e a mistura foi então processada novamente, a 21°C.

Após o preparo, 10 g da mistura CMC/Litho foram transferidos para sacos de polipropileno autoclaváveis, posteriormente identificados e selados. As amostras foram esterilizadas por autoclave a 121 atm e 100°C durante 30 minutos.

5.6 Preparação das Misturas CMC/Lithothamnium diluídas

Foram preparadas misturas diluídas a partir das misturas CMC/Lithothamnium anteriormente preparadas no item 5.5. As misturas diluídas foram preparadas diluindo-se 0,2 g de amostra previamente preparada em 20 ml de água destilada.

5.7 Preparação das Misturas CMC/Lithothamnium contendo fósforo

O preparo das misturas contendo CMC/Litho contendo fósforo seguiu a metodologia utilizada no preparo das misturas no item 5.5.

Foram realizados testes com a alga *Lithothamnium calcareum* previamente utilizada para remoção de fósforo em teste de lixiviamento realizados no Laboratório de Monitoramento Ambiental I, do Instituto de Tecnologia/UFRRJ. Foram recebidas 3 (três) amostras de Lithothamnium contendo os seguintes teores de fósforo: 5 ppm, 50 ppm e 500 ppm.

Foram preparadas misturas contendo 2%, 4%, 8% e 16% em massa de Lithothamnium na mistura, para a alga enriquecida contendo 5 e 50ppm de fósforo. E para a alga contendo 500 ppm de fósforo foram preparadas misturas contendo 2% e 4%, em massa de Lithothamnium na mistura.

5.8 Ensaio de Viscosimetria

A análise de viscosidade da mistura CMC/Litho foi realizada a temperatura constante de 25°C, controlada por um banho térmico, utilizando-se viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske, número 200, tipo 20. Foram investigadas as associações entre o sistema CMC/Litho, assim como, a miscibilidade polímero-polímero através da análise de viscosimetria das misturas diluídas em função da composição.

O viscosímetro capilar Cannon-Fenske é um equipamento de vidro que possui volume constante. A análise consiste em medir o tempo de escoamento do líquido da marca de tempo superior (seção C) até a marca de tempo inferior (seção D), como apresentado na Figura 10.

O capilar foi imerso em banho termostático, de modo que todo o bulbo superior (seção B) estivesse imergido no banho, à uma temperatura constante de 25°C. Para a realização dos ensaios, foram adicionados 13mL de água destilada ao capilar, através do tubo de alimentação (seção G), onde o volume de líquido preencheu metade do reservatório de fluido (seção F). A água destilada foi utilizada como solvente e solução controle. O mesmo procedimento foi realizado posteriormente para as soluções das misturas CMC/Litho.

Para medir o tempo de escoamento, o fluido foi aspirado por uma borracha flexível conectada no topo do terminal para acoplamento da bomba de sucção (seção A), até que o líquido atingisse a seção B. Após esse momento é cessada a aspiração, para que o líquido flua livremente através do capilar (seção E). A contagem do tempo iniciou-se quando o fluido passou pela marca da seção C e a contagem foi finalizada quando o fluido atingiu a marca da seção D. Todo o processo de medida de tempo foi realizado de forma automática através da unidade de medida de viscosidade do equipamento.

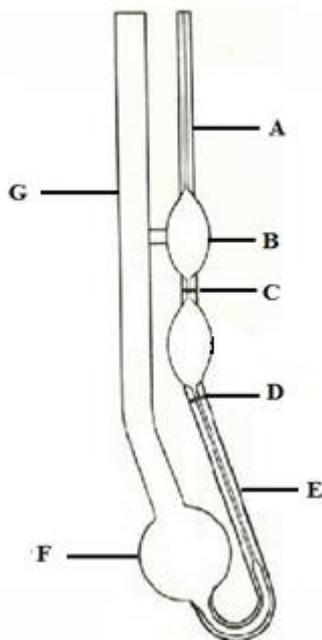


Figura 10 – Viscosímetro capilar do tipo Cannon-Fenske.

Fonte: Adaptado de Labs do Brasil

Posteriormente a viscosidade cinemática foi calculada, utilizando-se os tempos de escoamento aferidos na análise, através da fórmula a seguir:

$$\nu = k(t - v) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

ν = viscosidade cinemática (mm²/s)

k = constante do capilar

t = tempo de escoamento da amostra (s)

v = correção da energia cinética para o valor t

5.9 Ensaios Reológicos

As análises foram realizadas em reômetro de disco oscilatório Haake - sensor placa-placa PP35 Ti, acoplado a uma unidade de banho Fenix P1, a temperatura de 30° C com precisão de 0,1°C.

a) Ensaio de varredura de frequência

Foram realizados ensaios de varredura de frequência na faixa de 0,6 a 150 rad/s, a uma tensão fixa de 10 Pa a temperatura de 30°C com precisão de 0,1°C.

b) Teste de fluência e recuperação (*creep/recovery*)

Foi realizado teste de fluência e recuperação sob as seguintes condições de análise: a fase de deformação foi determinada sob uma tensão de 10 Pa por um período de 100s e após a remoção tensão aplicada, a recuperação foi determinada por período de 180s.

5.10 Análise por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier, foi realizada com varreduras na faixa de 400 – 4000 cm⁻¹, em espectrômetro a vácuo FT-IR VERTEX 70, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Ciências Exatas (ICE), da UFRRJ. Foram adicionados 2 mg de mistura no PLATINUM ATR acoplado a um detector do tipo sulfato de trigliceno dopado com L-alanina deuterada (DLATGS).

5.11 Análise da Manutenção Rizobiana

A parte experimental de análise da manutenção rizobiana nas misturas poliméricas foram realizados em parceria com a Embrapa Agrobiologia. Esta análise foi dividida em duas etapas:

Etapa 1 - Preparação de inóculo bacteriano e inoculação;

Etapa 2 - Avaliação de sobrevivência da estirpe BR3262 no veículo de inoculação CMC/Litho e CMC/Litho/Fósforo.

5.11.1 Preparação de inóculo bacteriano e inoculação

A estirpe BR3262 (*Bradyrhizobium pachyrrhizi*), recomendada para a nodulação de feijão-caupi no nordeste brasileiro (MARTINS et al., 2003), foi cedida pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia, Seropédica / RJ.

A estirpe adquirida foi repicada (uma pequena quantidade de uma cultura antiga foi transferida para um meio novo) em duas placas contendo meio de cultura sólido específico YMA (*Yeast Manitol Agar*) (FRED; WAKSMAN, 1928), com composição apresentado na Tabela 7, permanecendo sob temperatura controlada de 28°C em incubadora tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). O período de crescimento da estirpe foi de aproximadamente cinco dias (Figura 11).

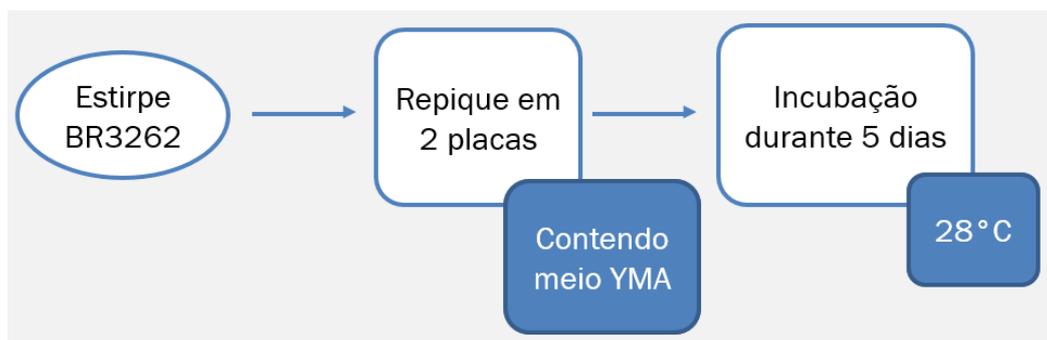


Figura 11 – Obtenção de colônias para inoculação.

Tabela 7 - Composição do meio YMA Sólido.

Reagentes	Quantidade para 1000mL de solução
Manitol (crescimento lento)	10 g
K ₂ HPO ₄ - Solução 10%	1 mL
KH ₂ PO ₄ - Solução 10%	4 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O - Solução 10%	2 mL
NaCl - Solução 10%	1 mL
Extrato de Levedura	0,4 g
Vermelho Congo - Solução 0,25%	10 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Ágar bacteriológico	15 g
KOH q.s.p. - Solução 10%	Ajustar pH 6,8 - 7,0

Fonte: FRED; WAKSMAN, 1928.

O inóculo foi preparado adicionando-se duas alçadas de cultura de BR3262 crescida em um erlenmeyer de 250mL de capacidade, contendo 150mL de meio líquido YM (*Yeast Manitol*). O erlenmeyer permaneceu sob agitação a 150 rpm, por 4 dias, a 28°C. Após esse período, o meio de cultura contendo a estirpe de rizóbio crescida foi centrifugado a uma rotação de 5000 rpm, por 10 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa (*pellet*) foi ressuspensa, com água destilada estéril (Figura 12). Em seguida, foi realizada a técnica de plaqueamento em placas de Petri utilizando meio de cultura sólido YMA com diluição seriada de 10⁻³ a 10⁻⁸. As análises foram realizadas em triplicata pelo método do espalhamento antes da inoculação.

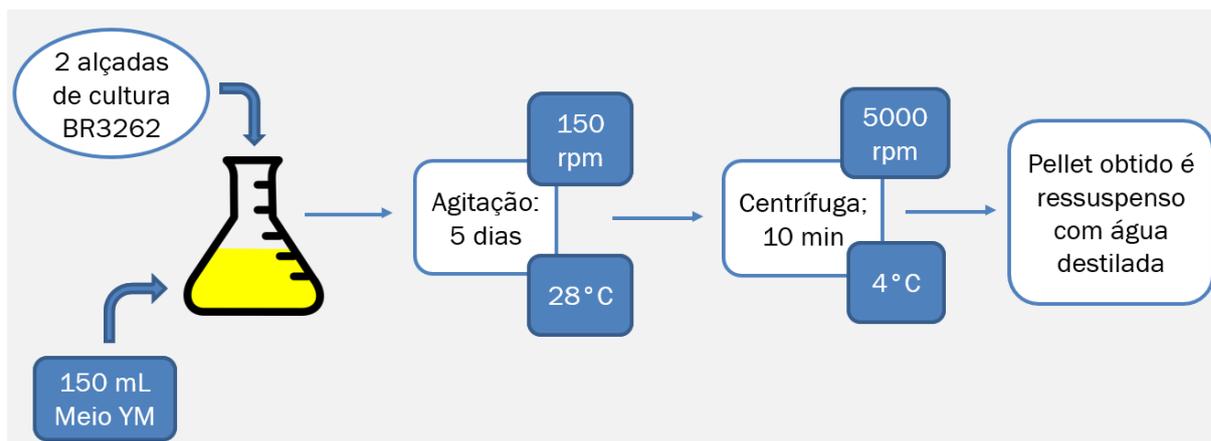


Figura 12 – Obtenção da suspensão bacteriana para inoculação

Os veículos de inoculação poliméricos, previamente preparados contendo 2%, 4%, 8% e 16% de massa de Lithothamnium, com e sem fósforo foram inoculados com suspensão bacteriana contendo a estirpe BR3262 na densidade de 10^9 células g^{-1} . Para isso, 1mL de suspensão bacteriana foi adicionado a 10g de mistura CMC/Litho. A mistura foi agitada manualmente e o inoculante foi então incubado à temperatura de 21 °C, acondicionados em caixas de isopor, durante um período de até 56 dias (Figura 13).

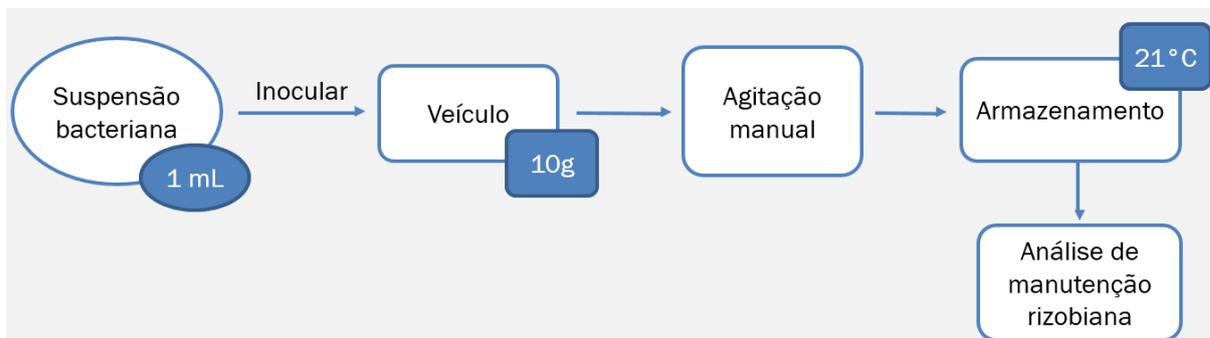


Figura 13 – Processo de inoculação

5.11.2 Avaliação de sobrevivência da estirpe BR3262 no veículo de inoculação CMC/Litho e CMC/Litho/Fósforo

Para verificar a sobrevivência da estirpe rizobiana BR3262 no veículo de inoculação polimérico a base de CMC/Litho com e sem fósforo, durante o período de incubação, foram realizadas contagens após o 7°, 14°, 28° e 56° dias de inoculação, através de diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-8} em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido YMA, utilizando o método de espalhamento.

5.12 Diluição Seriada

A diluição seriada é um método que consiste em pesar cerca de 5g de inoculante em um tubo Falcon, seguido da adição de 25 ml de água destilada estéril e agitação da suspensão em vórtex até atingir uma mistura homogênea. Após esse processo, uma alíquota de 0,1 mL da mistura contida no tubo Falcon é coletada e transferida para um microtubo tipo Eppendorf contendo 0,9 mL de solução salina estéril ($NaCl$ 8,5 $g L^{-1}$), essa é a primeira diluição (10^{-1}). O processo de diluição seriada é então repetido sucessivamente até a diluição 10^{-8} (Figura 14).

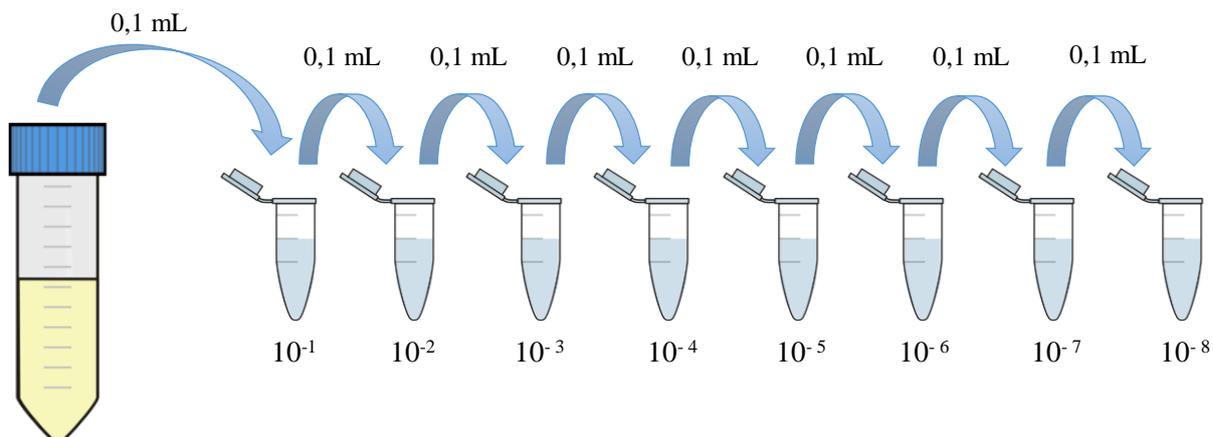


Figura 14 - Procedimento para realização de diluição seriada.

Para o plaqueamento, foram utilizadas as diluições 10^{-3} a 10^{-8} , onde $10 \mu\text{l}$ de cada uma dessas diluições foram aplicados por espalhamento em placas de Petri divididas em seis setores (Figura 15), contendo meio sólido YMA, em duplicata.

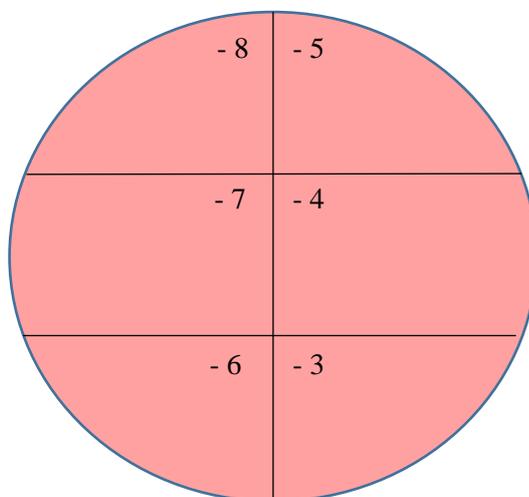


Figura 15 - Modelo de placa dividida em seis setores.

As placas foram posteriormente incubadas a uma temperatura de 28°C em incubadora tipo BOD, durante um período de 5 a 6 dias, para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (ufc) (VINCENT, 1970).

5.13 Avaliação do pH das Misturas CMC/Lithothamnium

O pH dos veículos de inoculação poliméricos inoculados foi determinado na faixa de pH 0 - 14, utilizando-se um medidor de pH de bancada, nos mesmos períodos em que foram realizadas as avaliações de sobrevivência da estirpe BR3262 em meio sólido YMA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 16 apresenta o espectro de FTIR da CMC pura. Observou-se bandas de absorção na região de 3309 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo hidroxila (OH) associado em ligações de hidrogênio, que pode ser atribuída às ligações intramoleculares ou intermoleculares (TONG; XIAO; LIM, 2008). A banda de absorção na região de 1635 cm^{-1} foi associada aos grupos carbonila de íon carboxilato, confirmando a presença de ácido carboxílico (SOARES, 2009; SOUSA, 2017).

As bandas de absorção na região de 1420 e 1324 cm^{-1} são referentes ao estiramento do grupo carbonila (C=O) em íons COO^- (YUEN et al., 2009). A região próxima a 1420 cm^{-1} foi associada ainda à deformação angular do grupamento CH_2 adjacente à carbonila (PAVIA et al, 2015). A banda de absorção presente na região de 1112 cm^{-1} correspondeu ao estiramento de ligações de álcool secundário (PAVIA et al, 2015) e a banda de absorção presente na região de 1060 cm^{-1} , correspondeu ao estiramento e deformação de ligações de álcoois primários (C-OH) (BURGARDT, 2012).

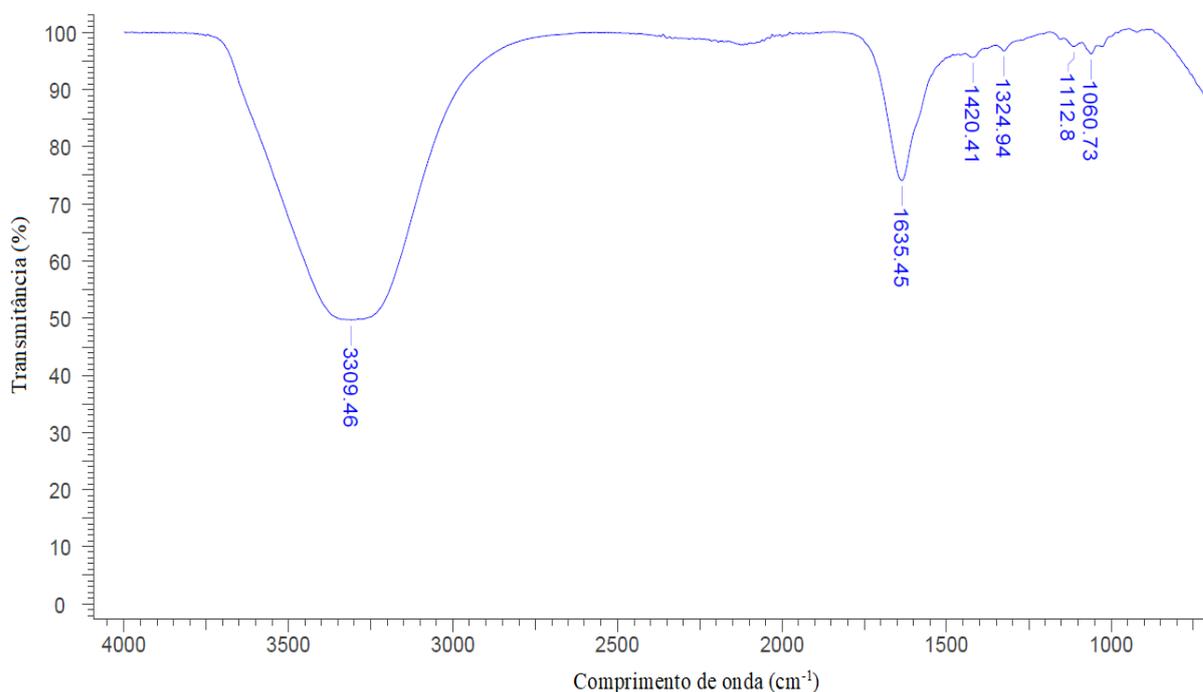


Figura 16 – Espectro de FTIR da CMC pura.

A Figura 17 apresenta as bandas de absorção do Lithothamnium puro. As bandas de absorção próximas a 1400 cm^{-1} e 870 cm^{-1} , são características de grupo carbonato (BAETA, 2007). A banda de absorção em 1404 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico (CO), as bandas menos intensas observadas em 871 cm^{-1} e 712 cm^{-1} referem-se, respectivamente, às deformações angulares fora do plano (CO_3) e no plano (OCO) (SILVA et al, 2010; CALETTI, 2017). Essas bandas de infravermelho obtidas para o Lithothamnium correspondem ao CaCO_3 na forma de calcita (SILVA et al, 2010). A literatura mostra que a alga *Lithothamnium calcareum* é composta majoritariamente por carbonado de cálcio (CaCO_3).

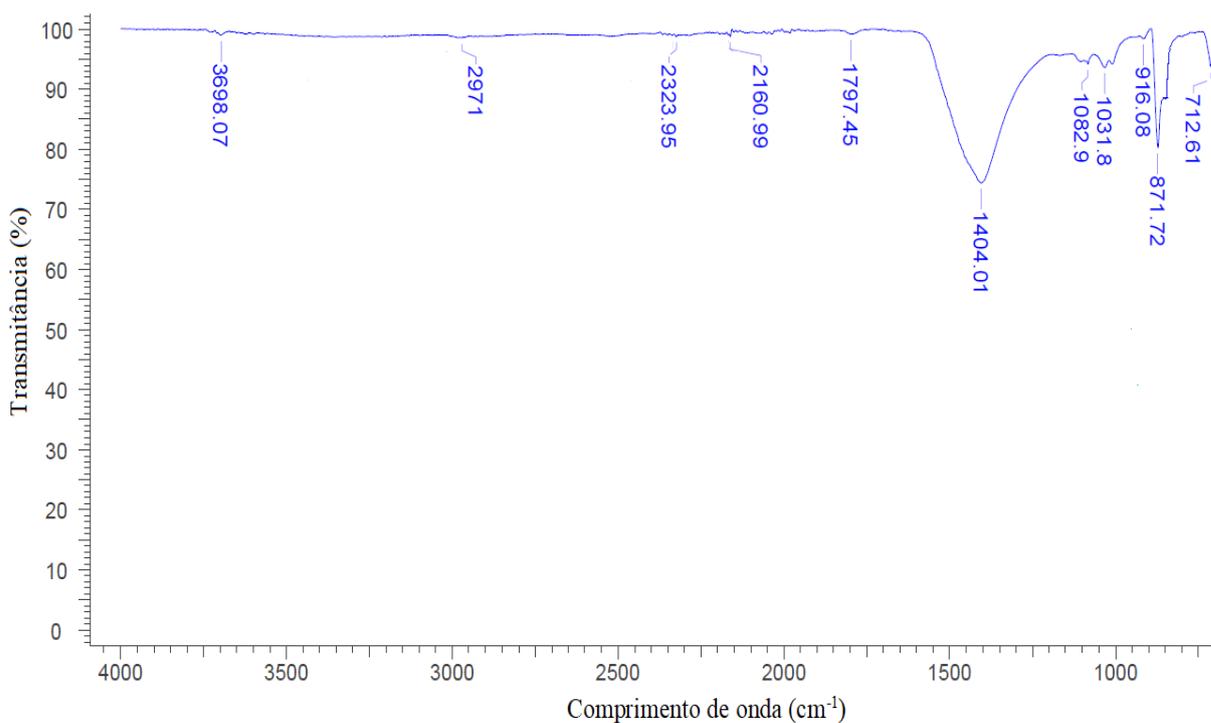


Figura 17 – Espectro de FTIR da alga Lithothamnium pura.

A figura 18 apresenta um comparativo dos espectros de infravermelho obtidos para as composições poliméricas contendo a alga Lithothamnium em teores de 0%, 2%, 4%, 8% e 16%.

De modo geral, os espectros obtidos apresentaram sinais de vibração e rotação que manifestaram frequências e intensidades semelhantes. É possível observar ainda, que em maiores concentrações de Lithothamnium (composição 16%) a banda próxima a 3300 cm^{-1} , de estiramento do grupo hidroxila, apresenta uma pequena redução. Deste modo, é possível supor que em menores concentrações a influência da alga Lithothamnium, na estrutura da molécula da carboximetilcelulose, é baixa. A medida que a concentração de Lithothamnium na mistura aumenta, sua atuação sob as moléculas de CMC é ampliada.

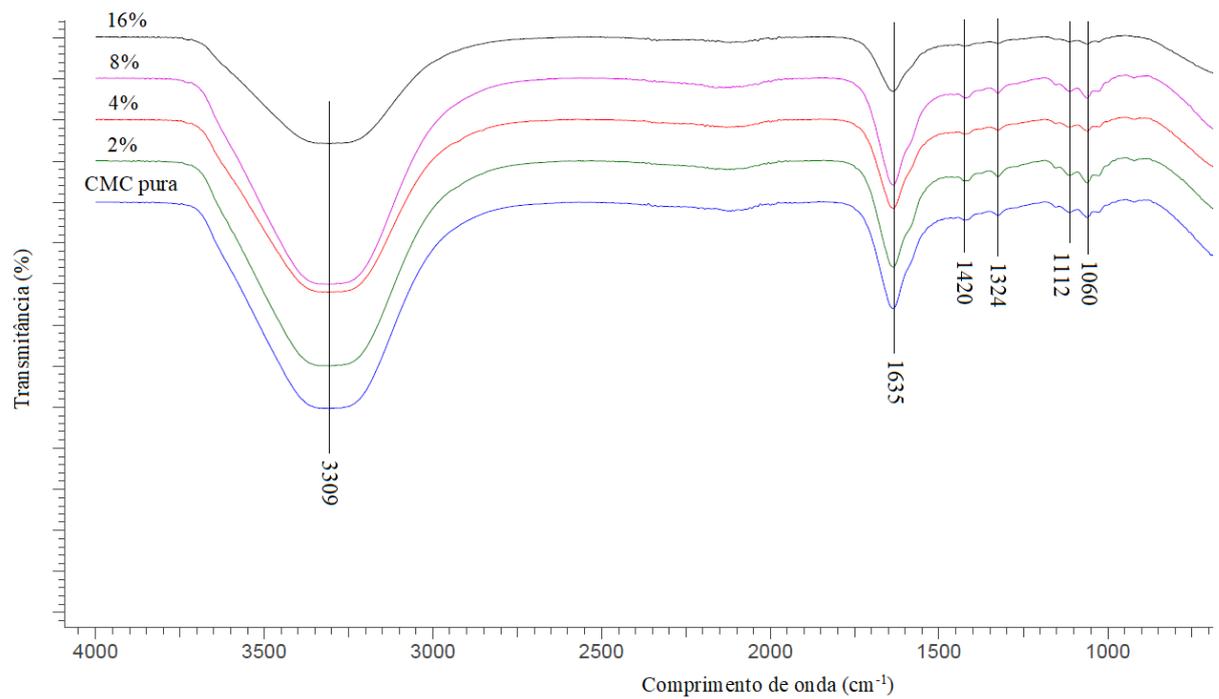


Figura 18 – Espectro de FTIR do comparativo das composições poliméricas contendo a alga Lithothamnium.

O resultado comparativo entre o espectro de infravermelho do Lithothamnium puro e o Lithothamnium contendo 50 ppm de fósforo é apresentado na Figura 19. Notou-se que não ocorreram mudanças significativas nos sinais de vibração e rotação quando o Lithothamnium foi enriquecido com fósforo. A intensidade e frequência dos sinais de vibração obtidos foram semelhantes nas duas amostras analisadas.

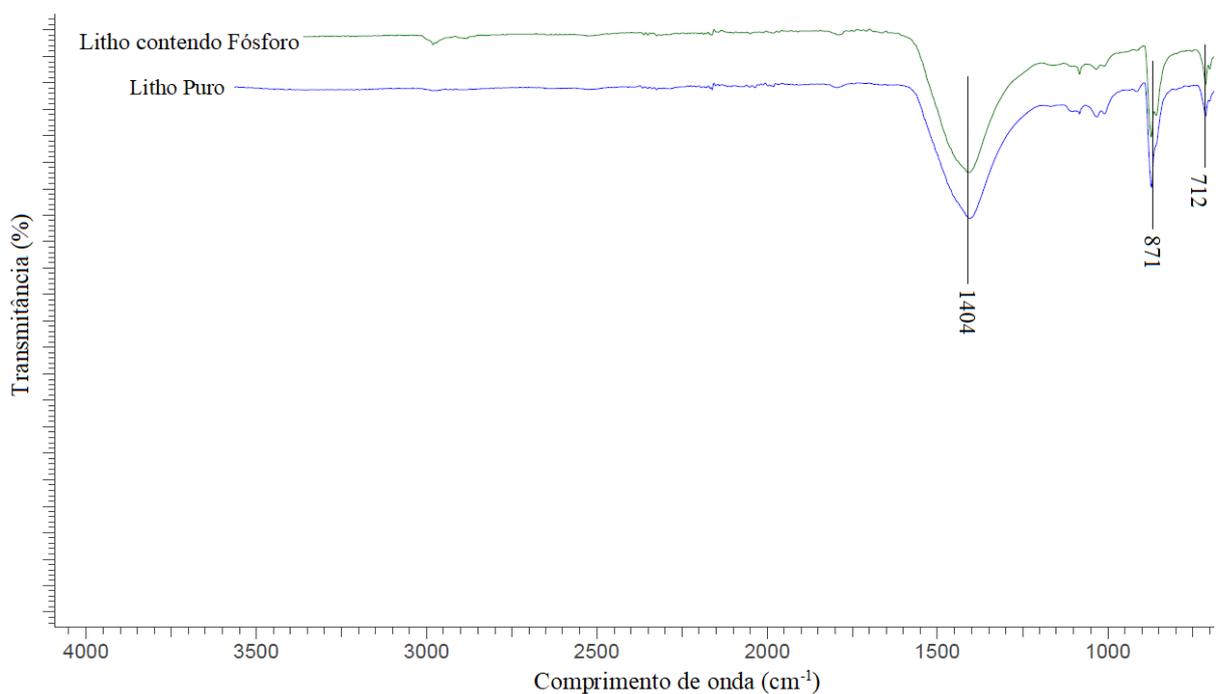


Figura 19 – Espectro de FTIR do comparativo entre o Lithothamnium puro e o Lithothamnium contendo fósforo.

6.2 Ensaio de Viscosidade das Misturas Diluídas

Para avaliar as possíveis interações entre a carboximetilcelulose e o Lithothamnium, foram realizados ensaios de viscosimetria. A Figura 20 mostra o efeito da quantidade de Lithothamnium na viscosidade cinemática de misturas CMC/Lithothamnium (CMC/Litho) diluídas.

Observou-se que a viscosidade cinemática diminuiu acentuadamente quando 0,5% em massa de Lithothamnium estão presentes na CMC, alcançando um valor mínimo na composição contendo 4% de Lithothamnium. A partir desse valor, a viscosidade da mistura permanece praticamente inalterada, dentro da faixa de concentração estudada.

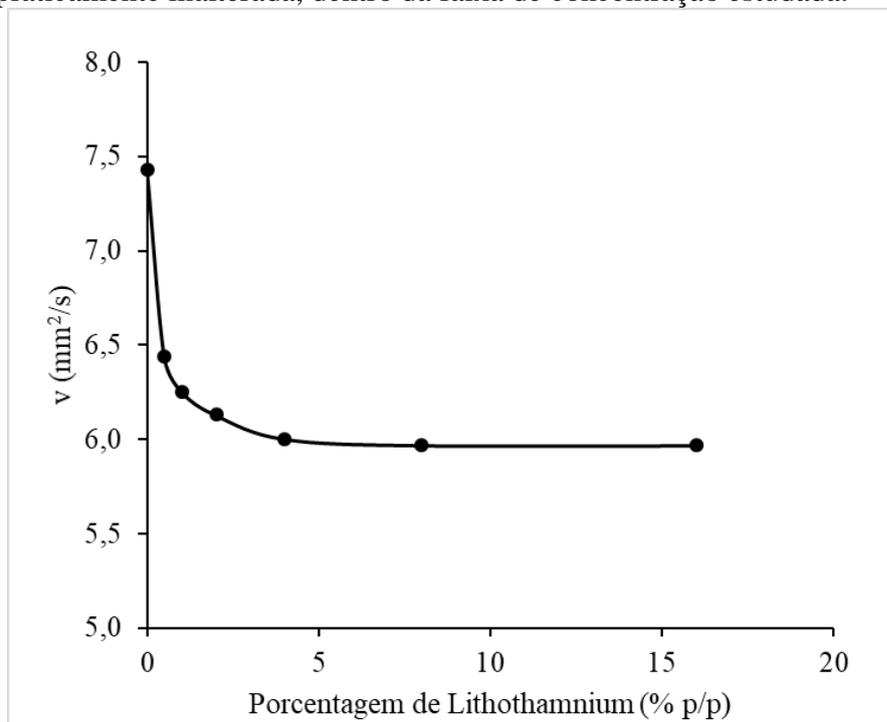


Figura 20 - Variação da viscosidade cinemática em função da porcentagem de Lithothamnium em massa.

As ligações de hidrogênio são as principais interações presentes em sistemas que contenham polímeros em solução aquosa (LIU et al, 1997). Acredita-se que no momento que o Lithothamnium é adicionado à carboximetilcelulose, ocorre a quebra das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a CMC, modificando a estrutura das cadeias poliméricas em solução. O Lithothamnium é rico em cálcio, dessa forma, os íons presentes nessa alga poderão competir com as moléculas de água.

A carboximetilcelulose é um hidrocolóide de cadeia longa composto por grupos hidroxilas, possuindo características de polieletrólitos, que ao entrar em contato com água, sofrem dissociação e geram uma molécula polimérica altamente carregada (ROHR, 2007). A adição de íons Ca^{2+} presentes no Lithothamnium podem alterar a conformação do polímero, tornando as cadeias da CMC mais flexíveis. Segundo Padmanabhan et al (2003), a adição de íons cálcio, na cadeia do polímero contendo cargas negativas, reduz as repulsões intramoleculares, contribuindo para formação de pontes iônicas entre as cargas positivas e negativas presentes no meio, favorecendo as interações intermoleculares.

Rohr (2007), em estudos sobre os efeitos da adição de íons Zn^{2+} e Mg^{2+} em composições CMC/amido diluídas, constatou que a adição desses íons reduziu a viscosidade das soluções aquosas analisadas. A interação da água com os íons através do processo de

solvatação, possibilita uma maior atuação das associações hidrofóbicas intramoleculares, reduzindo a atuação de outras interações existentes na mistura, contribuindo para a diminuição da viscosidade.

À vista disso, a redução da viscosidade cinemática das misturas CMC/Lithothamnium pode ser atribuída à diminuição da capacidade de solvatação da carboximetilcelulose pela água quando na presença de íons Ca^{2+} .

6.3 Análise Reológica das Misturas CMC/Lithothamnium

6.3.1 Ensaio de varredura de frequência

O teste de varredura de frequência foi realizado para verificar as interações intermoleculares dos sistemas poliméricos, a fim de obter-se informações sobre o comportamento viscoso e elástico das amostras, em diferentes frequências.

A Figura 21 mostra a variação dos módulos elásticos (G') e viscoso (G'') em função da frequência para a CMC pura. Foi possível observar o comportamento viscoelástico da carboximetilcelulose através das curvas de G' e G'' , onde o comportamento elástico foi superior ao comportamento viscoso em toda a faixa de frequência estudada. Segundo Rohr (2007), a carboximetilcelulose, quando em solução aquosa, apresenta fortes interações intermoleculares devido às pontes de hidrogênio entre as estruturas da CMC e as moléculas de água, possuindo capacidade de formar gel. Ademais, a carboximetilcelulose apresenta comportamento reológico semelhante ao de polieletrólitos, possuindo características predominantemente elásticas, com estruturas do tipo mais rígidas. Dessa forma, pode-se afirmar que a carboximetilcelulose apresenta comportamento elástico predominante, configurando maior estabilidade dimensional.

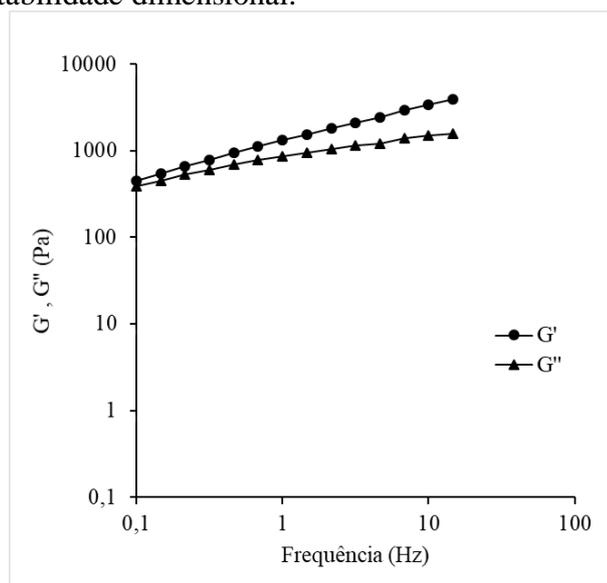


Figura 21 – Comportamento de G' e G'' em função da frequência para a CMC pura.

Conforme proposto por Winter e Chambom (1986), o módulo elástico e o módulo viscoso são dependentes da variação da frequência, de acordo com o modelo da Lei das Potências (*power-law*), onde, $G' = K_1 \cdot \omega^n$ e $G'' = K_2 \cdot \omega^n$ em que n corresponde ao tempo de relaxação das cadeias dos polímeros. Quando $n=0$ o polímero é puramente elástico, $n=1$ o polímero é puramente viscoso e $n = 0,5$ sugere a ocorrência de um comportamento intermediário entre o viscoso e elástico, indicando o ponto gel. Portanto, $n=0,5$ sugere que os

valores dos módulos elástico e viscoso apresentam o mesmo comportamento em função da frequência, $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^n$.

Na Figura 22 (a-f), foi possível observar o comportamento de G' e G'' em função da frequência para as misturas CMC/Lithothamnium contendo diferentes concentrações em massa de Lithothamnium: 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8% e 16%.

Para todas as misturas de CMC/Lithothamnium estudadas, na região de baixas frequências, os valores dos módulos de perda (G'') são superiores aos valores dos módulos de armazenamento (G'). Em determinada região da frequência ocorre a inversão dos valores dos módulos, onde G' passa a predominar sobre G'' . A posição na qual ocorre o cruzamento entre os módulos é conhecida na literatura como *crossover* ($G' = G''$). Este cruzamento não é observado em materiais com características totalmente elásticas, materiais completamente viscosos e géis compostos por fortes ligações químicas e físicas (ROHR, 2007).

O Lithothamnium possui alguns polímeros, por exemplo, do ácido algínico em sua parede celular (SOARES, 2009), quando esses polímeros são combinados ao cálcio absorvido, formam sais insolúveis tanto em água quente quanto a frio (QUIROGA, 2013), conferindo a alga um caráter viscoso. Na Figura 22 foi possível observar a ação desse caráter viscoso do Lithothamnium sobre o comportamento viscoelástico da CMC. Em baixas taxas de cisalhamento, as cadeias poliméricas da CMC interagem com o Lithothamnium, reduzindo as interações intramoleculares das cadeias da carboximetilcelulose, favorecendo a diminuição do caráter elástico, apresentando um comportamento mais viscoso. Na região de altas frequências, os movimentos moleculares tornam-se mais restritos, reduzindo as interações intermoleculares, de forma que as características da carboximetilcelulose predomina frente às características da mistura. Assim, o sistema se comporta como um sólido, fazendo com que G' predomine sobre G'' .

Na Figura 22, foi possível observar ainda que com o aumento da quantidade de Lithothamnium na mistura, ocorre um deslocamento do *crossover* para frequências mais elevadas. Nas concentrações contendo 0,5%, 1% e 2% de alga o *crossover* ocorreu na região de frequência de 1Hz, já para as concentrações contendo 4%, 8% e 16% de alga na mistura o *crossover* ocorreu em frequência acima de 1Hz. Este comportamento também foi observado em estudos realizados por Rohr (2007), Freitas (2015) e Sousa (2017). Este resultado sugere que com o aumento da quantidade de Lithothamnium na mistura, as interações intermoleculares (CMC-Lithothamnium) são favorecidas em relação as interações intramoleculares.

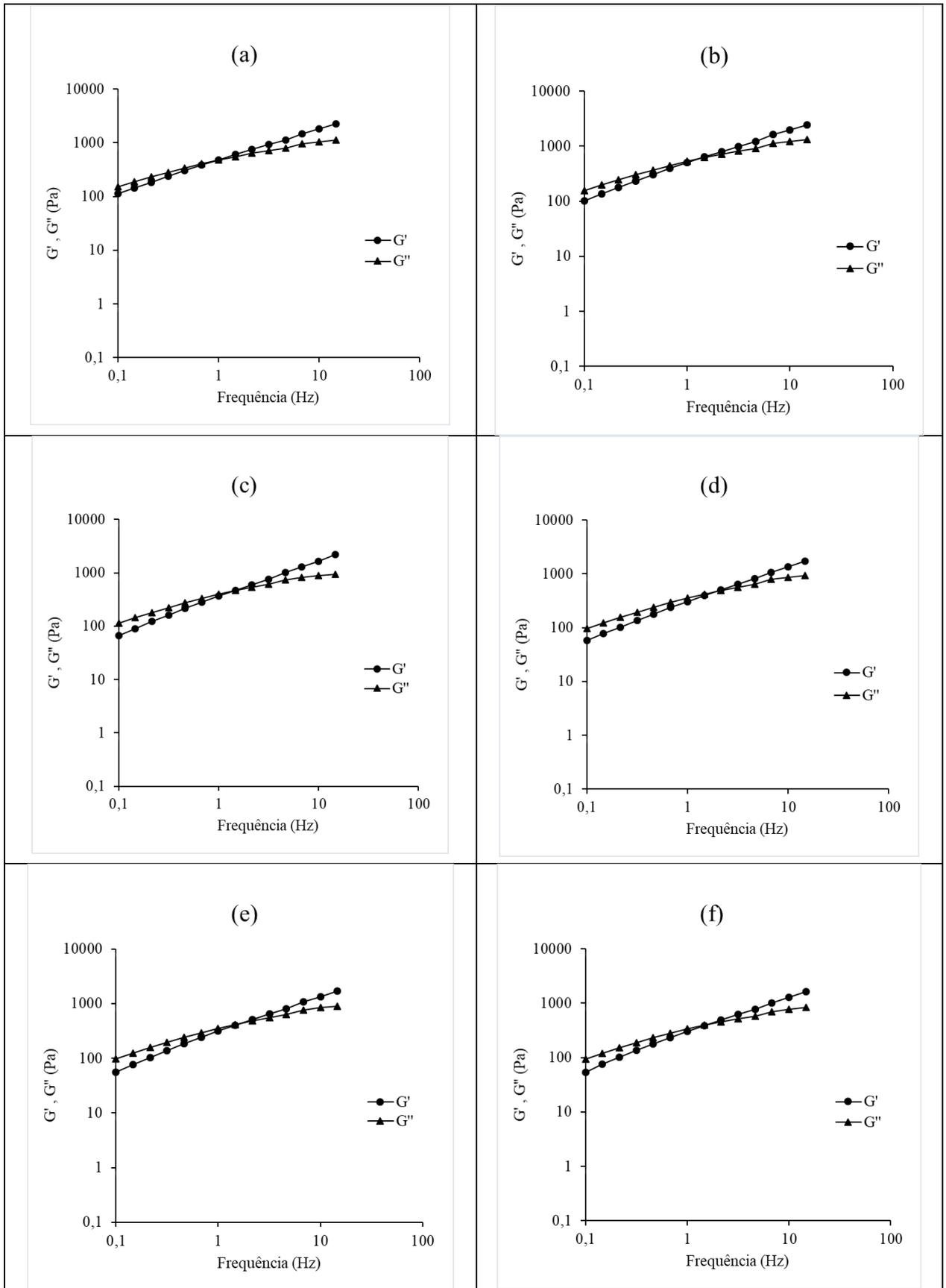


Figura 22 – Gráfico das curvas do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') em função da frequência da mistura CMC/Litho contendo: (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 2%, (d) 4%, (e) 8% e (f) 16% em massa de Lithothamnium.

A figura 23, mostra de forma comparativa o comportamento do módulo elástico (G') para as diferentes composições de CMC/Lithothamnium.

O módulo elástico fornece a componente elástica da mistura após um determinado período de cisalhamento. Observou-se na Figura 23 que a adição de Lithothamnium afetou a força elástica da mistura, principalmente em baixas frequências, onde o aumento da quantidade de Lithothamnium na mistura promoveu uma redução no valor de G' . Esse comportamento sugere que as amostras contendo maiores teores de carboximetilcelulose, apresentam uma força e resistência ao escoamento maior, devido às estruturas que formam gel.

Por outro lado, observou-se que o módulo elástico aumentou com o aumento da taxa de cisalhamento, isto é, as misturas contendo Lithothamnium tendem ao comportamento elástico da CMC em taxas de cisalhamento elevadas. Este resultado permite sugerir que o aumento da taxa de cisalhamento diminui as interações entre a CMC e o Lithothamnium, indicando que as misturas sofrem um envelhecimento de suas estruturas.

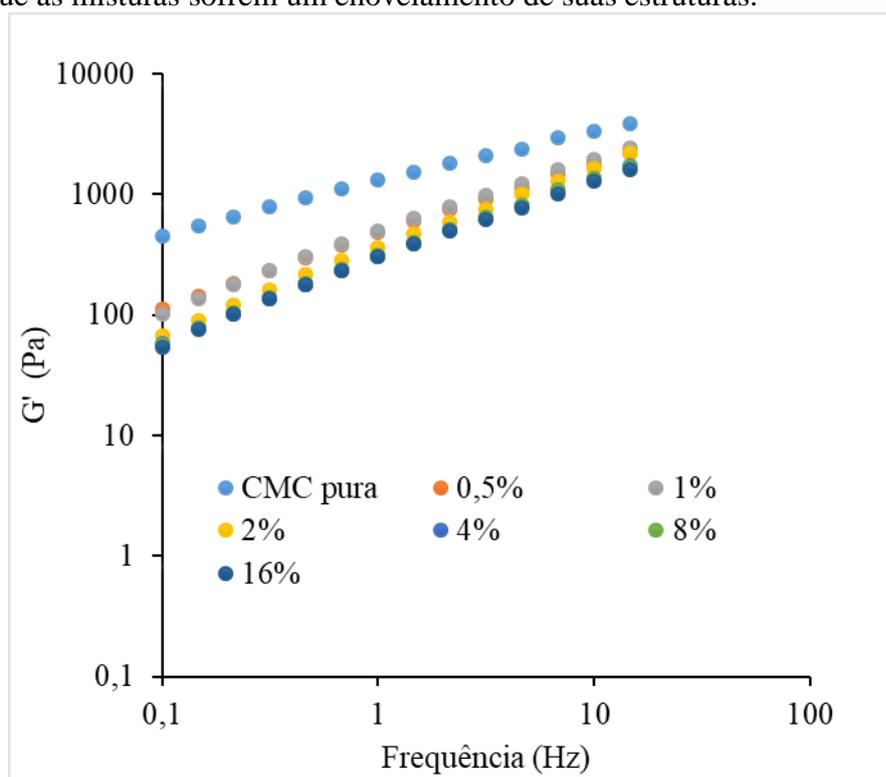


Figura 23 – Variação do módulo elástico (G') em função da frequência, variando a composição da mistura CMC/Lithothamnium.

6.3.2 Teste de fluência e recuperação (*creep/recovery*)

Os ensaios de fluência e recuperação à tensão constante permitem diferenciar as respostas elásticas e viscosas das misturas e incorpora uma medida adicional de 'tempo de relaxação' para a dependência dos comportamentos elástico e viscoso na tensão (SCHRAMM, 1994). Esses testes são muito utilizados na engenharia de alimentos para simular a vida útil de materiais, controlar a tensão e a sedimentação (ROHR, 2007).

Na Figura 24 estão apresentadas as curvas do ensaio de fluência e recuperação em função do tempo para a carboximetilcelulose pura e para as composições CMC/Lithothamnium contendo diferentes concentrações em massa de Lithothamnium: 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8% e 16%.

Analisando as curvas de fluência e recuperação apresentadas nas Figuras 24, verificou-se que os valores de deformação (ou compliança) aumentam com o aumento da quantidade de Lithothamnium na mistura. É possível notar que quando a alga Lithothamnium é adicionado na mistura, há um aumento do comportamento viscoso, indicando que as composições sofrem mais deformações irreversíveis. Foi possível observar ainda que a amostra contendo 16% de Lithothamnium em sua composição, apresenta valores de compliança quase 6 vezes maiores que a amostra contendo CMC puro.

Rohr (2007), em seu estudo da estabilidade de misturas contendo CMC/Amido, obteve resultados de fluência e recuperação semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Da mesma maneira, Freitas (2015) obteve resultados semelhantes em seu estudo com composições contendo CMC/Espirulina. Esse comportamento de fluência e recuperação das misturas contendo CMC/amido e CMC/Espirulina é atribuído ao fato de que a CMC quando associada a estes componentes passa a apresentar estruturas menos rígidas. Isso se dá devido às poucas interações hidrofílicas entre as cadeias da CMC e do amido (ou espirulina) com a água.

Assim, o mesmo pode ser atribuído ao que ocorre com a mistura contendo CMC/Lithothamnium, ou seja, à medida que o teor de Lithothamnium na composição aumenta, as cadeias da CMC tornam-se mais dispersas, o que leva a uma diminuição de suas interações intermoleculares.

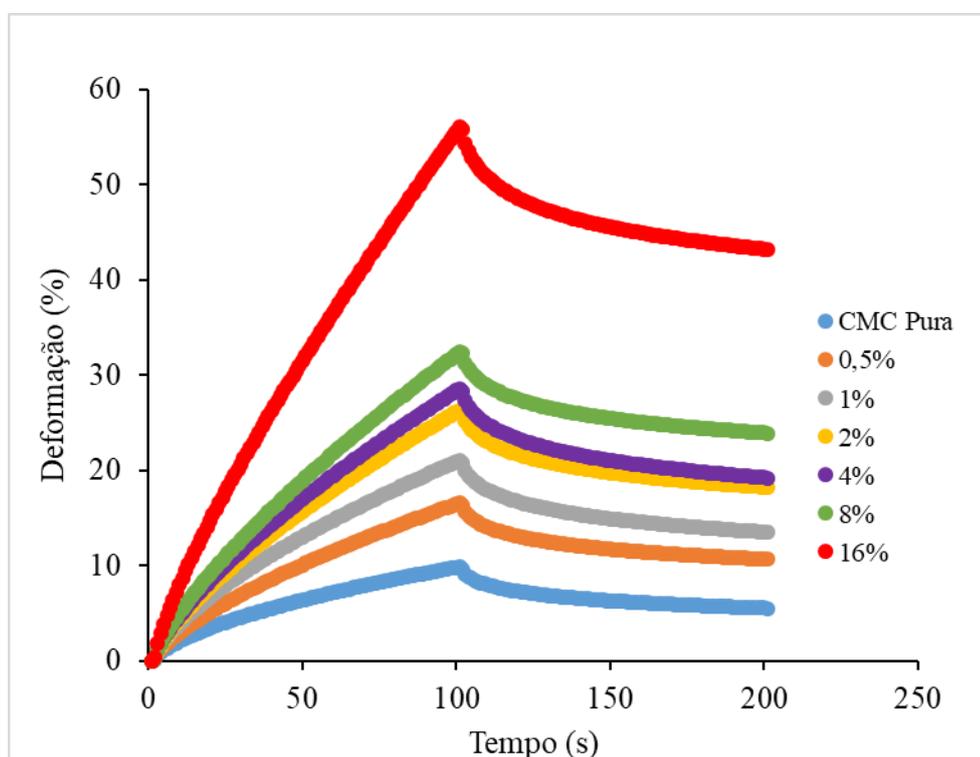


Figura 24 – Gráfico do comparativo da fluência e recuperação em função do tempo para a CMC pura e para as misturas CMC/Litho contendo: 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8% e 16% em massa de Lithothamnium.

6.4 Sobrevivência da Estirpe BR3262 nos Veículos de Inoculação CMC/Litho

6.4.1 Efeito do teor de Lithothamnium na sobrevivência da estirpe BR3262

A sobrevivência da estirpe rizobiana BR3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi* no veículo de inoculação polimérico CMC/Lithothamnium foi determinada após o 7°, 14°, 28° e 56° dia de incubação à temperatura de 21°C.

Analisando os resultados de viabilidade celular da estirpe BR3262, apresentados na Tabela 8, os resultados mostraram que o efeito da adição de Lithothamnium diminuiu a sobrevivência das células para todas as amostras com o passar dos dias de armazenamento, apresentando maior redução no 56° dia de experimento quando comparado com a CMC pura. Os valores de sobrevivência obtidos para as amostras contendo Lithothamnium, mostraram que o aumento da quantidade de Lithothamnium afeta pouco a sobrevivência da estirpe, porém, quando 16% de Lithothamnium estão presentes na mistura a redução da viabilidade celular após 56 dias de armazenamento é menor, quando comparado com os outros teores de Lithothamnium utilizados, podendo considerar a quantidade de 16% como uma condição a ser utilizada.

Tabela 8 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi* em veículo CMC/Lithothamnium após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.

Lithothamnium (%)	Viabilidade Celular (log UFC ml ⁻¹)				Média
	Período de armazenamento (dias)				
	7	14	28	56	
0	8,535	8,273	8,150	8,060	8,254
2	8,351	8,216	7,637	6,658	7,715
4	8,144	8,130	7,253	6,844	7,593
8	8,088	7,890	7,629	6,558	7,541
16	8,115	8,141	7,422	7,297	7,743

6.4.2 Efeito do teor de Fósforo na sobrevivência da estirpe BR3262

Os resultados de sobrevivência das células obtidos para as misturas CMC/Lithothamnium pura e contendo fósforo são apresentados na Tabela 9. Neste caso, mesmo para as amostras contendo teores de fósforo, 5 ppm e 50 ppm, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, com o tempo de armazenamento. É possível observar que para as misturas CMC/Litho contendo 50 ppm de fósforo a redução foi menor após 56 dias de armazenamento.

Tabela 9 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi* em veículo CMC/Lithothamnium contendo teores de 5 e 50 ppm de fósforo após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.

Fósforo (ppm)	Lithothamnium (%)	Viabilidade Celular (log UFC ml ⁻¹)				Média
		Período de armazenamento (dias)				
		7	14	28	56	
0	0	8,535	8,273	8,150	8,060	8,254
	2	8,351	8,216	7,637	6,658	7,715
	4	8,144	8,130	7,253	6,844	7,593
	8	8,088	7,890	7,629	6,558	7,541
	16	8,115	8,141	7,422	7,297	7,743
5	2	8,323	8,075	7,181	7,145	7,681
	4	8,302	7,789	7,411	6,825	7,581
	8	8,383	8,102	7,315	7,014	7,703
	16	8,426	7,764	7,334	6,268	7,448
50	2	8,145	8,2105	7,9379	7,393	7,922
	4	8,178	8,1118	7,749	7,672	7,927
	8	8,078	7,835	7,515	7,629	7,764
	16	8,354	7,8846	7,3395	7,079	7,664

Na Tabela 10 é apresentado um estudo comparativo contendo os resultados do teste para a viabilidade celular em menores concentrações de Lithothamnium (2 e 4%), contendo fósforo também na concentração de 500 ppm. Ao analisarmos o período de armazenamento das misturas foi possível observar que também ocorreu uma diminuição da viabilidade celular ao longo de dois meses para as misturas de mesma concentração de fósforo. Comparando os valores das médias obtidas entre as amostras contendo 5, 50 e 500 ppm, notou-se que a mistura contendo 50 ppm foi a que apresentou valores de sobrevivência mais elevados, mais próximos ao esperado pela Turfa.

Apesar de ocorrer essa queda na viabilidade celular nas composições contendo Lithothamnium, a vantagem do veículo é a possibilidade de disponibilizar micronutrientes como o molibdênio, o ferro e o zinco para as células bacterianas e vegetais.

Tabela 10 - Viabilidade de células da estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi* em veículo CMC/Lithothamnium 2% e 4% contendo teores de 5, 50 e 500 ppm de fósforo após 7, 14, 28 e 56 dias de armazenamento a 21°C.

Fósforo (ppm)	Lithothamnium (%)	Viabilidade Celular (log UFC ml ⁻¹)				Média
		Período de armazenamento (dias)				
		7	14	28	56	
0	0	8,535	8,273	8,150	8,060	8,254
	2	8,351	8,216	7,637	6,658	7,715
	4	8,144	8,130	7,253	6,844	7,593
5	2	8,323	8,075	7,181	7,1453	7,681
	4	8,302	7,789	7,411	6,8251	7,581
50	2	8,145	8,210	7,938	7,3932	7,922
	4	8,178	8,112	7,749	7,6722	7,927
500	2	7,844	7,780	7,555	7,139	7,579
	4	7,976	7,848	6,619	6,944	7,346

6.5 Valores de pH das Misturas CMC/Litho e CMC/Litho/Fósforo

Os valores de pH das misturas poliméricas CMC/Lithothamnium inoculadas com a estirpe BR3262 foram determinados após o 7°, 14°, 28° e 56° dia de incubação. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Os resultados da Tabela 11 mostram que os valores de pH das amostras encontrados foram na faixa de 7,0 a 9,0. Analisando os resultados de pH foi possível observar que o pH aumentou com a adição de Lithothamnium na mistura. Esse comportamento ocorreu para misturas contendo fósforo ou não. Ao analisarmos os valores obtidos de pH, em função do tempo de armazenamento, observou-se um aumento nos valores de pH para as misturas contendo Lithothamnium. Esse comportamento não foi observado para a CMC sem Lithothamnium (pH = 7,14), situação em que o pH se manteve neutro.

Os resultados apresentados na caracterização do Lithothamnium, conforme apresentados nos resultados de Espectroscopia na Região do Infravermelho, apontaram que esta alga possui, em sua estrutura, carbonato de cálcio o que pode justificar o aumento da alcalinidade do meio. Pelo exposto, a redução da viabilidade celular, conforme apresentadas na análise de sobrevivência da estirpe BR3262, pode ser atribuída ao aumento da alcalinidade do meio, uma vez que essa estirpe é bem sensível a pH alcalino.

Apesar de ocorrer o aumento da alcalinidade, a faixa de pH entre 7,0 e 9,0 indica um comportamento aceitável para o crescimento de algumas estirpes rizobianas. De acordo com

Hungria e Vargas (2000), o pH ideal para o crescimento de estirpes rizobianas está compreendido ente 6,0 e 7,0. Poucas estirpes crescem em pH inferiores a 5,0, pois a maioria das espécies são sensíveis ao meio ácido. Além disso, Favero *et al* (2015), observaram, através de análises preliminares de inoculantes a base de CMC/Amido, que valores de pH na faixa de 10-11 reduzem a eficiência do inoculante e conseqüentemente a redução da viabilidade celular.

Tabela 11 – Avaliação do pH das composições CMC/Lithothamnium inoculadas com células da estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium pachyrhizi*.

Fósforo (ppm)	Lithothamnium (%)	pH			
		7 dias	14 dias	28 dias	56 dias
0	0	7,25	6,99	7,02	7,14
0	2	8,17	8,20	8,48	8,50
0	4	8,39	8,43	8,60	8,75
0	8	8,67	8,65	8,80	8,72
0	16	8,71	8,70	8,78	8,82
5	2	8,20	8,30	8,54	8,62
5	4	8,60	8,51	8,78	8,68
5	8	8,72	8,67	8,81	8,89
5	16	8,82	8,77	8,86	8,92
50	2	8,15	8,18	8,36	8,36
50	4	8,56	8,50	8,70	8,58
50	8	8,65	8,67	8,80	8,79
50	16	8,77	8,77	8,79	8,86
500	2	8,07	8,04	8,16	8,21
500	4	8,52	8,45	8,48	8,46

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa dissertação permitiram extrair importantes observações e conclusões a respeito da utilização da alga *Lithothamnium calcareum* como veículo de inoculação.

Resultados obtidos nos ensaios reológicos mostraram que em regiões de baixas frequências a presença de *Lithothamnium* confere um caráter viscoso a mistura. Entretanto, observou-se uma predominância da componente elástica em regiões de maiores frequências, tendendo ao valor apresentado pela CMC pura. Esse resultado indica a presença de interações intermoleculares entre fases da mistura CMC/*Lithothamnium*, indicando também que não ocorrerá separação de fase na mistura. Esse resultado é desejado para essas aplicações tecnológicas, principalmente para preparações de inoculantes que requerem longos períodos de armazenamento.

Através dos resultados obtidos por Espectroscopia na Região do Infravermelho foi possível constatar a presença predominante de carbonato de cálcio presente na alga, além de outros íons.

O estudo da viabilidade celular mostrou que a CMC foi o material que manteve elevado nível de sobrevivência de célula; entretanto, esse material é de difícil manipulação e aplicação devida sua elevada elasticidade. Além disso, a CMC quando pura é mais sucessível a contaminação, o que reduz o seu potencial para sua aplicação tecnológica.

Os resultados contendo *Lithothamnium* sugerem existir um ponto ótimo de teor de *Lithothamnium* a ser usado, nesse caso 16%, e quando enriquecido com fósforo o teor ótimo a ser usado é o de 50 ppm de fósforo. Os valores obtidos para sobrevivência são próximos aos esperados para os inoculantes turfosos (10^7 ucf/mL), que são os materiais tradicionalmente usados. Observou-se que desse material concentra-se na sua alcalinidade que, embora não seja muito elevada, em torno de pH = 8,5, pode ser um problema quando tratamento de inoculantes envolvendo estirpes bacterianas mais sensíveis a pH alcalinos. Fato que não impede que esse material possa ser utilizado para outras estirpes. As pesquisas mostraram que além de conferir uma boa estabilidade dimensional à mistura, a presença do *Lithothamnium* contribui para disponibilizar micronutrientes importantes para as células bacterianas e vegetais, como é o caso do molibdênio.

Por fim, as pesquisas realizadas nessa dissertação mostraram que a alga *Lithothamnium* apresenta potencial para ser utilizado em conjunto com a carboximetilcelulose como veículo de inoculação.

8 SUGESTÕES

A realização de novos testes em períodos mais longos de incubação para verificar a viabilidade celular e estabilidade das misturas poliméricas.

Realizar testes com outras composições e concentrações contendo a alga *Lithothamnium*.

Realizar análises de Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das misturas CMC/*Lithothamnium*.

Investigar a viabilidade celular de outras estirpes rizobianas, como a BR3267, muito utilizada na literatura. Essa análise seria conveniente pois cada estirpe possui características únicas, podendo apresentar resultados melhores do que os obtidos com a estirpe utilizada nesse trabalho.

Realizar testes em casa de vegetação e em campo para verificar a eficiência do inoculante em condições de plantio.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, P. O. L. C. **Lithothamnium e substratos no crescimento de plântulas do citrumeleiro “swingle”**. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ARAÚJO, S. C. Inoculação da soja: uma prática altamente rentável. **Informações Agronômicas**, p. 9, n. 87, 1999.

ARAÚJO, S. C. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes, 2013. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/a-evolucao-da-producao-de-inoculantes-no-brasil/>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

BAETA, D. A. **Uso da tecnologia de compatibilização reativa e não reativa no processo de reciclagem de borracha butadieno-estireno (SBR) vulcanizada em composições de borracha nitrílica (NBR)**. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. **An introduction to rheology**. 1. ed. New York: Elsevier, 1989.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BITTENCOURT, J. V. M.; SANTOS, M. H. R. Inoculantes agrícolas. **Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais**. p. 323-337. 2010.

BIRD, R. B., STEWART, W. E., LIGHTFOOD, E. N. **Fenômenos de Transporte**, 2. ed, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 24, p. 527-535, 2000.

BURGARDT, V. C. F. **Estudo das interações físico-químicas entre caseinomacropéptido e carboximetilcelulose: efeito do pH e concentração**. 165p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

CALETTI, R. P. K. **Eficiência do *Lithothamnium Calcareum* na sorção do fósforo de lixiviado de aterro sanitário**. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

CÂMARA, G. M. S. Nitrogênio e produtividade da soja. In: CÂMARA, G. M. S. (Eds.). **Soja: Tecnologia da Produção II**, Piracicaba, p. 295-339, 2000.

CANCELA, M.A.; ÁLVAREZ, E.; MACEIRAS, R. Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 419-424, 2005.

CARDOSO, D. N. P. **Influência do teor de cinza volante na reologia de argamassa de assentamento. Fabricado com reciclagem de resíduos.** 96 p. Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

CARLOS, A. C.; SAKOMURA, N. K.; PINHEIRO, S. R. F.; TOLEDANO, F. M. M.; GIACOMETTI, R.; SILVA JUNIOR, J. W. Uso da alga *Lithothamnium calcareum* como fonte alternativa de cálcio nas rações de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 833-839, 2011.

CAVALCANTI, V. M. M. **Plataforma Continental: A última fronteira da mineração brasileira.** Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2011. 104 p.

CORREIA, T. P. S. **Eficiência operacional, econômica e agrônômica da inoculação de soja via sulco de semeadura.** 95p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.

COUTINHO, M. S. **Estudo reológico e da biocompatibilidade das misturas CMC/Amido e CMC/EPS e seu uso como veículo de inoculação.** 54p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

CRUZ, M. C. M. et al. Desenvolvimento do porta-enxerto de tangerineira ‘cleópatra’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 471-475, 2008.

DAZA, A.; SANTAMARÍA, C.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. M.; CAMACHO, M.; ORIVE, C.; TEMPRANO, F. Perlite as carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 567–572, 2000.

DIAS, G. T. M. Granulados bioclásticos – algas calcárias. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, n. 3, p. 307-318, 2000.

DOMMARGUES, Y. R.; DIEM, H. G.; DIVIES, C. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 779-781, 1979.

FAVERO, V. O.; CARVALHO, J. F.; FERREIRA, R. T.; XAVIER, G. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G. Efeito de diferentes amidos e concentrações de agente compatibilizante no pH de veículo polimérico. In: XV SEMANA CIENTÍFICA JOHANNA DÖBEREINER. Seropédica: Embrapa, 2015.

FERNANDES JUNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas.** 43p. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 6-12, 2003.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J. J.; OLIVEIRA FILHO, E. C. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 1497-1506, 1992.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: Mc-Graw-hill book company, 1928.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, p. 117-126, 1999.

FREITAS, C. S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANECK, N. G.; XAVIER, G. R. Uso da mistura Carboximetilcelulose/Spirulina como veículo de inoculação – efeito da viscosidade e da estabilidade da mistura. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014^a, Florianópolis, p. 1-6.

FREITAS, C. S.; RUMJANECK, N. G.; XAVIER, G. R.; OLIVEIRA, P. J. Desenvolvimento de veículo de inoculação a base de Spirulina/Carboximetilcelulose: estudo da viscosidade, da estabilidade e da sobrevivência de células de rizóbio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 21., 2014^b, Cuiabá, p. 7377-7383.

FREITAS, C. S. **Mistura polimérica Espirulina/Carboximetilcelulose como veículo de inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. 65p. Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Documentos/Embrapa Soja**, Londrina, n. 283, 2007.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.). **Nitrogen fixation agriculture, forestry, ecology and the environment**, Dordrecht, p. 224-253, 2005.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

JAWSON, M.D.; FRANZLUBBERS, A.J.; BERG, R.K. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels. **Applied Environmental Microbiology**. v.55, n. 3, p. 617-622, 1989.

JUNG, G.; MUGNIER, J.; DIEM, H. G.; DOMMARGUES Y. R. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**, v. 65, p. 219-231, 1982.

KÄISTNER, U.; HOFFMANN, H.; DÖNGES R.; HILBIG, J. **Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose**. *Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, p. 307-228, 1997.

LOPES, N. M. **Suplementação de vacas leiteiras com farinha de algas (*Lithothamnium calcareum*)**. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – produção animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

Lithothamne/Lithothamnium calcareum - **Le calcaire marin. Instituições Gangloff**, France, 2012. Disponível em: <<http://www.ets-gangloff.fr/engrais/lithothamnium-calcareum-lithothamne.htm>>. Acesso em: 18 mai. 2017.

LIU, M.; CHENG, R.; WU, C.; QIAN, R., Viscometric investigation of intramolecular hydrogen bonding cohesive entanglement in extremely dilute aqueous solution of poly vinyl alcohol. **Journal Polymer Science Polymer Physics**, v. 35, p. 2421-2427, 1997.

MACHADO, J. C. V.; **Reologia e escoamento de fluidos: ênfase na indústria do petróleo**. Rio de Janeiro: Editora Interciência: Petrobras, 2002.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W., RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M.C. P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p. 333-339. 2003.

MELO, P. C.; FURTINI NETO, A. E. Avaliação do Lithothamnium como corretivo da acidez do solo e fonte de nutrientes para o feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.3, p. 508-519, 2003.

MELO, T. V.; MOURA, M. A. Utilização da farinha de algas calcáreas na alimentação animal. **Archivos Zootecnia**, v. 58, p. 99-107, 2009.

Minerais de Algas para saúde. **LithoLife**, Joinville, 2017. Disponível em: <<http://www.litholife.com.br/index.html>>. Acesso em: 14 mai. 2017.

PADMANABHAN, P. A.; KIM, D. S.; PAK, D.; SIM, J. S. Rheology and gelation of waterinsoluble dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. **Carbohydrate Polymer**, 53, 459–468, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN. J. R. **Introdução a espectroscopia**. 2. ed. (Tradução da 5ª Edição Norte-Americana). Boston: Cengage Learning, 2015.

QUIROGA, A. L. B. Dossiê Gelificantes: Alginatos – Overview. **Food Ingredients Brasil**, v. 27, p. 64-66, 2013.

RELARE - Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. *Estatuto Social*. Londrina, p.

1-7, Ago. 2012.

ROCHA, C. M. S. **Estudo químico de *Lithothamnion sp.* e *Halimeda sp.* no nordeste brasileiro.** 215p. Tese (Doutorado em Geologia) – Departamento de Geologia, Universidade Federal do Ceará, 2013.

ROHR, T.G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano.** 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

SÁ, A. R. M. **Irrigação e adubação com *Lithothamnium* no cultivo de pimentão orgânico.** 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solo e Água) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SANTOS, A. A. **Produção de polissacarídeos visando obter insumos biológicos de interesse para a agricultura.** 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SCHUH, C. A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes.** 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SCHRAMM, G. **Practical Approach to Rheology and Rheometry**, First Edition, Karlsruhe, Germany, p 1-129, 1994.

SILVA, D.; DEBACHER, N. A.; CASTILHOS JUNIOR, A. B.; ROHERS, F. Caracterização físico-química e microestrutural de conchas de moluscos bivalves provenientes de cultivos da região litorânea da ilha de Santa Catarina. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1053-1058, 2010.

SILVA, M. F. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar.** 80p. Tese (Doutorado em Ciências em Agronomia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

SOARES, B. G.; OLIVEIRA, P. J. Efeito da Compatibilização da Mistura NBR/EVA sobre sua Morfologia de Fase Co-contínua. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 28-35, 2003.

SOARES, C. M. **Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos.** 2009. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SOUSA, E. B. **Preparação de veículo de inoculação a base de EPS\CMC: Obtenção, caracterização e desempenho.** 52p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.

SOUSA, P. M. **Otimização do processo de produção de células das estirpes de *Bradyrhizobium INPA 3-11B* e *UFLA3-84*, inoculantes do feijão-caupi.** 141p. tese (Doutorado) - Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOUZA, Y. L. S. **Utilização da alga *Lithothamnium calcareum* para poedeiras de linhagens leves.** 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

SPARROW, S. D. JR.; HAM, G. E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. **Agronomy Journal**, v. 75, p. 181–184, 1983.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 249-258, 2000.

TANNER, R.I.; **Engineering rheology.** NewYork: Oxford University Press, 1988.

TATTERSAL, G. H.; BANFILL, P. F. G. **The rheology of fresh concrete.** London: Pitman, 1983.

TEIXEIRA, R. G. **Avaliação da farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães.** 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2008.

TONG, Q.; XIAO, Q.; LIM, L. T. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. **Food Research International**, v. 41, p. 1007-1014, 2008.

VASQUEZ, A.M.A. **Estudo das propriedades reológicas de polipropilenos em fluxos de cisalhamento e fluxos elongacionais.** 123p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Viscosímetro do tipo Cannon-Fenske. **Labs do Brasil – Qualidade e precisão para seu laboratório.** Guarulhos, 2018. Disponível em: <<http://www.labsdobrasil.com.br/vidrarias-e-porcelanas1/capilares-para-viscosimetro/certificado-de-calibracao-rastreavel-em-viscosimetro-cannon-fenske-transparente-conforme-astm-d-445-e-d-446/?variant=20985786>>. Acesso em: 19 jan. 2018.

VINCENT, J.M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

WINTER, H. H.; CHAMBON, F. J. Analysis of Linear Viscoelasticity of Crosslink Polymer at the Gel Point. **Journal of Rheology**, 30, 367-382, 1986.

YUEN, S.; CHOI, S.; PHILLIPS, D. L.; MA, C. Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1091-1098, 2009.