



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO

**Ação antimicrobiana de enzimas hidrolíticas produzidas por
Trichoderma asperellum e imobilizadas em blendas de polímeros
biodegradáveis**

Barbara Dumas Santos Silva

Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes
(Orientadora)

Goiânia
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

S586a Silva, Barbara Dumas Santos.
Ação antimicrobiana de enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma asperellum* e imobilizadas em blendas de polímeros biodegradáveis [manuscrito] / Barbara Dumas Santos Silva. - 2011.
81 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes; Co-orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2011.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.
Apêndices.

1. Enzimas quitinolíticas 2. Biocontrole 3. Blendas poliméricas I. Título.

CDU: 577.152.21

Barbara Dumas Santos Silva

**Ação antimicrobiana de enzimas hidrolíticas produzidas
por *Trichoderma asperellum* e imobilizadas em blendas
de polímeros biodegradáveis**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biologia, do
Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Goiás, como
requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Biologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Goiânia

2011

Barbara Dumas Santos Silva

**Ação antimicrobiana de enzimas hidrolíticas produzidas por
Trichoderma asperellum e imobilizadas em blendas de polímeros
biodegradáveis**

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Flávia Fernandes (UFG)

1º Examinador: Prof. Dr. Robson Maia Geraldine (UFG)

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Samantha Salomão Caramori (UEG)

Suplentes

1º Examinador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (UFG)

2º Examinador: Prof. Dr. Flávio Marques Lopes (UEG/Faculdade Anhanguera de
Anápolis)

Goiânia

2011

AGRADECIMENTOS

Andei por caminhos não tão fáceis, mas foi pisando sobre pedras que aprendi a me equilibrar. Aprendi! Não tudo que a vida podia me ensinar, mas aquilo que minha maturidade me permitiu assimilar, e assim sei que o que mais aprendi foi a me conhecer. Hoje saio daqui em busca de novos ideais, sentindo a emoção da despedida, e por isso, quero agradecer!

À minha família...

De certa forma todos participaram, na medida do que podiam, na medida do que entendiam, na medida do seu amor! Mas minha mãe e irmã, aquelas que fazem o conceito de família ser algo que me agrada, foram aquelas que também fizeram valer a pena essa e outras tantas conquistas! Se eu lutei não foi apenas por mim, foi por vocês, foi por nós!

À minha orientadora...

“Homem algum poderá revelar-nos, senão o que já está meio adormecido na aurora do nosso entendimento. O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos, não dá de sua sabedoria, mas sim de sua fé e de sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não nos convidará a entrar na mansão de seu saber, mas nos conduzirá antes ao limiar de nossa própria mente, porque um homem não empresta suas asas a outro homem”.

Hoje, se algum dia já tive a vontade de entrar em sua sala e pedir para deixar nosso laboratório, ao contrário, quero pedir para ficar. Ficar mais um pouco, pela segurança de poder contar com seu carinho, sua sabedoria, seu apoio, que acima de tudo, suscitou em mim a maturidade profissional. Agora podemos prorrogar nosso tempo e em instantes nos tornaremos “apenas” amigas, mas com a certeza de que sempre serei uma discípula daquilo que você mais me ensinou, ser forte como mulher!

Ao Professor Cirano...

Pela paciência, pela educação e pela ternura no tratamento e nos gestos. Coisas que não deveriam ser agradecidas, toda pessoa deveria ser assim! Mas não são! São criaturas raras as que conseguem lidar com o conhecimento sem ostentá-lo como arma de ouro, espada fina, de gume afiado! Sua gentileza me encanta!

Aos meus amigos...

Eu não tenho tantos amigos, nem poderia tê-los, não consigo me dividir muito! Por isso, os poucos que tenho sabem: – eu sou deles completamente. Em todos os lugares por onde passei, saí sabendo que levava grandes amigos. Aqui conheci muitos outros: Adriane, Aline, Eduardo, Martina, Marcos, Carol, Patrícia, que são ou foram do LQP. E aqueles do mestrado de forma geral, de outros laboratórios, de outras turmas, mas que são tão adorados! Amanda, Rachel, Marcela, Amanda do Fabyano, o próprio Fabyano, Marquim, Roberta, Igor, Elvira, Fernanda e Kárita. Esses são meus queridos! Sempre presentes, eu torço por eles e sei que sempre torceram por mim.

*Ainda aqui, não poderia deixar de lembrar e agradecer aos meus primeiros orientadores, **Prof. Flávio Monteiro Ayres e Profª. Samantha Salomão Caramori**, que plantaram em mim uma semente que hoje já árvore, nunca deixará de dar frutos!*

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho: parceiros, laboratórios, Universidades e professores.

*O lar do passarinho não é o ninho, é o ar,
porque vida de passarinho é voar!*

Lista de Figuras

Figura 1.	Contaminação de embalagem de couve-flor por <i>Aspergillus niger</i>	16
Figura 2.	Contaminação de pão por <i>Penicillium</i> sp.	17
Figura 3.	Contaminação de embalagem de vagem <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
Figura 4.	Quitina	23
Figura 5.	Representação esquemática do mecanismo de clivagem das enzimas quitinolíticas	24
Figura 6.	Diferentes famílias de polímeros biodegradáveis e suas matérias-primas	26
Figura 7.	Estrutura química do co-poliéster co-polibutileno adipato tereftalato (PBAT) Ecoflex®	27
Figura 8.	Possíveis formas de construção de sistemas de embalagens antimicrobinas para alimentos	34
Figura 9.	Reação entre as cadeias da PVA e PEJU na presença de mataperiodato de sódio	48
Figura 10.	Perda de massa dos filmes PVA-PEJU em função do tempo de biodegradação	50
Figura 11.	Cinética de produção enzimática	51
Figura 12.	Ação da enzima amilase na biodegradação do filme Amido-Ecoflex®	53
Figura 13.	Curva de crescimento dos fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> sp e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio de cultura na presença de enzima 0,1% e 0,5%, sob agitação (180 rpm) a 28° C	57
Figura 14.	Crescimento dos microrganismos sobre as tiras do filme Amido-Ecoflex®	59
Figura 15.	Crescimento dos microrganismos sobre as tiras de PVA-PEJU	60
Figura 16.	Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes	61
Figura 17.	Ação das enzimas hidrolíticas de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre <i>Aspergillus niger</i>	63

Figura 18.	Ação das enzimas hidrolíticas de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre <i>Penicillium</i> sp.	64
Figura 19.	Ação das enzimas hidrolíticas de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	65

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Propriedades do polímero poli-butileno adipato co-tereftalato (PBAT)	28
Tabela 2.	Exemplos de potenciais agentes antimicrobianos para sistemas de embalagens de alimentos	32
Tabela 3.	Espessura, solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes Amido-Ecoflex [®]	40
Tabela 4.	Espessura, solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes PVA-PEJU	49
Tabela 5.	Enzimas produzidas por <i>Trichoderma asperellum</i> no 5º dia de crescimento em meio TLE	54
Tabela 6.	Massa seca de <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp. e <i>S. sclerotiorum</i> após crescimento em meio líquido com T-CWDE (0,1% e 0,5%) em 12 h e 24 h.	56
Tabela 7.	Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente no filme Amido-Ecoflex [®]	58
Tabela 8.	Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente em PVA-PEJU	58

Resumo

O trabalho foi conduzido com o objetivo de testar a ação de enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma asperellum*, imobilizadas em filmes biodegradáveis, como agente inibidor do crescimento de microrganismos. A atividade inibitória foi testada sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, microrganismos geralmente relacionados com o ataque e, ou, contaminação de alimentos, seja no campo ou embalados. Foram utilizadas duas blendas poliméricas de diferentes composições, uma a base de amido de mandioca e poli-butileno-adipato-co-tereftalato (Ecoflex[®]; BASF Chemical Company) e outra a base de álcool polivinílico (PVA) e polissacarídeo de caju (PEJU). *T. asperellum* foi induzido a produzir as enzimas envolvidas no processo de ataque micoparasita (*N*-acetilglicosaminidases, β -1,3-glicanases, quitinases e proteases) pela adição de quitina bruta no meio de crescimento. As enzimas produzidas em maior quantidade foram *N*-acetilglicosaminidases e quitinases. O “pool” de enzimas produzidas foi então utilizado nos experimentos de imobilização. O processo de imobilização foi realizado nos filmes por dois métodos: ligação covalente ou ligação iônica. Em ambos os métodos, a presença de enzimas hidrolíticas imobilizadas resultou em redução do crescimento dos microrganismos, porém na imobilização por ligação covalente os resultados foram mais expressivos. *S.sclerotiorum* foi o microrganismo mais sensível, seguido por *A. niger* e *Penicillium* sp. Para confirmar a ação hidrolítica das enzimas produzidas por *T. asperellum* e avaliar os efeitos por elas produzidos na parede celular e demais estruturas dos microrganismos, os filmes com enzima imobilizada por ligação covalente foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura. As estruturas mais afetadas foram hifas e esporos. De forma geral, a ação sinérgica de todas as enzimas produzidas por *T. asperellum* reduziu visivelmente o crescimento dos microrganismos quando imobilizadas na superfície dos filmes Amido-Ecoflex[®] e PVA-PEJU. Além disso, as blendas poliméricas testadas apresentaram características desejáveis para futuro uso em embalagens de alimentos e principalmente, também constituem sistemas eficientes para imobilização de enzimas.

Palavras-chave: enzimas quitinolíticas, imobilização, biocontrole e blendas poliméricas

Abstract

The hydrolytic activity of enzymes produced by *Trichoderma asperellum*, immobilized biodegradable films, as growth inhibitor of microorganisms was tested. The inhibitory activity was demonstrated on *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*, microorganisms usually related to the attack and/or food contamination at the field or packaged. We used two polymer blends with different compositions, cassava starch and poly-butylene adipate-co-terephthalate (Ecoflex[®], BASF Chemical Company) and other composed for polyvinyl alcohol (PVA) and polysaccharide cashew gum (PEJU). *T. asperellum* was induced to produce enzymes involved in the attack mycoparasite (*N*-acetylglucosaminidases, β -1,3-glucanases, chitinases and proteases) by the addition of crude chitin in the growth medium. The enzymes produced in major quantity were *N*-acetylglucosaminidase and chitinase. The “pool” of enzymes produced in the experiments was then used for immobilization tests. The immobilization process was performed in films by two methods: covalent and ionic bonding. In both methods, the presence of immobilized hydrolytic enzymes resulted in reduced growth of microorganisms, but the covalent immobilization of the results were more expressive. *S.sclerotiorum* was the microorganism most sensitive, followed by *A. niger* and *Penicillium* sp. To confirm the action of hydrolytic enzymes produced by *T. asperellum* and evaluate the effects they produce cell wall of microorganisms and other structures, the films with enzyme immobilized by covalent bonding were subjected to scanning electron microscopy. The structures most affected were hyphae and spores. Overall, the synergistic action of all enzymes produced by *T. asperellum*, reduced the growth of microorganisms when immobilized on the surface of the films Starch-Ecoflex[®] and PVA-PEJU. Moreover, the polymer blends tested exhibited desirable characteristics for future use in food packaging and most importantly, also provide efficient systems for the immobilization of enzymes.

Keywords: chitinolytic enzymes, immobilization, biocontrol, polymer blends

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Deterioração de alimentos pela ação de fungos	14
1.1.1 <i>Aspergillus niger</i>	16
1.1.2 <i>Penicillium</i> sp.	17
1.1.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
1.2 O gênero <i>Trichoderma</i>	19
1.2.1 A espécie <i>Trichoderma asperellum</i>	21
1.3 Quitina e enzimas quitinolíticas	22
1.4 Compostos organo-sintéticos biodegradáveis e antimicrobianos	25
1.5 Sistemas de imobilização de enzimas em embalagens	34
 2 JUSTIFICATIVA	 36
 3 OBJETIVOS	 37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
 4 MATERIAL E MÉTODOS	 38
4.1 Produção do filme PVA-PEJU	38
4.2 Análise das propriedades físicas e mecânicas do filme PVA-PEJU	38
4.3 Análise da biodegradabilidade do filme PVA-PEJU	39
4.4 Filme Amido-Ecoflex [®]	40
4.5 Microrganismos e condições de cultura	40
4.6 Produção de enzimas por <i>Trichoderma asperellum</i>	41
4.7 Cinética de produção e determinação da atividade enzimática	42
4.8 Ação das enzimas hidrolíticas de <i>Trichoderma asperellum</i> sobre o crescimento dos microrganismos em meio líquido	44
4.9 Condições de imobilização nos filmes Amido-Ecoflex [®] e PVA-PEJU	45
4.10 Determinação da atividade inibitória das enzimas produzidas por <i>Trichoderma asperellum</i> no crescimento dos microrganismos sobre os filmes	46
4.11 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes Amido-Ecoflex [®] e PVA-PEJU	46

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Propriedades físicas e mecânicas do filme PVA-PEJU	47
5.2 Biodegradabilidade do filme PVA-PEJU.....	49
5.3 Atividade de <i>T</i> -CWDE.....	50
5.4 Atividade inibitória de <i>T</i> -CWDE sobre o crescimento dos microrganismos em meio líquido	55
5.5 Imobilização de <i>T</i> -CWDE nos filmes Amido-Ecoflex [®] e PVA-PEJU	58
5.6 Crescimento dos microrganismos sobre os filmes Amido-Ecoflex [®] e PVA-PEJU	59
5.7 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes Amido-Ecoflex [®] e PVA-PEJU	60
 6 CONCLUSÕES.....	 66
 7 PERSPECTIVAS.....	 67
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 68
 9 APÊNDICES	 76
Apêndice 1. Análises Estatísticas (Teste t)	76

1 INTRODUÇÃO

A indústria de enzimas, tal como conhecemos hoje, é o resultado de um desenvolvimento rápido, visto principalmente nas últimas quatro décadas, graças à evolução da biotecnologia moderna. Para aplicações comerciais ou industriais, os microrganismos são as mais importantes fontes de enzimas. Isto porque a produção de enzimas a partir de microrganismos tem como vantagem o fato de poder ser controlada fisiológica e físico-quimicamente e, além disso, a quantidade de enzimas produzidas por microrganismos é muito mais elevada do que a produção por fontes vegetais e animais (IBRAHIM, 2008).

Enzimas encontradas na natureza, e de diversas fontes, têm sido utilizadas desde a antiguidade para a produção de produtos alimentares, tais como queijo, fermento, cerveja, vinho e vinagre e na fabricação de produtos como couro e linho (KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002). Atualmente, o uso de enzimas permite que processos industriais sejam realizados sob condições mais brandas, utilizando menos energia e produzindo menos subprodutos tóxicos (GHORAI et al., 2009).

Na indústria de embalagens, as exigências por um produto que atenda, ao mesmo tempo, às demandas de mercado e às condições de preservação ambiental abrem espaço para a utilização de enzimas também nesse campo. Nos últimos anos, tem se destacado o uso de agentes antimicrobianos em embalagens e as enzimas são fortes candidatas à utilização nesses processos. O uso de embalagens com agentes antimicrobianos tem como vantagem o fato de que menores teores de conservantes entram em contato direto com o produto, atendendo uma tendência atual do consumidor que é a busca por alimentos minimamente processados e livres de conservantes (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Em alguns casos, o uso direto de enzimas pode ser restringido por sua sensibilidade às condições de processamento e, ou, compostos que possam inibir sua ação, resultando em um “tempo de vida curto” para a ação enzimática. No entanto, esse problema tem sido superado, em alguns casos, pelo uso dos processos de imobilização, que conferem às enzimas maior estabilidade a variações de pH, temperatura, e outros agentes desnaturantes, assim como um ambiente adequado para seu uso repetido ou liberação controlada (KANDIMALLA, TRIPATHI e JU, 2006; LOPEZ-RUBIO, GAVARA e LAGARON, 2006).

Ainda há muito trabalho para o desenvolvimento de embalagens com enzimas antimicrobianas aplicadas, principalmente no que diz respeito à relação custo e resposta quando comparados a antimicrobianos sintéticos. No entanto, vale salientar que o uso de embalagens com agentes antimicrobianos naturais incorporados pode servir como um modelo de boas práticas sanitárias e de manejo ambiental (COOKSEY, 2001).

1.1 Deterioração de alimentos pela ação de fungos

Nas últimas décadas, a alimentação tem sido motivo de preocupação em todos os países. Um grande desafio é adequar a produção de alimentos à demanda crescente da população mundial, já que existem milhões de indivíduos famintos nos países subdesenvolvidos (BALBANI e BUTUGAN, 2001).

Com a globalização, ficaram mais evidentes os problemas relativos à qualidade dos alimentos para consumo humano. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem alertado para a necessidade de se coibir a contaminação de alimentos, uma vez que esses alimentos ainda podem chegar às vias de consumo e estão contaminados por agentes biológicos com potencial de causar danos à saúde (STACCIARINI, 1996).

A todo o momento somos bombardeados por informações que nos mostram pessoas famintas em todo o mundo. Simultaneamente, recebemos informações sobre a renda gerada pela produção de alimentos e números das exportações de grãos em países como o Brasil. Como se não fossem suficientes esses dados, a Fundação João Pinheiro (FJP) de Minas Gerais aponta em estudos realizados, que cerca de 15 milhões de toneladas de grãos da safra agrícola brasileira se perdem anualmente entre os processos de colheita, armazenamento e transporte.

A qualidade microbiológica dos alimentos depende de um grupo de fatores que vai desde o crescimento de microrganismos, que gera odores indesejáveis, mudança de cor, sabor e textura dos alimentos e a produção de toxinas que podem representar risco para a vida, até redução da vida útil de produtos comercializados. Existem muitos sistemas de prevenção de contaminação microbiológica que são usados pela indústria de alimentos, tais como análise de risco e controle dos pontos críticos (ARCP), procedimentos de saneamento operacionais padronizados (PSOP), boas práticas de fabricação (BPF) e várias inspeções (HAN, 2005).

Os fungos microscópicos e seus metabólitos, as micotoxinas, são frequentemente encontrados como contaminantes de produtos agrícolas e são classificados comumente em dois grupos: aqueles que atacam antes da colheita, chamados fungos de campo, e aqueles que só ocorrem após a colheita, chamados fungos de armazenamento (FAO, 1997). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* constituem fungos típicos no processo de armazenamento, embora sua ocorrência durante a colheita também seja possível. Espécies de *Fusarium* e *Sclerotinia* são representantes de fungos de campo e estão relacionados com aspectos climáticos, como umidade e frio (CONKOVA et al., 2006).

A ação fúngica na deterioração de alimentos em armazenamento torna-os impróprios para o consumo, diminuindo seu valor nutritivo e, na grande maioria das vezes, contaminando-os com as micotoxinas. A aflatoxina B1 e B2 e fumotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* são alguns exemplos de micotoxinas que causam prejuízo alimentar. Além disso, a presença de fungos contaminando alimentos gera um grande prejuízo econômico (MISHRA e DUBEY, 1994; NGUEFACK et al., 2004).

No caso dos grãos, as condições climáticas, especialmente temperatura e umidade, desempenham um papel muito importante no processo de deterioração, isso porque as mudanças climáticas afetam também os fungos, que passam a produzir micotoxinas em resposta ao estresse ambiental (CONKOVA et al., 2006). Como as micotoxinas são produzidas por uma grande variedade de microrganismos e cada um deles têm suas exigências ecológicas para sobrevivência, alterações de temperatura, umidade e precipitação são fatores que podem influenciar diretamente na contaminação dos alimentos (FAO, 2008).

Na agricultura e indústria de alimentos, os microrganismos têm seu crescimento geralmente controlado pelo uso de substâncias químicas sintéticas, no entanto, a maioria dos fungicidas e agentes antimicrobianos em uso pode criar vários efeitos secundários, como carcinogênese, teratogênese e toxicidade residual. Assim, alternativas biodegradáveis e naturais de controle químico devem ser levantadas para substituição do uso de sintéticos (CONKOVA et al., 2006; MISHRA e DUBEY, 1994).

1.1.1 *Aspergillus niger*

Espécies do gênero *Aspergillus* Thieg. (Eurotiales: Trichocomaceae), pertencentes à seção *Nigri*, conhecidos como *Aspegilli* negro, têm uma grande importância devido à sua capacidade de produzir enzimas e ácidos orgânicos. No entanto, essas espécies também podem produzir micotoxinas e, portanto, contaminar alimentos (GONZÁLEZ-SALGADO et al., 2005) (**Figura 1**).



Figura 1. Contaminação de embalagem de couve-flor por *Aspergillus niger*.

O gênero *Aspergillus* ocupa uma posição importante do ponto de vista da contaminação de alimentos por micotoxinas. Talvez a maioria dos fungos desse gênero habite o solo, mas o grupo está também associado à produção de compostos tóxicos, principalmente em grãos, como o milho. As duas micotoxinas de maior importância são a aflatoxina e ocratoxina A (GONZÁLEZ-SALGADO et al., 2005).

A aflatoxina (AF), produzida por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. wentii*, é uma substância cancerígena e genotóxica, amplamente encontrada em grãos de milho e amendoim, de todas as regiões dos trópicos e em quase todos os sistemas alimentares. Já a ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido tanto por espécies de *Aspergillus* quanto de *Penicillium*. OTA é uma nefrotoxina conhecida por sua ação imunossupressiva, genotóxica e teratogênica, classificada pela Agência Internacional de Pesquisas de Câncer (IARC), dentro dos 4 grupos relacionados à agentes carcinogênicos para humanos, como um possível carcinogênico humano do grupo 2, subgrupo B (o

agente ou a mistura é possivelmente carcinogênico para humanos; as circunstâncias da exposição impõem exposições em níveis que são possivelmente carcinogênicos para nossa espécie. Exemplos: acetaldeído, acrilonitrila, tetracloreto de carbono, hidrazina, nitrobenzeno). Somente dois *Aspergillus* da seção *Nigri* produzem OTA: *A. carbonarius* e *A. niger*, embora alguns estudos reportem *A. japonicus*. Esses fungos são comuns em produtos de plantas e em alimentos já processados (GONZÁLEZ-SALGADO et al., 2005).

1.1.2 *Penicillium* sp.

Penicillium (Eurotiales: Trichocomaceae) é um dos gêneros de fungo mais importantes industrialmente. Muitas espécies são utilizadas para a produção de medicamentos importantes, tais como a penicilina, enquanto outras são usadas em processos de fermentação na indústria de alimentos, como *Penicillium roqueforti*, *P. camembert* e *P. nalgiovense*. No entanto, muitas outras espécies podem causar deterioração dos alimentos e contaminação pela produção de micotoxinas (CLEMMENSEN et al., 2007) (**Figura 2**).



Figura 2. Contaminação de pão por *Penicillium* sp.

As principais micotoxinas produzidas pelo gênero são a roquefortina C, penitrem A-F e tromitem A e E. As espécies *P. roqueforti* e *P. carneum* produzem roquefortina C. Outras importantes espécies produtoras de micotoxinas são: *P. aurantiogriseum* (penitrem A, ácido penicílico, ácido micofenólico, xantomegnina e viomelina), *P. chrysogenum* (roquefortina C e ácido ciclopiazônico) e *P. expansum* (roquefortina C,

patulina e citrina). Em geral, essas substâncias são nefrotóxicas, hepatotóxicas, imunossupressoras, e/ou cancerígenas (RUNDBERGET, SKAAR e FLÅØYEN, 2004).

1.1.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary (Helotiales: Sclerotiniaceae) é um fungo ascomiceto, conhecido como mofo branco. É um patógeno altamente destrutivo de muitas culturas economicamente importantes, incluindo leguminosas (soja, ervilha e feijão) e sementes oleaginosas (canola e girassol). Esse patógeno apresenta pouca especificidade por hospedeiros, podendo atacar uma gama de mais de 400 plantas, principalmente dicotiledôneas (HEGEDUS e RIMMER, 2005) (**Figura 3**).



Figura 3. Contaminação de embalagem de vagem por *Sclerotinia sclerotiorum*.

A disseminação desse patógeno ocorre por meio dos esclerócios, que funcionam como estruturas de sobrevivência do microrganismo, e no solo podem resistir até três anos. O controle de *S. sclerotiorum* pode ser feito pelo uso de grandes rotações de culturas, aplicação de fungicidas, ou pelo controle biológico (BAE e KNUDSEN, 2007).

Alguns agentes de controle biológico (ACB) têm sido descritos para o controle de *S. sclerotiorum*. Antagonistas como *Ulocladium atrum* é efetivo no controle de *S.*

sclerotiorum por micoparasitismo; *Pseudomonas* sp. e *S. sclerotivorum* inibem a germinação de esporos por antibiose (ABDULLAH et al., 2008). No entanto, o controle biológico desse microrganismo tem sido realizado mais frequentemente e com grande sucesso por fungos do gênero *Trichoderma* (INBAR, MENENDEZ e CHET, 1996).

No caso de *S. sclerotiorum*, não há estudos que apontem para o risco de contaminação do homem e demais animais pelo consumo de alimentos infectados pelo fungo. A produção de enzimas pecnolíticas e celulolíticas por *S. sclerotiorum* causa uma situação comumente percebida pelo consumidor, a podridão dos alimentos, principalmente em leguminosas embaladas. A contaminação de alimentos por *S. sclerotiorum* no solo resulta em grandes perdas econômicas. Já a contaminação de alimentos embalados, além das perdas, provoca a rejeição do consumidor, o desperdício e consequentemente, o retorno deste patógeno ao ciclo ambiental, devido ao descarte destas embalagens no lixo doméstico.

É a excreção de ácido oxálico que parece ser determinante para a ação indesejada do patógeno sobre os alimentos no campo. Primeiro porque várias enzimas fúngicas secretadas durante a invasão de tecidos vegetais têm atividades máximas em pH ácido, e o oxaloacetato auxilia na modulação do pH apoplástico. Segundo, porque o oxaloacetato, em excesso, pode ser tóxico para as plantas hospedeiras, enfraquecendo a planta e facilitando a invasão. Ainda, a produção de ácido oxálico interfere na produção de ácido abscísico e desregula as células-guarda dos estômatos, provocando murcha das folhas. Finalmente, a quelação de Ca^{2+} da parede celular pelo ânion oxalato compromete as funções de defesa da planta dependentes da modulação por cálcio (CESSNA et al., 2000).

1.2 O gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae) pertencem à classe mitospórica, subclasse hifomiceto e ordem moniliales (HAWKSWORTH et al., 1995). São cosmopolitas e tipicamente vivem no solo ou em madeiras apodrecidas. Alguns deles são importantes economicamente devido à produção de enzimas industriais (celulases e hemicelulases), antibióticos e sua ação como agentes de controle biológico (KULLNIG-GRADINGER, SZAKACS e KUBICEK, 2002).

O sucesso de *Trichoderma* como agente de controle biológico deve-se à sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de sobreviver sob várias condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificar a rizosfera e forte agressividade contra fungos patogênicos (BENÍTEZ et al., 2004).

A atividade de biocontrole das espécies de *Trichoderma* inclui ações como o micoparasitismo, competição por espaço e recursos e antibiose. As enzimas hidrolíticas, produzidas por muitas espécies de *Trichoderma*, são tradicionalmente incluídas no conceito de micoparasitismo. Além disso, a habilidade em produzir metabólitos que ou impedem a germinação de esporos (fungistáticos), matam as células (antibiose), ou modificam a rizosfera, fazem de *Trichoderma* um gênero em potencial para o controle biológico de patógenos (BENÍTEZ et al., 2004).

A ação de biocontrole exercida por *Trichoderma* por micoparasitismo, que é o ataque direto de um fungo sobre outro, é um processo complexo que envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração no hospedeiro, causando a morte do mesmo. *Trichoderma* sp. pode exercer biocontrole direto, parasitando uma gama de fungos e espécies crescentes junto com ele. Isso se deve à expressão de enzimas hidrolíticas, que degradam a parede celular, como quitinases, glicanases e proteases. Estas enzimas agem de forma sinérgica, causando a lise da parede celular do hospedeiro (HARMAN et al., 2004; LIMA, 2002).

O micoparasitismo envolve mudanças morfológicas. *Trichoderma* ataca o patógeno pela interação de carboidratos da sua parede celular com lectinas da parede celular do patógeno. O passo seguinte consiste na produção de enzimas que degradam a parede celular e peptabólitos, que facilitam a entrada das hifas de *Trichoderma* no lúmen das hifas do fungo parasitado e assimilação do conteúdo da parede celular (BENÍTEZ et al., 2004).

Trichoderma sp. também pode ser induzido artificialmente a excretar enzimas hidrolíticas quando colocado em meio com presença de laminarina, quitina ou parede celular de outros fungos. Isso porque a adição destas substâncias como fonte de carbono, simula a presença do microrganismo competidor e induz *Trichoderma* a produzir enzimas que produziria em condições naturais de ataque, como é o caso das quitinases (DE LA CRUZ et al., 1992).

1.2.1 A espécie *Trichoderma asperellum*

Trichoderma asperellum é uma espécie ainda pouco estudada, mas como outras espécies, a exemplo de *T. harzianum*, apresenta atividade micoparasita relacionada à secreção de enzimas hidrolíticas. Lima (2002) em seu estudo com isolados de *Trichoderma* sp. do cerrado brasileiro caracterizou morfologicamente *T. asperellum* (T00) utilizando microscopia eletrônica e observou zonas de intensa conidiação, com conidióforos apresentando fiálides pareadas e relativamente ampuliformes, típicas desta espécie. Descreveu também conídios de aspecto verrugoso, de formato subglobuloso a ovóide.

A atividade micoparasita de *T. asperellum* foi avaliada inicialmente na inibição do crescimento de *Fusarium* sp. em culturas de tomate e na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani*. Bara (2002) demonstrou que *T. asperellum* (T00) quando cultivado na presença da parede celular de *R. solani* produz β -1,3-glicanase, que está envolvida na degradação de parede celular.

Em cultura de pepinos infectadas por *R. solani*, *T. asperellum* também produziu enzimas relacionadas ao micoparasitismo. Duas proteases, denominadas PAP A e PAP B foram secretadas durante a colonização. A análise da expressão dos genes demonstrou que PAP A é constitutiva e PAP B foi induzida à transcrição durante o confronto com *R. solani*, ou seja, PAP B relaciona-se com o micoparasitismo de *T. asperellum* contra *R. solani* (VITERBO, HAREL e CHET, 2004). Outros estudos de expressão de genes relacionados ao micoparasitismo também foram desenvolvidos. De quatro espécies de *Trichoderma*, incluindo *T. asperellum*, 8.160 “expressed sequence tags” (EST’s) de genes altamente expressos em condições relacionadas ao biocontrole já foram analisadas (VIZCAÍNO et al., 2007).

A produção de quitinases também é frequentemente relatada na ação micoparasita de *Trichoderma*. Viterbo et al. (2002) clonaram o gene *chit36* de *T. asperellum* e avaliaram sua expressão. A reação de PCR foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos baseados em sequências de quitinases de *T. harzianum*. Os estudos revelaram que a produção de quitinases em *T. asperellum* é regulada por fontes de carbono, nitrogênio, quitina e *N*-acetilglicosamina.

O Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG), tem grupos de pesquisa que investigam a

produção de enzimas por fungos do gênero *Trichoderma* e tem obtido grandes resultados. Pelo menos duas isoformas de β -1,3-glicanases, uma de 83,1 kDa (TAG 83) e outra com 19 kDa (TAG 19) produzidas por *T. asperellum* (T00) já foram isoladas e caracterizadas. Essas enzimas com atividade de β -1,3-glicanase foram produzidas pela cultura de *T. asperellum* em meio suplementado com parede celular de *R. solani*. A isoforma com massa molecular de 83,1 kDa (TAG 83) foi purificada e caracterizada por Bara, Lima e Ulhoa (2003). Já a outra enzima, com massa molecular de 19 kDa (TAG 19) foi caracterizada por Silva (2005).

Todos os estudos apontam para *T. asperellum* como agente em potencial para o biocontrole. No entanto, vários fatores devem ser considerados até que se chegue à utilização efetiva deste fungo no controle biológico. Um desses fatores é a linhagem de *Trichoderma*, já que a eficiência parece estar relacionada também à cepa utilizada (HERRERA-ESTRELA e CHET, 1998).

1.3 Quitina e enzimas quitinolíticas

A quitina é amplamente distribuída na natureza, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante, encontrado somente em menores concentrações que a celulose (PATIL, GHORMADE e DESPHANDE, 2000). É um homopolímero, de alta massa molecular composto por unidades de *N*-acetil-D-glicosamina (*N*-acetil-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose) (GlcNAc) ligadas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) (NAMPOOTHIRI et al., 2004) (**Figura 4**). Está presente em invertebrados marinhos (crustáceos) e insetos, fungos e algas. Sua importância vem aumentando significativamente por representar um recurso renovável e devido às suas propriedades biológicas, médicas e biotecnológicas (PIZA et al., 1999).

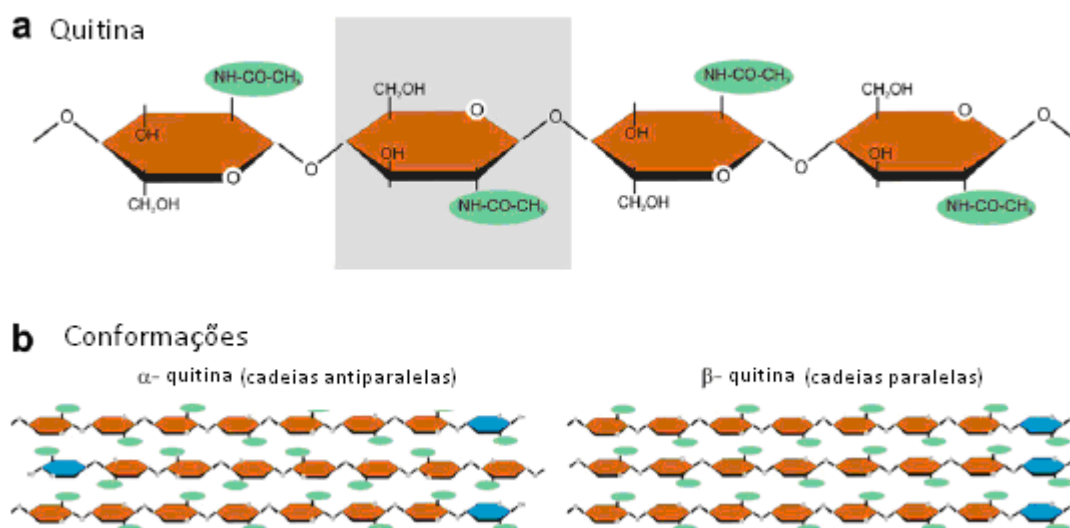


Figura 4. Quitina. (a) Estrutura química da quitina. A caixa em cinza representa uma subunidade de *N*-acetilglicosamina da cadeia de quitina. (b) Conformações estruturais da quitina: α -quitina, caracterizada por cadeias antiparalelas e β -quitina, cadeias paralelas (SEIDL, 2008).

A quitina é sintetizada pela ativação do precursor uridina difosfato *N*-acetil-D-glicosamina, pela enzima quitina sintetase. Estudos de difração de raios-X revelam que a quitina ocorre em três formas polimórficas, α -, β - e γ -quitina, que diferem no arranjo molecular. Na α -quitina, as cadeias estão arranjadas de forma antiparalela, na β -quitina, as cadeias são paralelas. Na γ -quitina, as cadeias estão misturadas. Baseado na similaridade das sequências, as enzimas quitinolíticas são agrupadas nas famílias 18, 19 e 20 das glicosil hidrolases (DAHIYA, TEWARI e HOONDAL, 2006).

Em fungos, a quantidade e a distribuição de quitina na parede são variáveis, fator que parece influenciar na regulação dos tipos de quitinases produzidas (ESCOTT, HEAM e ADAMS, 1998). De modo geral, os fungos produzem quitinases com papéis relacionados com a divisão celular, alguns processos morfogênicos em micélios, incluindo germinação de esporos, ramificação e autólise (ESCOTT, HEAM e ADAMS, 1998; GOODAY, ZHU e O'DONEL, 1992). Em meio de cultura, os fungos também secretam algumas enzimas hidrolíticas essenciais para seu metabolismo, como proteinases, quitinases, *N*-acetilglicosaminidases, lipases e fosfolipases. Estas enzimas podem atuar em processos como os de biossíntese e remodelação da parede, durante o crescimento e divisão celular (ADAMS, 2004; NOMBELA et al., 1998).

As quitinasas são enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de quitina. Enzimas quitinolíticas desempenham um papel chave nos processos de controle biológico, na indústria alimentícia, para produção de fatores de crescimento em plantas, edulcorantes, etc., e finalmente, para degradação de materiais ricos em quitina. A hidrólise completa de quitina à *N*-acetil-D-glicosamina livre é realizada por um sistema quitinolítico que envolve exoquitinasas e endoquitinasas.

Diferentes tipos de compostos contendo quitina têm sido usados para a produção de quitinasas, estes incluem parede celular de fungos, revestimento de caranguejos e camarões, assim como exoesqueletos de algumas espécies (NAMPOOTHIRI et al., 2004). As enzimas quitinolíticas são geralmente induzidas como um complexo multi-enzimático e são divididas em duas classes: **(1)** endoquitinasas (EC 3.2.1.14), que clivam a quitina aleatoriamente em sítios internos, gerando produtos de baixa massa molecular como quitotetroses, quitotriosos e diacetilquitobioses, e **(2)** exoquitinasas, divididas em duas subcategorias: **(2.1)** quitobiasas (EC 3.2.1.29), e **(2.2)** *N*-acetil- β -D-glicosaminidasas (EC 3.2.1.30), que clivam os produtos das endoquitinasas e quitobiasas, gerando monômeros de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) (DAHIYA, TEWARI e HOONDAL, 2006; SAHAI e MANOCHA, 1993) (**Figura 5**).

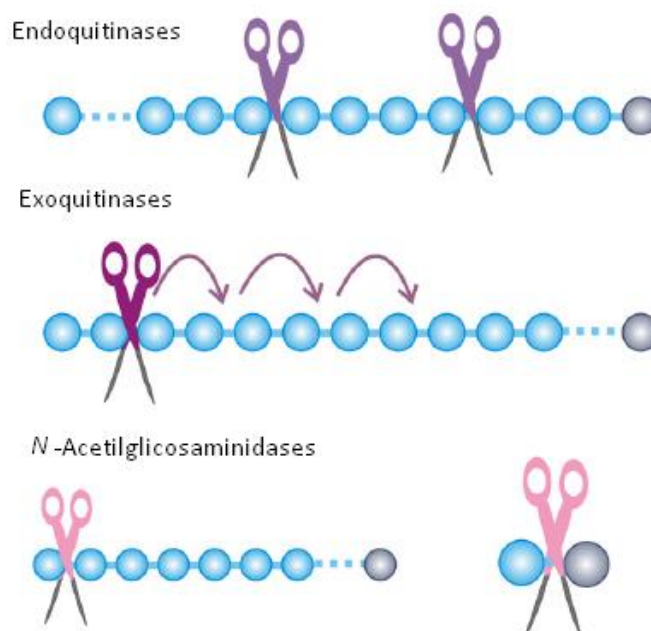


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de clivagem das enzimas quitinolíticas. As cadeias de quitina estão representadas em azul claro e a porção de açúcar redutor final em cinza. As linhas pontilhadas indicam que a cadeia é mais longa que o representado na figura (SEIDL, 2008).

A produção microbiológica de quitinases tem atraído a atenção de indústrias e laboratórios, não somente por causa do seu espectro de aplicações, como também pela lacuna existente com relação a métodos de produção efetiva. Como geralmente microrganismos são induzidos em meio natural à produção de quitinases, a produção artificial exige que fatores físicos, como aeração, pH e temperatura de incubação, além da composição do meio e escolha da fonte de carbono sejam cuidadosa e amplamente testados, a fim de se otimizar a produção (DAHYIA, 2006; SHAIKH e DESHPANDE, 1993).

1.4 Compostos organo-sintéticos biodegradáveis e antimicrobianos

O Brasil, com 200 milhões de habitantes, produz cerca de 240 mil toneladas de lixo por dia, número inferior ao produzido nos EUA (607 000 t/dia), que têm 300 milhões de habitantes, mas bem superior a países como a Indonésia (35 000 t/dia), que tem a mesma população. Desse total, a maior parte vai para os lixões a céu aberto. Apenas uma pequena porcentagem é descartada em locais apropriados. Uma cidade como São Paulo gasta por dia um milhão de reais com os processos que envolvem o lixo, desde a coleta, o transporte, a destinação e o tratamento. Para o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), são poucas as prefeituras do país que possuem equipes e políticas públicas específicas para o lixo (BASTIOLI, 2000).

No dia dois de agosto de 2010 foi sancionada a Lei nº 12.305 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos e altera itens da Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. A nova lei traz novidades como responsabilização das empresas pelo recolhimento de produtos descartáveis (logística reversa), estabelece a integração dos municípios na gestão dos resíduos e responsabiliza toda a sociedade pela geração do lixo. A lei ainda prevê a extinção dos lixões, que passam a ser proibidos e determina a criação de aterros para o lixo sem possibilidade de reaproveitamento ou de decomposição. As prefeituras terão um prazo de quatro anos para construir os aterros, sendo que para criação destes, cada prefeitura deve aprovar nas câmaras de vereadores uma lei municipal criando um sistema de reciclagem dos resíduos, sob a pena de não mais receberem subsídios financeiros do Governo Federal. Levando-se em consideração que em 2008 apenas 405 dos 5.564 municípios brasileiros faziam coleta seletiva, a produção de materiais biodegradáveis oferece uma solução interessante para reduzir o impacto ambiental do descarte de materiais plásticos (BRASIL, 2010).

Dentre os materiais biodegradáveis utilizados para a produção de bioplásticos, aqueles derivados por síntese, obtidos da indústria petroquímica por via sintética clássica, destacam-se os policaprolactonas (PCL), os poliésteraminas (PEA), os copoliéster alifáticos ou polibutileno succinato adipato (PBSA) e os copoliéster alifáticos co-trefilatos, como o co-polibutileno adipato tereftalato (PBAT). O PLC e o PEA são os polímeros que dominam o mercado, com exceção dos derivados de amido. Cerca de 85% a 90% do mercado é dominado por blendas e compósitos que em alguma proporção tiveram um composto organo-sintético (plástico) substituído por amido (AVÉROUS, 2002;GUILBERT, 2000). A **Figura 6** apresenta as diferentes famílias de biopolímeros com suas matérias primas.

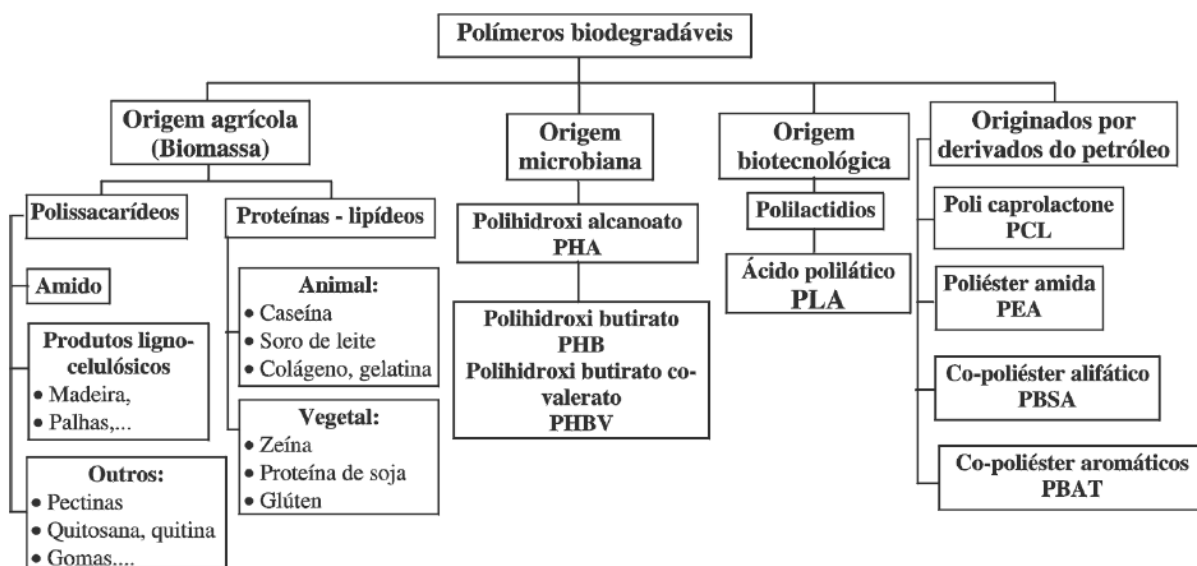


Figura 6. Diferentes famílias de polímeros biodegradáveis e suas matérias primas (AVÉROUS e BOQUILO, 2004).

Os polímeros sintéticos, que formam hidrogéis, e são mais comumente conhecidos por seu emprego na produção de materiais plásticos são poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), álcool polivinílico (PVA), poli(N-vinil-2-pirrolidono) (PNVP), poli(etileno glicol) (PEG), e seus copolímeros. O PVA é um polímero sintético hidrofílico. Suas propriedades básicas são dependentes do nível de polimerização ou hidrólise, o que permite várias aplicações, por exemplo, em adesivos, como emulsificante, na indústria têxtil e de papel e na obtenção de membranas para imobilização de enzimas. Mais recentemente, o PVA tem sido utilizado pela indústria farmacêutica para os sistemas de

“drug delivery”, devido as suas propriedades biodegradáveis e não-tóxicas (REIS et al., 2006).

Poliésteres alifáticos e aromáticos como polibutileno succinato (PBSu), polietileno succinato (PESu), polibutileno succinato co-adipato (PBSA) e co-polibutileno adipato tereftalato (PBAT) têm sido comercializados como material biodegradável devido ao custo relativamente baixo de sua produção, alta degradação ambiental e propriedades mecânicas semelhantes ao polietileno. Como exemplo disso, pode-se citar o PBAT (60% butileno adipato; 40% butileno tereftalato), que desde 1998 é comercializado sob o nome Ecoflex® (BASF Chemycal Company) e tem sido amplamente aplicado na agricultura e para embalagem de alimentos (**Figura 7**) (KASUYA et al., 2009).

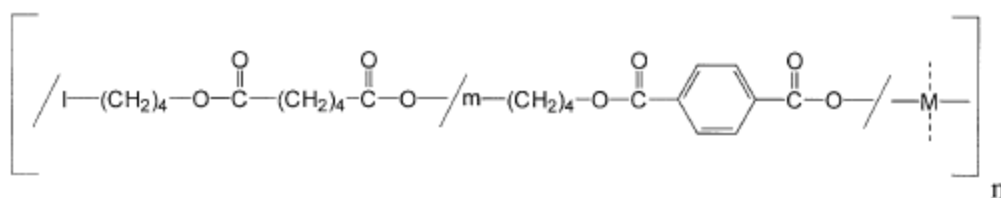


Figura 7. Estrutura química do poliéster co-polibutileno adipato tereftalato (PBAT) Ecoflex® (M = componentes modulares; e.g. monômeros com ramificação ou efeito de extensão da cadeia) (WITT et al., 2001).

De acordo com o fabricante (**Tabela 1**), o filme é um produto versátil e permite a fabricação desde filmes para embalar alimentos até artefatos termomoldados, injetados, soprados e extrusados. Possui ainda potencial para ser combinado ao papel como componente multilaminar, e ao amido e a outros polímeros biodegradáveis na formação de blendas poliméricas, além de ser resistente a gordura, umidade e variações de temperatura e devido a sua alta resistência a tensão (SHI, ITO e KIKUTANI, 2005; BASF, 2003).

Tabela 1. Propriedades do polímero poli-butileno adipato co-tereftalato (PBAT).

Propriedade	PBAT
Temperatura de fusão (° C)	100 - 120
Temperatura de transição vítrea (° C)	-30
Temperatura inicial de decomposição (° C)	280
Resistência máxima à tração (N/mm ²)	35 - 44
Alongamento (%)	560 - 710
Taxa de permeabilidade ao vapor de água (g.m ⁻² .d ⁻¹)	170
Densidade (g/cm ³)	1.2 - 1.5
Solubilidade em água	insolúvel

Fonte: BASF, 2003.

As especificações do uso de sistemas de embalagens do tipo Ecoflex[®] são ideais para frutos e hortaliças “in natura”, ou minimamente processadas, já que a porosidade e a permeabilidade ao vapor de água permitem que estes produtos continuem respirando mesmo depois de embalados (YAMASHITA et al., 2006). Yamashita et al. (2006) testaram, com alimentos, embalagens à base de amido do mandioca, em diferentes proporções, e Ecoflex[®]. As embalagens foram testadas para acondicionamento de acerolas. Os filmes foram tratados com propionato de cálcio [Ca(CH₃CH₂COOH)₂] como agente antimicrobiano e com permanganato de potássio (KMnO₄) como absorvedor de etileno. As acerolas foram conservadas por aproximadamente 10 dias, apresentando-se impróprias para consumo no 12º dia devido ao amadurecimento natural dos frutos. Não houve alterações sensoriais dos frutos e as embalagens com maior aceitação foram as mais transparentes.

Na agricultura, a utilização de plásticos (plasticultura) se estende por um amplo espectro de aplicações que vão desde o uso para produção vegetal, através da propagação de mudas, até processos como o de irrigação por gotejamento, formação de túneis no solo, montagem de estufas e sacos para silagem. O uso de plásticos no solo é comum pelas vantagens oferecidas, como **(i)** controle ou aumento da temperatura do solo; **(ii)** manutenção da umidade e estrutura do solo superficial; **(iii)** redução do tempo de germinação; **(iv)** diminuição do ataque de ervas daninhas e doenças; **(v)** otimização do uso de água e fertilizantes e, principalmente **(vi)** aumento do rendimento da produção

e qualidade do produto. No entanto, após a colheita, a maioria dos “bagaços” de plásticos remanescentes no solo não é reutilizável. Assim, os filmes biodegradáveis parecem ser uma solução promissora para o problema, já que para o produtor eliminam os gastos com remoção e eliminação dos “bagaços” e para os municípios diminuem a quantidade de resíduos que vão para os aterros (KIJCHAVENGKUL et al., 2008).

No solo, os mecanismos de degradação biológica podem se dar por dois processos: **(1)** fotodegradação e **(2)** biodegradação. Na fotodegradação, a exposição à radiação solar torna os resíduos de plástico no solo mais frágeis, o que leva à desintegração em pequenos flocos. Já a biodegradação, é o processo mais atuante que ocorre naturalmente pela ação de bactérias, fungos e algas do solo (KIJCHAVENGKUL et al., 2008).

Como PBAT já é amplamente utilizado como plástico biodegradável na agricultura e já foi testado em embalagens para alimentos, é importante identificar os microrganismos que podem degradá-lo. Kasuya et al. (2009) testou a ação de microrganismos do solo de três diferentes regiões do Japão na degradação de PBAT. Tiras estéreis do filme foram colocadas em meio líquido LB e adicionadas amostras de microrganismos do solo. A cultura foi avaliada por 150 dias, com intervalo de 5 em 5 dias. Os produtos da degradação de PBAT foram avaliados no sobrenadante das culturas por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massa por ionização eletrospray (LC/ESI-MS). Os resultados mostraram que após 124 dias 95% do conteúdo de PBAT havia sido mineralizado em dióxido de carbono. Vale lembrar que, na natureza, o tempo de degradação dos plásticos comuns é no mínimo de 100 anos, ou seja, 36.525 dias (RUTIAGA et al., 2005).

Outra classe de compostos que têm atraído grande atenção das indústrias de embalagens são os polímeros naturais. Estes constituem materiais muito importantes, não somente pelo fato de estarem prontamente disponíveis na natureza e serem renováveis, mas também devido a uma propriedade única, que é a capacidade de formação de géis. Entre os polímeros naturais, os polissacarídeos desempenham um papel muito importante, devido à capacidade de interação com outros compostos dispersos ou dissolvidos (formam uma rede de “baixa entalpia/baixa-entropia”), permitindo-lhes assim realizar funções biológicas vitais em associação com hormônios, lipídios, proteínas e outras moléculas. Como consequência, muitas aplicações são

previstas para as gomas, nas áreas médica, farmacêutica e da indústria química e de alimentos (PAULA, GOMES e DE PAULA, 2002; SILVA et al., 2010).

A goma de cajueiro (PEJU) é um exsudato da árvore *Anacardium occidentale* L., produtora do pseudofruto caju (resultado do crescimento do pedúnculo floral), cujas castanhas (fruto verdadeiro) são muito utilizadas na indústria de alimentos. A cultura do caju é muito importante economicamente em várias regiões do mundo, como no Brasil, Índia, Moçambique, Tanzânia e Quênia. A média de produção de goma anualmente pode chegar a 120 Kg/planta, o que faz da goma de cajueiro um objeto de estudos em potencial. No entanto, a goma até há pouco tempo quase não tinha aplicações no ramo industrial. Isso tem mudado com os recentes estudos realizados, principalmente no Brasil, onde o cajueiro é árvore abundante, principalmente nos estados nordestinos (SILVA et al., 2006).

Devido às propriedades que permitem a formação de filmes, a goma de cajueiro tem sido utilizada na indústria farmacêutica e de embalagens. Na indústria farmacêutica, o uso da goma de cajueiro é bem vista pelas suas propriedades anti-tumoral, antiparasitária e efeito cicatrizante. Além disso, o acesso é fácil, barato, e o polímero é biocompatível e biodegradável. Sendo assim, oferece muitas vantagens, principalmente para os estudos de sistemas de entrega, “drug delivery” (MONTEIRO et al., 2007). Já na indústria de embalagens, o uso de polissacarídeos na formação dos filmes tem como vantagem o fato de se formarem revestimentos incolor, com brilho aparente e baixo teor calórico, quando utilizados como revestimentos comestíveis. Dependendo do tratamento oferecido, podem evitar perdas, aumentando a vida útil do alimento, diminuindo a desidratação, evitando a rancidez oxidativa e o escurecimento superficial (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2009).

A composição de PEJU é de um heterocomplexo de cálcio, magnésio, potássio, sais de sódio e heteropolissacarídeos, com uma massa molecular média $M_w \approx 1.5 \times 10^4$, e índice de polidispersibilidade ≈ 1.49 , determinado por técnicas de cromatografia (BOTELHO, PARENTE e MOTHÉ, 1997 apud MOTHÉ e RAO, 1999). A goma tem uma estrutura altamente ramificada, constituída de cadeias β (1 $\rightarrow$ 3), de unidades de β -D-galactopiranosil, interpostas por ligações β (1 $\rightarrow$ 6). A hidrólise da goma de cajueiro resulta em 72-61% de galactose, 4,6-14% de arabinose, 14-8% de glicose, 3,2-7% de ramnose, 1% de manose e 4,7-5% de ácido glucurônico. Adicionalmente, a rede formada durante o processo de polimerização pode reter algumas proteínas (SILVA et

al., 2010). Uma propriedade particular e interessante deste material é a sua solubilidade em água, com baixa viscosidade e sua precipitação por solventes orgânicos polares, como o etanol (CARNEIRO-DA-CUNHA et al., 2009).

Devido à versatilidade das reações químicas possíveis de ocorrerem nos polissacarídeos, alguns estudos já apontam para a utilização destes como suportes para imobilização de enzimas. Além disso, a biodegradabilidade e biocompatibilidade dos polissacarídeos naturais são características importantes para diversas aplicações industriais (SILVA et al., 2010).

Como uma das restrições para a imobilização de enzimas em suportes insolúveis é a formação de duas fases, em que a enzima fica ligada na parte sólida, a solubilidade da goma de cajueiro em água, faz desse material um suporte muito atrativo para a imobilização de enzimas. Este é um sistema em que a recuperação da enzima imobilizada, após uma reação, pode ser feita por precipitação simples, com solventes orgânicos (SILVA et al., 2010).

Carneiro-da-Cunha et al. (2009) avaliaram as propriedades físicas de filmes e revestimentos comestíveis produzidos a base de PEJU. Os filmes foram produzidos com água, PEJU (1.5% e 3.0% p/v), sorbitol 0.4% (p/p) e Tween 80 (0.0% e 0.1% p/v). Os filmes foram avaliados quanto à espessura, tensão superficial crítica, molhabilidade, permeabilidade ao vapor de água, transparência e resistência à tensão e alongamento. Os resultados mostraram a presença de Tween 80 melhorou as propriedades do filme em todos os quesitos avaliados e que esse tipo de revestimento pode ser promissor para a indústria de alimentos.

Uma das propostas para a utilização de embalagens com antimicrobianos incorporados baseia-se no fato de que, na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial, daí a necessidade de um intenso contato entre a embalagem e o agente antimicrobiano. Vários compostos naturais e sintéticos têm tido seu potencial antimicrobiano analisado dentro deste conceito, a exemplo de íons metálicos, ácidos orgânicos, bacteriocinas e fungicidas, como os benzoatos e sorbatos. Polímeros com atividade antimicrobiana natural, como as quitosanas e as poliamidas, também estão sendo estudados (ÁLVAREZ, 2000; ASSIS e PESSOA, 2004) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Exemplos de agentes antimicrobianos potenciais para sistemas de embalagens de alimentos.

Classificação	Agente antimicrobiano
Ácidos orgânicos	Ácido acético, ácido benzóico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico, ácido propiônico, mistura de ácidos orgânicos
Sais ácidos	Sorbato de potássio, benzoato de sódio
Ácidos anidros	Anidro sórbico, anidro benzóico
Ácidos parabenzóicos	Propil parabeno, metil parabeno, etil parabeno
Álcool	Etanol
Bacteriocinas	Nisina, pediocina, lactina
Ácidos graxos	Ácido láurico, ácido palmitoléico
Ésteres de ácidos graxos	Glicerol mono-laurato
Agentes quelantes	EDTA, citrato, lactoferrina
Enzimas	Lisozima, lactoperoxidase, glicose oxidase
Metais	Prata, cobre, zinco
Antioxidantes	BHA, BHT, TBHQ, sais de ferro
Antibióticos	Natamicina
Fungicidas	Benomil, imazalil, dióxido sulfúrico
Gases	Ozônio, monóxido e dióxido de carbono
Agentes sanitizadores	Triclosan, NaCl acidificado
Polissacarídeos	Quitosana
Compostos fenólicos	Catequina, hidroquinonas
Extratos de plantas	Óleo de uva, de alecrim, de orégano, de manjerição, dentre outros
Probióticos	Ácido láctico bacteriano

Fonte: HAN, 2005.

Há duas categorias básicas de filmes antimicrobianos. Uma envolve a incorporação direta do agente antimicrobiano no filme, e no segundo tipo o filme é envolvido por um material que atua como carreador do antimicrobiano. Em ambos os casos, o contato direto entre a embalagem e o alimento é necessário para a eficiência do sistema. É importante que os filmes e revestimentos sejam formulados de modo a permitir a liberação controlada dos aditivos nos alimentos e a taxa de liberação é um fator dependente de características como o tipo de interação entre o agente antimicrobiano, o material de revestimento, o alvo (bactérias e fungos) e o próprio alimento a ser acondicionado (COOKSEY, 2001).

Um agente antimicrobiano ideal deve ser efetivo em um largo espectro e em baixas concentrações, não causar alterações nas características sensoriais do produto, ter um custo compatível e atender à legislação vigente. Os maiores desafios da tecnologia têm sido a estabilidade térmica, a eficácia em baixas temperaturas, o atendimento às exigências legais e o grau de alteração de propriedades físicas, mecânicas e de maquinabilidade dos filmes (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Os agentes antimicrobianos naturais incluem extratos de plantas, enzimas e bacteriocinas. No caso das enzimas, a especificidade deve ser analisada com cuidado, uma vez que a atividade antimicrobiana é muito sensível aos ambientes e substratos. Por exemplo, a atividade da lisozima pode ser significativamente afetada pela temperatura e pH. Na maioria dos casos, a lisozima não é eficaz contra bactérias gram-negativas. Isto se deve à parede celular de estrutura complexa das bactérias gram-negativas e da especificidade de lisozima para peptidoglicanas (JOEGER, 2007).

A forma de produção dos filmes antimicrobianos é ditada pelo seu uso, se for para ser ingerido juntamente com o alimento (coberturas comestíveis) ou se for para ser removido antes do consumo. Os tipos de filmes mais comumente produzidos e já em uso para embalagens alimentícias são os de polietileno (PE), etileno vinil álcool (EVA), álcool polivinílico (PVA) e nylon. Já a ligação dos agentes antimicrobianos às superfícies poliméricas tem sido realizada de diferentes formas, que vão desde as mais simples, como a imersão do polímero em soluções antimicrobianas, até técnicas mais sofisticadas em que as substâncias antimicrobianas são ligadas covalentemente à superfície do polímero. Neste caso, o agente ligante mais frequentemente utilizado é o glutaraldeído (JOEGER, 2007). A **Figura 8** ilustra as formas possíveis de sistemas de embalagem antimicrobiana.

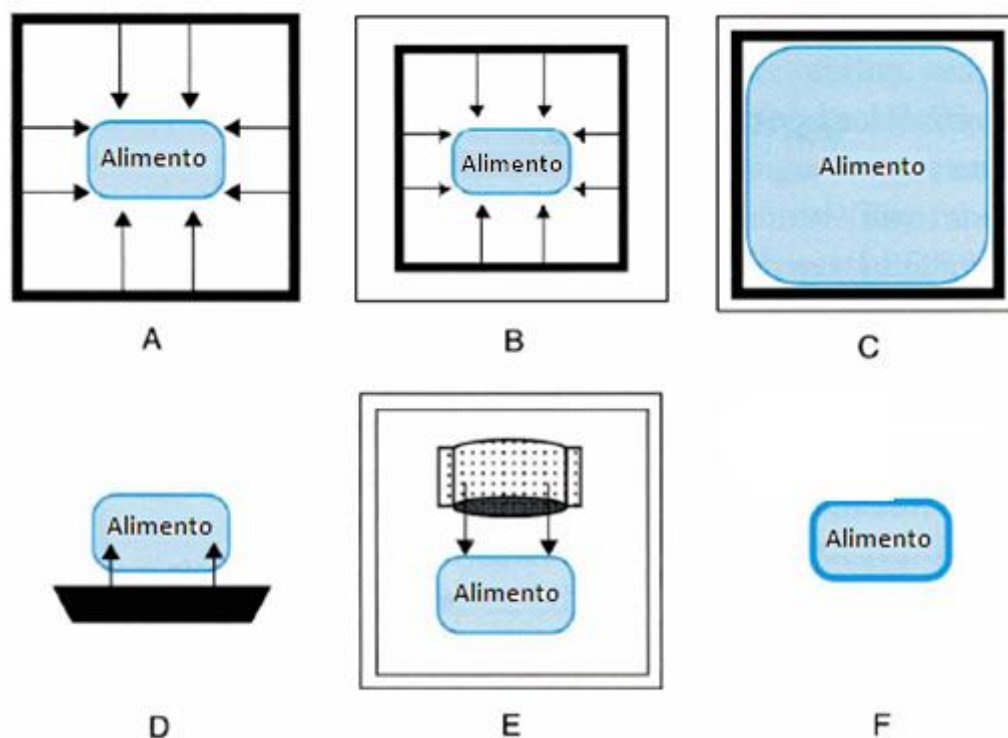


Figura 8. Possíveis formas de construção de sistemas de embalagens antimicrobianas para alimentos. (A) incorporação de materiais antimicrobianos na embalagem; (B) revestimento de embalagens convencionais com agentes antimicrobianos; (C) imobilização de agentes antimicrobianos em embalagens poliméricas; (D) uso de bandejas com antimicrobianos; (E) uso de saches/voláteis contendo agentes antimicrobianos; (F) revestimento comestível antimicrobiano (modificado de HAN, 2005).

1.5 Sistemas de imobilização de enzimas em embalagens

A imobilização de enzimas tem sido utilizada com sucesso em embalagens. Alguns exemplos de imobilização de agentes antimicrobianos por ligação iônica e covalente foram publicados desde a década de 80. Várias técnicas podem ser utilizadas para a produção de filmes para a imobilização de enzimas. Rudra, Dave e Haynie (2006) utilizando a técnica de montagem camada por camada [Layer-by-layer (LbL) assembly] obtiveram um filme antimicrobiano constituído por camadas negativamente carregadas de ácido poli (L-glutâmico) e camadas positivamente carregadas com lisozima. Os filmes foram capazes de inibir o crescimento de *Micrococcus luteus*. Em outro estudo, Caseli et al. (2007) imobilizaram com sucesso glicose oxidase em filmes de quitosana. A atividade da enzima imobilizada foi praticamente a mesma da enzima livre, confirmando a adequação da produção do filme e da imobilização.

Os sistemas de embalagens que utilizam antimicrobianos devem ser “desenhados” utilizando materiais capazes de gerar uma atmosfera antimicrobiana, onde os alimentos estariam livres da ação de microrganismos. Uma das formas de se garantir a eficácia desse sistema é a utilização dos métodos de imobilização. A imobilização por ligação covalente, por exemplo, liga os agentes antimicrobianos no material da embalagem e impede a migração desses agentes para o alimento (HAN, 2005).

A ligação iônica de antimicrobianos em polímeros permite a liberação lenta no contato com o alimento. No entanto, a difusão no produto é uma preocupação menor quando antimicrobianos são covalentemente ligados ao polímero. A imobilização por ligação covalente exige a presença de grupos funcionais compatíveis entre o polímero e a substância a ser imobilizada, ou a imobilização pode exigir o uso de espaçadores, que ligam o agente bioativo à superfície do polímero. Esse espaçador permite liberdade de movimentação da parte ativa do agente antimicrobiano, que pode entrar em contato com o microrganismo e evitar contato com a superfície do alimento. Esses espaçadores podem incluir dextranas, polietileno glicol (PEG), glutaraldeído, dentre outros (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

Para o desenvolvimento futuro dessa tecnologia para embalagens bioativas há ainda um amplo espectro de estudos a serem realizados, tais como avaliações combinando o revestimento das superfícies com material incorporado, desenvolvimento de superfícies funcionalizadas para ligação covalente, encapsulamento de antimicrobianos, e outros. Tais estudos demandam a participação de instituições de pesquisa e indústrias, e constituem a chave do sucesso para o desenvolvimento das embalagens antimicrobianas para produtos alimentares (APPENDINI e HOTCHKISS, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

O nível de desenvolvimento biotecnológico e agroindustrial do Brasil requer o desenvolvimento de processos que garantam a conservação de alimentos para abastecimento interno e para ampliação das exportações. Logo, o uso de enzimas para minimizar as perdas por ataque de microrganismos aos alimentos durante o armazenamento e transporte, atende não somente a essa expectativa, mas também é compatível com a preocupação mundial com questões ambientais, tendo em vista que minimiza impacto, no que diz respeito à degradação de polímeros, bem como na redução aos danos causados pelo uso de agentes de controle artificiais, como agrotóxicos.

O Laboratório de Química de Proteínas (LQP) reúne pesquisadores com ampla experiência na área de produção e imobilização de enzimas, desenvolvendo trabalhos relacionados com a prospecção de enzimas de solo e vegetação do Cerrado para uso em biosensores e processos de bioremediação, bem como a utilização de enzimas na área de alimentos e no desenvolvimento de filmes e compósitos. Além disso, os trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia da UFG abrangem a pesquisa, isolamento e identificação de microrganismos e aspectos relacionados à bioquímica, genética e biologia molecular da produção enzimática de fungos, especialmente do gênero *Trichoderma*. Assim, a experiência somada dos dois grupos de pesquisa tornou possível a realização deste trabalho.

Neste estudo foi testada a ação das enzimas hidrolíticas produzidas por *Trichoderma asperellum*, imobilizadas em filmes biodegradáveis, como agente inibidor do crescimento de microrganismos. A atividade inibitória foi testada sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, microrganismos geralmente relacionados com o ataque de alimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Visando contribuir para os estudos de *Trichoderma asperellum* como agente de controle biológico, propôs-se avaliar a atuação de enzimas hidrolíticas produzidas por este fungo, imobilizadas em filmes biodegradáveis, na inibição do crescimento de microrganismos.

3.2 Específicos

- Produção de enzimas hidrolíticas por *Trichoderma asperellum* (T00);
- Identificação das enzimas produzidas;
- Utilização de embalagens Amido-Ecoflex® na imobilização;
- Produção de um filme biodegradável a partir de goma de cajueiro (PEJU) e utilização na imobilização;
- Imobilização das enzimas do extrato enzimático nos filmes biodegradáveis;
- Avaliação de inibição de crescimento de *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* nos filmes biodegradáveis contendo enzimas imobilizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção do filme PVA-PEJU

Os filmes biodegradáveis produzidos a base de goma de cajueiro (PEJU) foram obtidos pela mistura de 20 mL do gel de PVA 3% (p/v), 30 g de PEJU e 2 mL de metaperiodato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (v/v), 2 mL de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (v/v) como catalisador, e 76 mL de água destilada, como solvente.

A mistura foi agitada em agitador magnético (Fisatom; Brasil) pelo tempo necessário para dissolução de todo material sólido. Para polimerização, foram colocados em placas de Petri 10 mL da solução, por 48 h, até a secagem. Após esse período o filme foi removido da placa e armazenado para uso nos experimentos de caracterização e imobilização. Os filmes foram armazenados à temperatura de aproximadamente 26°C , em de placas de Petri tampadas e vedadas com “Parafilm” (American National Can).

Para a produção do gel de álcool polivinílico (PVA) 3% (p/v), foram aquecidos 100 mL de água a 75°C . Logo em seguida foram adicionados 3 g de PVA. A solução ficou sob agitação até a homogeneização e foi utilizada para produção dos filmes.

4.2 Análise das propriedades físicas e mecânicas do filme PVA-PEJU

Os experimentos de caracterização do filme PVA-PEJU foram realizados no Laboratório de Tecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e no Laboratório de Química de Proteínas da UFG.

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro manual (Mitutoyo Sul Americana; Brasil). A espessura final foi fixada como sendo a média aritmética de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme.

Para a determinação da solubilidade do filme em água, seguiu-se a metodologia proposta por Gontard, Guilbert e Cuq (1992) e utilizada por Yamashita et al. (2005). Primeiramente, determinou-se a porcentagem inicial de matéria seca dos filmes em estufa a 105°C por 24 h. Em seguida, foram cortados dois discos de cada filme seco, com 2 cm de diâmetro, que foram pesados, imersos em 50 mL de água destilada e mantidos sob agitação constante por 24 h. Após este período, cada solução foi filtrada e o material retido foi seco em estufa a 105°C por 24 h e pesado (Balança Kern 410;

Brasil), determinando-se a quantidade de matéria seca não solubilizada. A solubilidade do filme foi expressa em porcentagem de massa solubilizada em relação à massa inicial. As análises foram realizadas em triplicata.

Para os testes de tração seguiu-se a norma ASTM D638M-93 (1995). Os corpos de prova foram cortados nas dimensões de 40 mm de comprimento e 20 mm de largura e ajustados às garras pneumáticas do equipamento. Foram realizadas 5 análises para cada amostra. A distância inicial entre as garras foi de 25 mm e a velocidade de tração de 500 mm min⁻¹. As propriedades de tração determinadas foram: resistência máxima à tração na ruptura (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa).

A resistência à tração na ruptura correspondeu à resistência máxima oferecida pelo corpo de prova no ponto de ruptura e foi obtido pela reação entre a força obtida no ponto de ruptura e a área do contato do filme.

O alongamento correspondeu à relação entre o comprimento do corpo de prova no ponto de ruptura e seu comprimento inicial, quando este foi submetido à tração. O módulo elástico (módulo Young) foi determinado pela relação entre a força e o alongamento da amostra.

4.3 Análise da biodegradabilidade do filme PVA-PEJU

Amostras do filme foram cortadas (30 x 100 mm), acondicionadas a temperatura ambiente ($\approx 26^\circ \text{C}$) por 1 h e pesadas em balança analítica (Kern 410; Brasil). Posteriormente, as amostras foram enterradas em solo proveniente da região da Universidade Federal de Goiás, misturado à terra orgânica comercial (Terra Forte - Osasco), na proporção 50:50, em bandeja plástica. A cada 15 dias, as amostras eram retiradas do solo, lavadas com água corrente e esponja macia para retirada dos resíduos, secas a temperatura ambiente e então pesadas. Para avaliação da perda de massa, o resultado obtido da massa da amostra foi comparado com a massa da amostra inicial (**Equação 1**). As análises foram realizadas em triplicata.

$$\%M_b = \frac{M_f}{M_i} \times 100$$

Equação 1. Cálculo da biodegradabilidade do filme PVA-PEJU. Onde M_b corresponde à massa biodegradada, M_f à massa final e M_i à massa inicial.

4.4 Filme Amido-Ecoflex[®]

Os filmes Amido-Ecoflex[®] foram produzidos previamente pela equipe do Professor Fábio Yamashita, na Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os filmes utilizados foram produzidos pela mistura de fécula de mandioca e poli-butileno adipato co-tereftalato (PBAT) (Ecoflex[®], BASF Chemical Company) por extrusão, na proporção 60:40.

Quanto às propriedades físicas, mecânicas e biodegradabilidade destes filmes, estas foram apresentadas inicialmente em trabalho realizado por Yamashita et al. (2005) e posteriormente, por Scapim (2009) Os resultados obtidos pelas análises estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Espessura, solubilidade, propriedades mecânicas e biodegradabilidade dos filmes Amido-Ecoflex[®].

Espessura (μm)	Solubilidade (%)	Tração (MPa)	Alongamento (%)	Biodegradabilidade (150 dias)
$\approx 110 \pm 4,0$	$82 \pm 6,0$	$13,85 \pm 10,0$	$620 \pm 80,0$	70%

4.5 Microrganismos e condições de cultura

Os microrganismos utilizados foram *Trichoderma asperellum* (T00), para produzir as enzimas e *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*, por serem agentes contaminantes de alimentos em embalagens ou no solo.

T. asperellum (T00) foi obtido da coleção do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás (UFG) e mantido durante todo o período da realização dos experimentos em meio sólido BDA [glicose 2,0% (p/v); ágar 1,5% (p/v); caldo de batata 20% (v/v)] e em meio líquido TLE [peptona 0,1% (p/v); uréia 0,03% (p/v); KH_2PO_4 0,2% (p/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 % (p/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 % (p/v); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 % (p/v); glicose 0,5% (p/v); solução de elementos traços 0,01 % (v/v)]. Para

manutenção em meio líquido, os esporos de *T. asperellum* ($1,0 \times 10^7$ esporos mL⁻¹) retirados do meio BDA com o uso de solução salina 0,9% (p/v) e contados em câmara de Neubauer, foram inoculados em 250 mL de meio TLE, em Erlenmeyers de 1000 mL e mantidos em *shaker* rotatório a 180 rpm, a 28° C, por 72 h. *T. asperellum* foi mantido em placas de Petri, em meio BDA, a temperatura ambiente ($\approx 26^\circ$ C), com repiques ocorrendo em intervalos de 12 dias.

As culturas de *Penicillium* sp. foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). *A. niger* e *S. sclerotiorum* foram obtidos de culturas da coleção do Laboratório de Enzimologia da UFG. Estes três microrganismos foram mantidos durante todo o período dos experimentos em meio sólido BDA, em placas de Petri, a temperatura ambiente ($\approx 26^\circ$ C), com repiques ocorrendo em intervalos de 12 dias.

4.6 Produção de enzimas por *Trichoderma asperellum*

Os micélios de *T. asperellum*, retirados do meio BDA com solução salina 0,9% (p/v) foram separados, e os esporos contados em câmara de Neubauer. Após a contagem, foram transferidos para Erlenmeyers de 1000 mL, 2,5 mL da solução de esporos, contendo 250 mL de meio TLE modificado TLE [peptona 0,1% (p/v); uréia 0,03% (p/v); KH₂PO₄ 0,2% (p/v); (NH₄)₂SO₄ 0,14 % (p/v); MgSO₄•7H₂O 0,03 % (p/v); CaCl₂•2H₂O 0,02 % (p/v); glicose 0,1% (p/v); quitina bruta 0,5% (p/v); solução de elementos traços 0,01 % (v/v)]. O meio de cultura foi incubado em *shaker* rotatório (Weiss-Gallenkamp; Reino Unido) a 180 rpm e 28° C, por 5 dias. Após o período de crescimento, o conteúdo líquido do meio foi submetido à filtração, em filtro Whatman n° 1. O filtrado da cultura contendo as enzimas foi concentrado por liofilização (Liofilizador Enterprise I - TERRONI; Brasil) sob as seguintes condições: pressão da bomba de vácuo variando entre 250 e 300 μ Hg, temperatura entre -44 a -40° C e tempo aproximado de 8 h para cada tubo Falcon. Os tubos com o filtrado enzimático liofilizado foram estocados em *freezer*, a -20° C, para utilização nos experimentos de imobilização, e o conteúdo obtido foi denominado T-CWDE (“*Trichoderma* cell wall-degrading enzymes”).

Antes da realização dos experimentos de imobilização a atividade de quitinase do extrato enzimático foi dosada, a fim de garantir que a estocagem e as condições de

manuseio não interferiram na atividade enzimática. O tempo máximo de estocagem foi de 3 meses.

4.7 Cinética de produção e determinação da atividade enzimática

Para avaliar a cinética de produção enzimática de *T. asperellum* em meio TLE modificado, as culturas foram mantidas durante 10 dias em *shaker* rotatório (Weiss-Gallenkamp; Reino Unido), a 180 rpm e 28° C. A cada dia, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas da cultura e as atividades enzimáticas dosadas, a fim de se obter uma curva com a cinética de produção de cada enzima.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA; Sigma) como padrão. Para cada ensaio, foram utilizados 100 µL da amostra para 5,0 mL do reativo de Bradford, com um tempo de incubação de 10 min. Finalizado o tempo de reação a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SP 2000 UV - BEL Photonics; Itália) no comprimento de onda de 595 nm.

A atividade de *N*-acetilglicosaminidase foi analisada pelo monitoramento da taxa de formação de *p*-nitrofenol, pela reação da enzima com *p*-nitrofenol-*N*-acetilglicosamina 5 mmol L⁻¹ (PNP-NAG; Sigma) (YABUKI et al., 1986). Amostras de 50 µL do extrato enzimático foram adicionadas a 100 µL de PNP-NAG e 350 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0 e incubados a 37° C, por 15 min. A reação foi paralisada com a adição de 1,0 mL de carbonato de sódio 0,5 mol L⁻¹. A concentração de PNP liberada foi determinada por leitura em espectrofotômetro, a 450 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de PNP min⁻¹, a 37° C.

A atividade de β-1,3-glicanase foi analisada como descrito por Noronha e Ulhoa (2000) em reação contendo laminarina (Sigma) como substrato. Amostras de 50 µL do extrato enzimático foram incubadas com 100 µL de laminarina 0,25% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0 e incubadas a 40° C por 60 min. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e ferveu-se por 5 min. A concentração de açúcar redutor foi determinada espectrofotometricamente a 550 nm, de acordo com Bara, Lima e Ulhoa (2003). Uma unidade de β-1,3-glicanase (U) foi

definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de açúcar redutor min^{-1} , sob as condições descritas acima.

A atividade de quitinase, livre e imobilizada, foi determinada utilizando-se quitina coloidal como substrato, preparada segundo metodologia de Berger e Reynolds (1958), com modificações (MOLANO, DURAM e CABIB, 1997). Em banho de gelo, 10 g de quitina bruta (Sigma) foram suspensas em 250 mL de HCl e a mistura deixada sob agitação por 4 h. O colóide foi filtrado em lã de vidro e lavado com 250 mL de etanol gelado e precipitado em geladeira a 4° C, *overnight*. O precipitado foi separado por centrifugação (Centrífuga Quimis - AAKER; Brasil) a 5000 rpm por 10 min, e então lavado com água destilada para remoção do excesso de ácido. O colóide obtido foi liofilizado sob as seguintes condições: pressão da bomba de vácuo variando entre 250 e 300 μHg , temperatura entre -44 a -40° C e tempo aproximado de 8 h. Logo em seguida, os tubos foram estocados em *freezer* a -20° C. A resuspensão do colóide para uso nas reações, foi feita com o uso de 0,75 g de quitina coloidal em 150 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0.

A atividade de quitinase foi analisada pela incubação com DMAB (p-dimetilaminobenzaldeído). Para a reação, 500 μL da solução de quitina coloidal, foram incubados com 500 μL do extrato de enzimas e incubados por 12 h, a 37° C. A mistura foi centrifugada (Centrífuga 5417R - Eppendorf; Brasil) a 4000 rpm, por 5 min, sendo retirados 250 μL da amostra e acrescentados 50 μL de tetraborato de potássio 0,3 mol L^{-1} . Depois de fervido por 3 min, foram acrescentados 1,5 mL de DMAB e a amostra incubada a 37° C, por 10 min. A leitura foi realizada a 587 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor em 1 h, a 37° C.

A atividade de protease foi determinada pela incubação de 100 μL do extrato enzimático com 900 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 e 1,0 mL de solução de caseína 1% (p/v) preparada em tampão fosfato de sódio, a 37° C, por 20 min. A reação foi finalizada pela adição de 3,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v). Depois de centrifugação a 5000 rpm, o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro, a 280 nm (ARNON, 1970). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma elevação de 0,1 na densidade óptica (DO), após 10 min.

A atividade amilolítica foi determinada por dois métodos diferentes. O primeiro denominado de atividade dextrinizante, baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (FUWA, 1954) e foi realizado tendo como substrato da reação o amido do filme Amido-Ecoflex[®]. Para esse ensaio, tiras do filme (4,0 X 0,5 cm; $\approx$ 150 μ m de espessura) foram colocadas em tubos de ensaio com 100 mL de água destilada e 100 μ L de amilase comercial (Sigma). Os filmes foram avaliados por 5 dias. A cada dia, as tiras retiradas da solução eram secas sob luz e ventilação natural, coradas com o reativo de Fuwa e então analisadas e fotografadas em microscópio óptico. As microscopias foram realizadas no Laboratório Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC - GO).

O segundo método, denominado de método sacarificante, baseia-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). Para dosagem da atividade amilolítica sacarificante, 80 μ L de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, foram adicionados 20 μ L de amostra enzimática e 100 μ L de solução de amido (0,5%). A mistura foi incubada a 50° C por aproximadamente 12 h. Após este tempo, 100 μ L da mistura de reação foram coletadas e adicionadas em tubo de ensaio contendo 1,0 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). A mistura foi fervida por 5 min em banho-maria a 96° C e a absorbância determinada a 550 nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.8 Ação das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum* sobre o crescimento dos microrganismos em meio líquido

Para verificar a atividade inibitória de T-CWDE sobre o crescimento dos microrganismos, *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* cresceram em meio líquido suplementado com duas diferentes concentrações de enzima: 0,1% e 0,5% (p/v). Foram colocados 20 μ L de solução de esporos (1×10^7 esporos) de *A. niger* e *Penicillium* sp. em tubos de ensaio com 2,0 mL de meio líquido Sabouraud [glicose 4,0 % (p/v); peptona 1,0 % (p/v); CuSO₄ 1,0 % (p/v)]complementado com 0,002g/0,01g de T-CWDE e agitados em *shaker* rotatório, a 180 rpm, a 28° C, por 24 h. Para *S.*

sclerotiorum, “plugs” com DO 0,15 (leitura a 600 nm) foram colocados em meio líquido BA [glicose 2,0 % (p/v); caldo de batata 20 % (p/v)], complementado com 0,002g/0,005g de *T*-CWDE e colocados em *shaker* rotatório, sob as mesmas condições descritas.

As amostras foram coletadas de 2 em 2 h, durante as primeiras 12 h, com a última amostra coletada após 24 h. A curva de crescimento foi obtida pela medida do peso seco das amostras. No controle, as culturas de microrganismos cresceram nos respectivos meios líquidos, sem adição de enzimas.

Para determinação do peso seco, os tubos de ensaio contendo meio de cultura foram autoclavados, secos em estufa a 170° C e pesados (Balança Bioprecisa JH 2102; Brasil), sendo descontado o peso médio dos tubos de ensaio.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Condições de imobilização nos filmes Amido-Ecoflex[®] e PVA-PEJU

Os experimentos de imobilização foram conduzidos por dois procedimentos: imobilização por adsorção e imobilização por ligação covalente, para os dois filmes, sob as mesmas condições. Por adsorção, tiras do filme Amido-Ecoflex[®] (4,0 X 0,5 cm; ≈150 µm de espessura) e PVA-PEJU (4,0 X 0,5 cm; ≈100 µm de espessura) foram imersas em uma solução de *T*-CWDE 0,1% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 5,0, por 30 min, a temperatura ambiente (≈ 26° C). Na imobilização por ligação covalente, as tiras dos filmes foram tratadas previamente pela imersão em solução de metaperiodato de sódio 0,1 mol L⁻¹, por 30 min, e em seguida, lavadas com água destilada e colocadas na solução de enzima 0,1%, por 30 min, a temperatura ambiente. Os controles foram realizados com tiras dos filmes que não receberam nenhum tratamento e fitas tratadas por imersão em solução de metaperiodato de sódio 0,1 mol L⁻¹ por 30 min, lavadas e em seguida, colocadas em solução de glicina 0,1 mol L⁻¹.

Para verificar a atividade das enzimas imobilizadas nos filmes, tiras de 0,25 cm² submetidas às condições de imobilização descritas acima, foram analisadas com relação à quantidade de proteínas totais e atividade de quitinase, de acordo com o **item 4.7**.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10 Determinação da atividade inibitória das enzimas produzidas por *Trichoderma asperellum* no crescimento dos microrganismos sobre os filmes

Para verificar a atividade inibitória do extrato enzimático produzido por *T. asperellum* no crescimento dos microrganismos, *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* foram inoculados sobre os filmes biodegradáveis. As tiras dos filmes, depois de tratadas de acordo com as condições de imobilização (**item 4.9**), foram colocadas, por 15 min, em luz ultravioleta (UV) e, em seguida em placas de Petri, sobre meio BDA. Foram adicionados 20 µL de solução de esporos (1×10^7 esporos) de *A. niger* e *Penicillium* sp. e plugs de *S. sclerotiorum* (DO 0.15) sobre as tiras, nas placas de Petri. O crescimento dos microrganismos foi avaliado por 4 dias, em incubação, a 37° C. Os resultados foram fotografados.

4.11 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU

Por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram analisadas 14 amostras dos filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília (UnB) (Microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F; Japão). Os filmes foram analisados quanto a sua estrutura. Também foi avaliado o crescimento dos microrganismos *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. Sclerotiorum* sobre os filmes sem imobilização enzimática (controle) e filmes com enzimas imobilizadas por ligação covalente (**item 4.10**).

As amostras foram desidratadas naturalmente sob fonte de luz. Amostras dos filmes contendo microrganismos foram primeiramente expostas à luz UV e posteriormente acondicionadas ao abrigo da luz. Os filmes foram armazenados por 7 dias, em temperatura ambiente, em embalagens fechadas, até a análise. Para obtenção das micrografias, as amostras foram acondicionadas em suportes de alumínio (stubs) e revestidas com ouro em metalizador (Metalizador Balzers - SCD 050 Baltec; Áustria), a 21° C, em $2,6 \times 10^7$ Pa, por 180 s. Após o revestimento com ouro, as amostras foram analisadas a 15 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades físicas e mecânicas do filme PVA-PEJU

Inicialmente, para produção dos filmes, foi testado apenas o sistema PVA-PEJU, com ácido sulfúrico como catalisador da reação. No entanto, nos testes de solubilidade a blenda formada, apresentou-se instável na presença de água e umidade, devido provavelmente, à higroscopicidade e hidrofobicidade dos dois polímeros.

Na tentativa de se produzir um filme com maior estabilidade às condições de umidade, foram realizados testes com a adição de metaperiodato de sódio na produção de filmes a base de PVA e PEJU. Isso porque o metaperiodato de sódio reage com hidroxilas vicinais da cadeia de PVA, gerando grupos reativos, que se tornam pontos de interligação com a cadeia polissacarídica do PEJU, seja através do grupo amido-açúcar, seja pela presença de outros grupos na cadeia polissacarídica, desde que sejam capazes de reagir com as carbonilas. Uma estrutura possível para a blenda polimérica produzida está apresentada na **Figura 9**.

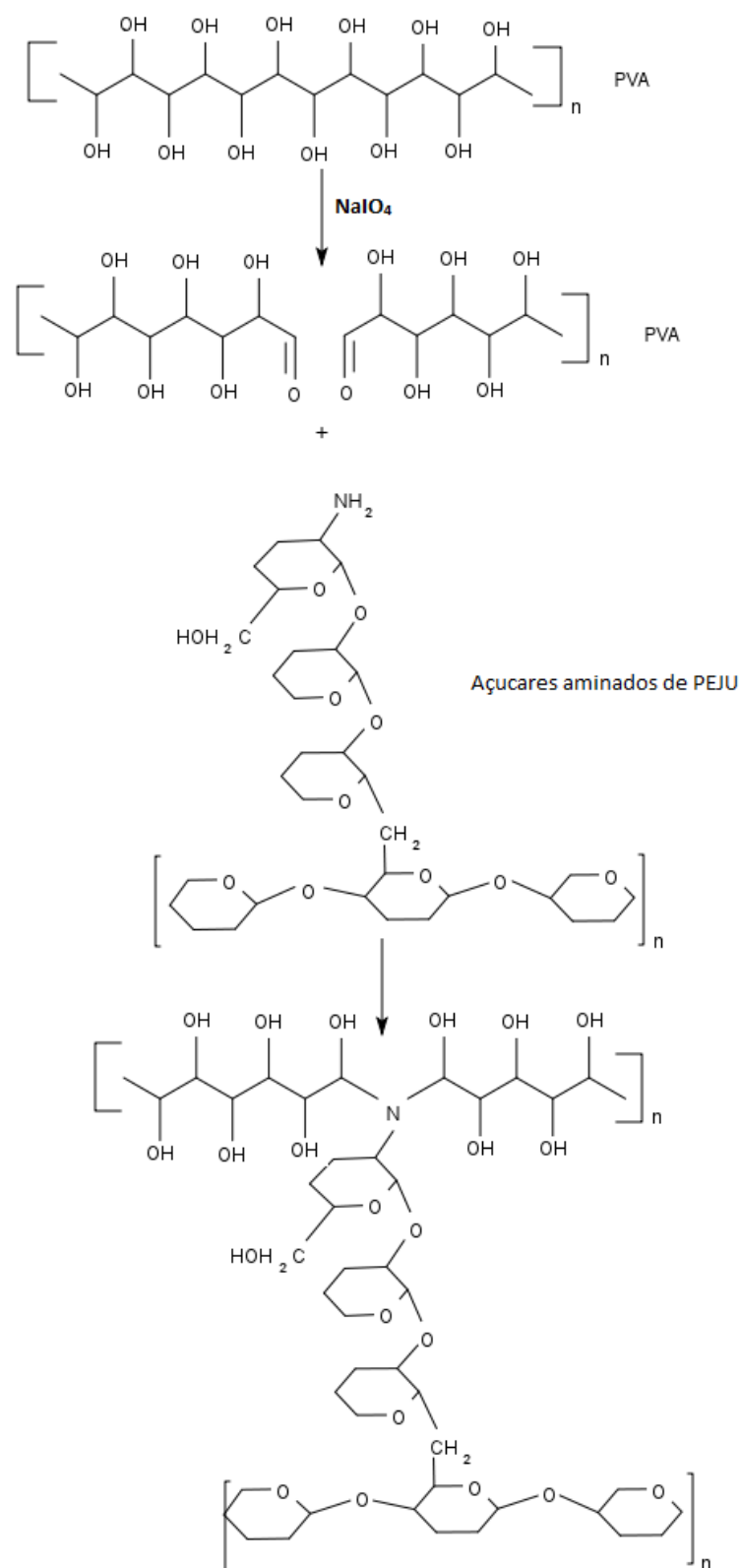


Figura 9. Reação entre as cadeias de PVA e PEJU na presença de metaperiodato de sódio. A abertura da cadeia de cadeia de PVA pela ação do metaperiodato gera extremidades que se ligam a açúcares aminados (resíduos de N-acetilglicosamina) do PEJU. A ação do metaperiodato de sódio promove o adesivamento das cadeias (esquema proposto).

O conteúdo de PEJU utilizado para a produção dos filmes foi de 3% (p/v). De acordo com Carneiro-da-Cunha et al. (2009), um conteúdo de PEJU inferior a 1,5% torna os filmes produzidos muito frágeis. As blendas apresentaram boa flexibilidade e foram facilmente removidas das placas de Petri, onde o conteúdo foi depositado para polimerização.

A adição de metaperiodato de sódio como “crosslinker” garantiu a estabilidade dos filmes na presença de água, ou umidade. Os filmes PVA-PEJU apresentaram uma solubilidade de 68%, em 24 h (**Tabela 4**), característica desejável para filmes biodegradáveis e relacionada à concentração de polissacarídeos. Segundo Yamashita et al. (2005), quanto maior a concentração de amido, maior a solubilidade do filme. Essa característica pode ser explicada, pelo provável aumento da quantidade de grupamentos hidroxila na matriz do filme e, de acordo com McHugh e Krochta (1994), quanto maior a presença de grupamentos hidroxila em matrizes poliméricas polares, maior a formação de ligações de hidrogênio com a água, o que resulta em maior solubilidade.

Os valores obtidos para solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes PVA-PEJU estão de acordo com aqueles de outros filmes à base de polissacarídeos (**Tabela 4**). Casariego et al. (2009), na produção de filmes a partir de quitosana 1% (v/v), obtiveram valores de resistência à tração de 10 MPa e 14% para alongamento. Lee et al. (2007) verificaram, em filmes de amido/PVA com glicerol 30% (v/v) resistência à tração de 10 MPa e alongamento de 60%. Filmes a base de gelatina, com espessura de 170 μm , apresentaram solubilidade variando de 40,4 a 44,5% de matéria seca (SAKANAKA, 2002).

Tabela 4. Espessura, solubilidade e propriedades mecânicas dos filmes PVA-PEJU.

Espessura (μm)	Solubilidade (%)	Tração (MPa)	Módulo Young (MPa)	Alongamento (%)
$\approx 170 \pm 2,07$	$68 \pm 3,24$	$23,69 \pm 2,79$	$13,09 \pm 2,09$	$187,2 \pm 9,26$

5.2 Biodegradabilidade do filme PVA-PEJU

Nos testes de biodegradação para os filmes PVA-PEJU, a perda de massa esteve relacionada ao tempo em que os filmes ficaram enterrados (**Figura 10**). Após 90 dias, a perda de massa chegou a 52%. Após esse tempo, não foi possível avaliar a perda de

massa dos filmes devido ao efeito da floculação pela ação de degradação enzimática dos microrganismos do solo.

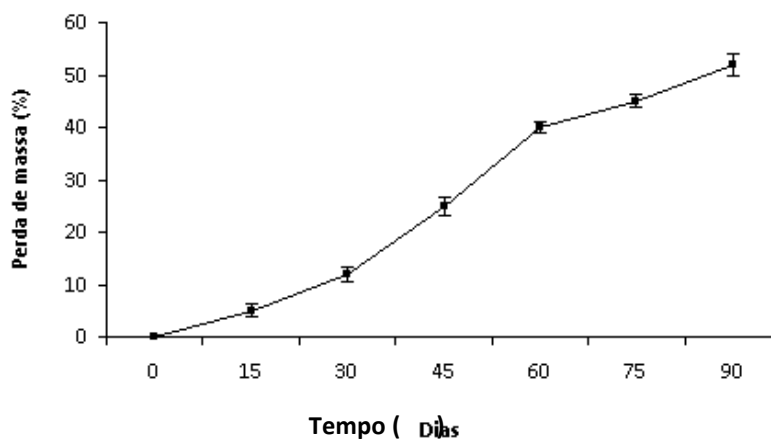


Figura 10. Perda de massa dos filmes PVA-PEJU em função do tempo de biodegradação.

De acordo com Witt et al. (2001), a biodegradabilidade depende exclusivamente da estrutura do polímero, sendo independente da origem da matéria-prima, ou seja, se é de origem petroquímica ou de fontes renováveis. Os polissacarídeos, por serem polímeros naturais, solúveis em água e com alta velocidade de biodegradação, podem facilitar o processo de biodegradabilidade de filmes poliméricos. Os resultados obtidos confirmam a hipótese inicial de que o uso de PVA-PEJU na produção de filmes biodegradáveis é promissor para a redução de resíduos sólidos causados pelo descarte de embalagens plásticas.

5.3 Atividade de T-CWDE

A utilização de quitina como fonte de carbono em meio de cultura TLE levou à produção de algumas enzimas, como quitinase, *N*-acetilglicosaminidase, β -1,3-glicanase e protease (**Figura 11**).

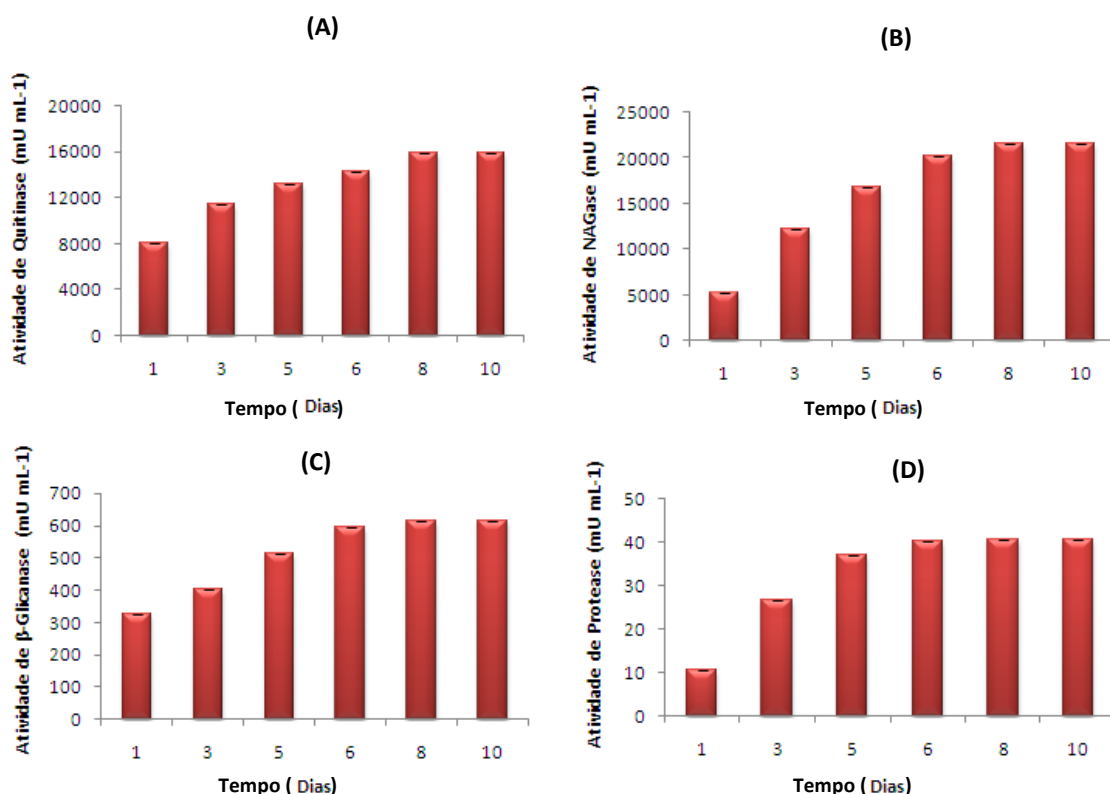


Figura 11. Cinética de produção enzimática. (A) Quitinase; (B) *N*-acetilglicosaminidase (NAGase); (C) β -1,3-glicanase; e (D) protease - por *Trichoderma asperellum* (T00) em meio TLE suplementado com quitina 0,5%, sob agitação (180 rpm) a 28° C.

No primeiro dia, o destaque foi para a produção de quitinase, cujo nível de produção foi de 8.046 mU mL⁻¹ (**Figura 11 - A**). No sétimo dia, quando a produção foi estabilizada, se mantendo até o décimo dia, os níveis foram de 15.656 mU mL⁻¹, representando um aumento de 1,9 vezes. A produção inicial elevada de quitinase pode ser explicada pela presença de quitina como fonte de carbono do meio, já que o meio líquido foi modificado pela adição de quitina 0,5%.

A produção de *N*-acetilglicosaminidase foi iniciada ao mesmo tempo em que a enzima quitinase, porém o nível de produção foi menor, 5.219 mU mL⁻¹, no primeiro dia. A taxa de produção foi estabilizada, assim como quitinase no sétimo dia (21.541 mU mL⁻¹) e se manteve até o décimo dia (**Figura 11 - B**). No entanto, a partir do quinto dia, a produção de *N*-acetilglicosaminidase já ultrapassou a produção de quitinase. Nesse período, a produção de *N*-acetilglicosaminidase foi de 16.828 mU mL⁻¹ e de quitinase 13.216 mU mL⁻¹.

Essa relação entre a produção de quitinase e *N*-acetilglicosaminidase pode ser explicada pelo mecanismo catalítico das *N*-acetilglicosaminidases. Quitinase libera

dímeros de *N-N'*-diacetilquitobioses (GlcNAc)₂ que são convertidos em monômeros de glicose pela ação das *N*-acetilglicosaminidases (SEIDL, 2008). Quando quitinases degradam a parede celular de outros fungos, ocorre a liberação de oligossacarídeos que induzem a ação posterior de exoquitinases, para liberação de monômeros de glicose (BENÍTEZ et al., 2004).

A produção de β -1,3-glicanase foi menor que a produção de quitinase e *N*-acetilglicosaminidase. No primeiro dia, a produção foi de 326 mU mL⁻¹ (**Figura 11 - C**). Os níveis de produção foram estabilizados no sexto dia (596 mU mL⁻¹).

A atividade de protease no sexto dia (40,2 mU mL⁻¹) foi 3,72 vezes mais alta que no primeiro dia (10,8 mU mL⁻¹) (**Figura 11 - D**).

A atividade amilolítica dextrinizante, avaliada pelo método de Fuwa (1954), foi realizada para avaliar se a produção de amilase por *T. asperellum* poderia biodegradar o filme Amido-Ecoflex[®], produzido a base de amido. A incubação das tiras dos filmes com amilase comercial (Novozyme; 1.252,72 mU mL⁻¹) permitiu avaliação apenas até o quarto dia, devido à degradação quase completa no quinto dia, o que impossibilitou a avaliação microscópica. A interação amido-iodo do reativo de Fuwa permitiu a visualização dos grânulos de amido presentes no filme, que não se solubilizaram totalmente no processo de extrusão, e também a biodegradação, evidenciada pelo rompimento das estruturas da membrana filmogênica (**Figura 12**).

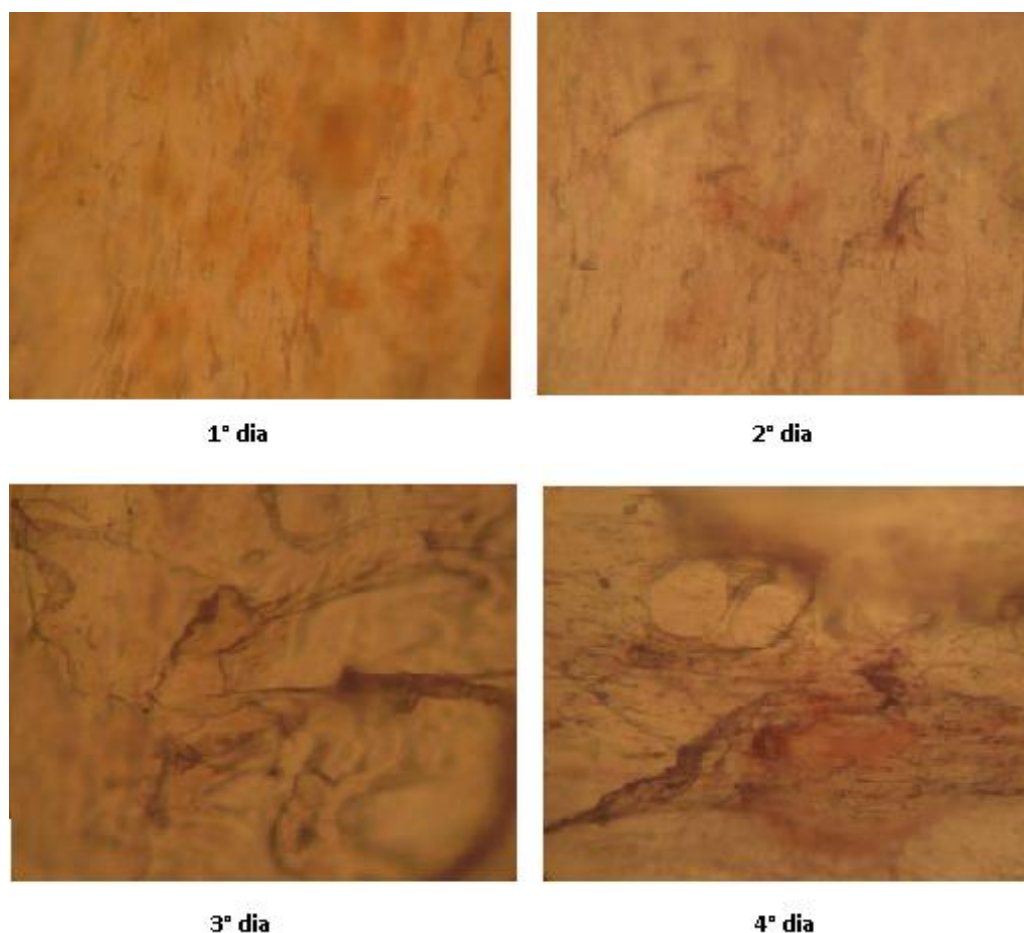


Figura 12. Ação da enzima amilase na biodegradação do filme Amido-Ecoflex®.
Microscopia óptica (1000x).

Com o uso da amilase comercial, 4 dias foram suficientes para causar o rompimento das estruturas do filme e 5 dias para biodegradá-lo quase completamente. No entanto, a produção de amilase por *T. asperellum*, se deu em níveis baixos (**Tabela 5**), insuficientes para causar essa condição na imobilização das enzimas sobre as tiras do filme Amido-Ecoflex®, portanto não constitui impedimento para o uso do filtrado de enzimas, não exigindo purificação do extrato enzimático, ou eliminação das amilases.

A produção de quitinase, *N*-acetilglicosaminidase, β -1,3-glicanase e protease foi estabilizada entre o sexto e sétimo dia. Para os ensaios de imobilização, foram utilizadas amostras do quinto dia, já que nesse dia havia níveis intermediários de todas as enzimas. A quantidade de proteínas totais presentes no meio de cultura, no quinto dia, foi de $52,82 \text{ mg mL}^{-1}$, e a quantidade de cada enzima é mostrada na **Tabela 5**.

Tabela 5. Enzimas produzidas por *Trichoderma asperellum* após 5 dias de crescimento em meio TLE.

Enzima	Unidades (mU)**	Atividade (mU mL ⁻¹)	Atividade específica (mU mg ⁻¹)
β-1,3-glicanase	25,7 ± 0,0038	514,8	9,75
NAGase*	841,4 ± 0,005	16.828	318,59
Quitinase	660,8 ± 0,004	13.216	250,21
Protease	3,72 ± 0,004	37,2	0,49
Amilase	128,8 ± 0,004	515,2	9,75

* NAGase = N-acetilglicosaminidase

**Resultados obtidos em triplicata ± Desvio Padrão

Já é sabido que a eficiência na produção enzimática, por microrganismos, varia grandemente de espécie para espécie e de acordo com as condições de cultura. Fatores físicos como aeração, pH e temperatura de incubação, além da cepa utilizada, afetam enormemente a produção de enzimas (HERRERA-ESTRELA e CHET, 1998; DAHYIA et al., 2006). Como, para *T. asperellum* (T00), não foram realizados trabalhos que avaliem o nível de produção de todas as enzimas secretadas durante o ataque micoparasita, ou induzidas artificialmente pela adição de fontes de carbono no meio de crescimento, a comparação com os resultados obtidos, fica restrita. A maioria dos estudos publicados se restringe à expressão de genes relacionados à produção destas enzimas ou à produção das mesmas por *T. harzianum*.

Bara, Lima e Ulhoa (2003) em seus estudos de purificação e caracterização de uma exo-β-1,3-glicanase, trabalharam com *T. asperellum* (T00). Avaliando a influência da fonte de carbono na produção enzimática, a maior atividade para a produção de β-1,3-glicanase foi obtida na presença de parede celular de *R. solani*, o que segundo os autores sugere que a regulação na produção desta enzima é influenciada pelos níveis de β-glicana presente no meio. Quitina, quitosana e amido também induziram a produção, mas em níveis muito próximos entre si, variando de 0,33 a 0,35 U mg⁻¹.

Marcello et al. (2008), em continuidade aos trabalhos desenvolvidos por Bara, Lima e Ulhoa (2003), analisaram a expressão de exo-β-1,3-glicanase em *T. asperellum* (T00). A fonte de carbono utilizada foi parede celular de *R. solani* e em 4 h de incubação já foi possível detectar atividade enzimática [$\approx 3 \text{ U (mg} \cdot 10^{-3})^{-1}$] e o pico

máximo foi registrado com 16 h de incubação [$\approx 14 \text{ U (mg} \cdot 10^{-3})^{-1}$], sendo que as culturas só foram incubadas por 24 h.

Nampoothiri et al. (2003) otimizaram vários parâmetros do processo de produção de quitinase por *T. harzianum*. Para o tempo de incubação, percebeu-se que após 96 h a produção começa a decair, sendo este seu pico máximo, com $0,9 \text{ U gds}^{-1}$ *. A quantidade de esporos a serem inoculados no meio também foi avaliada e os valores variaram de 0,5 a 3,0 mL e a carga total de esporos de 2×10^7 e 4×10^7 . Os melhores resultados foram encontrados com inóculos de 2,0 mL (4×10^7 esporos), a produção enzimática foi de $1,26 \text{ U gds}^{-1}$. A temperatura de incubação foi avaliada de 25 a 45° C, sendo que a maior produção foi a 30° C ($1,32 \text{ U gds}^{-1}$). A fonte de carbono também foi avaliada e quitina coloidal foi o melhor substrato, resultando numa atividade de quitinase de $2,46 \text{ U gds}^{-1}$.

No presente estudo, nas condições otimizadas (5 dias de crescimento, a 28° C, sob agitação a 180 rpm, em 250 mL de meio líquido TLE suplementado com quitina bruta 0,5% e com 2,5 mL de esporos 1×10^7), *T. asperellum* produziu 250 mU mg^{-1} de quitinase.

Verificou-se que as condições de incubação e a espécie/cepa utilizada influenciaram na produção das enzimas. O uso de quitina 0,5% como fonte de carbono e as condições de aeração provavelmente contribuíram nos níveis de produção enzimática por *T. asperellum* (T00). Essa indução coordenada de enzimas por um polissacarídeo isolado, no caso a quitina, é de grande relevância biológica, uma vez que esses substratos para a produção das enzimas também estão presentes na parede celular de outros fungos (DE LA CRUZ et al., 1992).

5.4 Atividade inibitória de T-CWDE sobre o crescimento dos microrganismos em meio líquido

As diferenças na inibição do crescimento dos microrganismos em meio líquido foi evidente na comparação entre os dois tratamentos [enzima 0,1% e 0,5% (p/v)] e entre os tratamentos e o controle (**Tabela 6**).

* U gds^{-1} = Unidades por grama de sólido seco

Tabela 6. Massa seca de *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* após crescimento em meio líquido com T-CWDE (0,1 e 0,5%) em 12 h e 24 h.

T-CWDE	Massa seca (mg)					
	<i>A. niger</i>		<i>Penicillium</i> sp.		<i>S. sclerotiorum</i>	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Controle	0,027 ± 0,015*	0,079 ± 0,018*	0,021 ± 0,022*	0,036 ± 0,013*	0,022 ± 0,017*	0,039 ± 0,012*
0,1%	0,014 ± 0,022**	0,034 ± 0,031**	0,009 ± 0,031**	0,016 ± 0,025**	0,009 ± 0,032**	0,014 ± 0,031**
0,5%	0,003 ± 0,013***	0,003 ± 0,033***	0,016 ± 0,015***	0,006 ± 0,031***	0,0 ± 0,01***	0,0 ± 0,0***

Resultados obtidos em triplicata ± Desvio Padrão. Dentro das colunas valores com o mesmo sobrescrito não apresentam diferença significativa (p<0.05)

O aumento na concentração de enzimas resultou em aumento da inibição do crescimento de todos os microrganismos. O fungo menos sensível foi *Penicillium* sp., apresentando, depois de 12 h, em meio líquido Saboaroud suplementado com enzima 0,1%, 56% de redução do crescimento e 64,7% em meio suplementado com enzima 0,5% (**Figura 13**).

Inibição intermediária foi observada para *A. niger*, apresentando, em 12 h de crescimento, em meio Saboaroud suplementado com enzima 0,1%, redução de 57% no crescimento e de 92,3% na presença de enzima 0,5% (**Figura 13**).

S. sclerotiorum mostrou-se o microrganismo mais sensível, com redução de 64,1% do crescimento em meio líquido BDA, suplementado com enzima 0,1% e ausência total de crescimento em meio suplementado com enzima 0,5% (**Figura 13**).

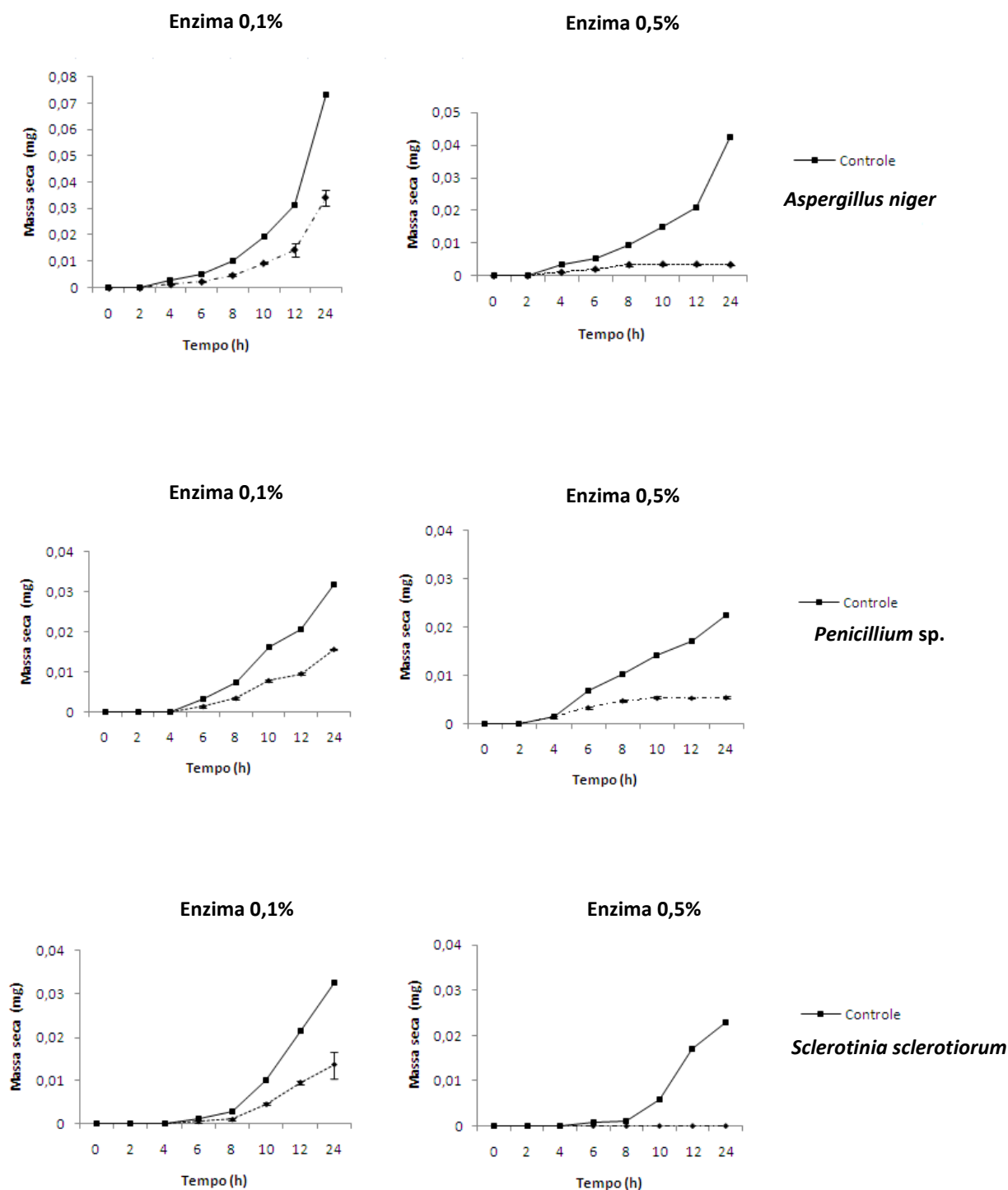


Figura 13. Curva de crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura na presença de T-CWDE 0,1% e 0,5%, sob agitação (180 rpm) a 28° C.

Para os experimentos de imobilização de T-CWDE nos filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU, a solução de enzimas foi utilizada na concentração 0,1% (p/v), pois a

concentração 0,5% (p/v) resultou em níveis muito baixos de crescimento dos microrganismos em meio líquido, o que impossibilitaria a visualização dos efeitos da ação das enzimas sobre a parede celular e demais estruturas de crescimento dos microrganismos.

5.5 Imobilização de T-CWDE nos filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU

Os exemplos mais comuns de agentes antimicrobianos naturais utilizados para inibição do crescimento de fungos em alimentos são os óleos essenciais de plantas, como *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (NGUEFACK et al., 2004). Em blendas produzidas a partir de Amido-Ecoflex® e PEJU, nenhum estudo foi realizado visando a utilização de agentes antimicrobianos naturais nas embalagens, nem a imobilização dos mesmos.

No caso do filme Amido-Ecoflex® a imobilização de T-CWDE por ligação covalente resultou em um processo 1,8 vezes mais eficiente que a imobilização por adsorção (**Tabela 7**). No filme PVA-PEJU, a eficiência da imobilização foi 2,0 vezes maior (**Tabela 8**). Essa diferença, na eficiência, entre os dois processos de imobilização também se reflete na inibição do crescimento dos microrganismos sobre os filmes. Portanto, o método de imobilização das enzimas é um fator a ser considerado na produção de embalagens antimicrobianas.

Tabela 7. Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente no filme Amido-Ecoflex®.

Método de imobilização	Proteínas totais (mg)	Atividade de quitinase (mU)	Atividade específica de quitinase (mU mg ⁻¹)	Atividade específica de quitinase por área [mU (cm ²) ⁻¹]
Adsorção	18,86 ± 0,015*	203,51 ± 0,018*	10,79	814,04*
Ligação covalente	30,30 ± 0,029**	375,85 ± 0,021**	12,40	1503,4**

Resultados obtidos em triplicata ± Desvio Padrão. Dentro das colunas valores com o mesmo sobrescrito não apresentam diferença significativa (p<0.05)

Tabela 8. Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente em PVA-PEJU.

Método de imobilização	Proteínas totais (mg)	Atividade de quitinase (mU)	Atividade específica de quitinase (mU mg ⁻¹)	Atividade específica de quitinase por área [mU (cm ²) ⁻¹]
Adsorção	14,34 ± 0,012*	198,32 ± 0,018*	13,82	793,28*
Ligação covalente	33,02 ± 0,019**	394,68 ± 0,011**	11,95	1578,72**

Resultados obtidos em triplicata ± Desvio Padrão. Dentro das colunas valores com o mesmo sobrescrito não apresentam diferença significativa (p<0.05)

5.6 Crescimento dos microrganismos sobre os filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU

A imobilização de *T*-CWDE sobre os filmes resultou em uma inibição de crescimento similar ao observado na curva de crescimento em meio líquido. Considerando o filme Amido-Ecoflex®, os microrganismos cresceram normalmente nos filmes que não receberam nenhum tratamento, usando os polissacarídeos do filme e os nutrientes do meio de cultura para manutenção de seu metabolismo. Contudo, na presença de enzimas imobilizadas, seja por adsorção ou ligação covalente, houve um resultado efetivo na redução do crescimento, principalmente sobre as tiras dos filmes (**Figura 14**). A imobilização por adsorção foi eficiente na redução do crescimento, principalmente sobre as tiras dos filmes, para todos os microrganismos. No entanto, na imobilização por ligação covalente, usando metaperiodato de sódio, houve redução maior do crescimento de *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum*. Nesse caso, a redução do crescimento se deu sobre as tiras, mas principalmente, houve redução também na placa, com a formação de halo no meio.

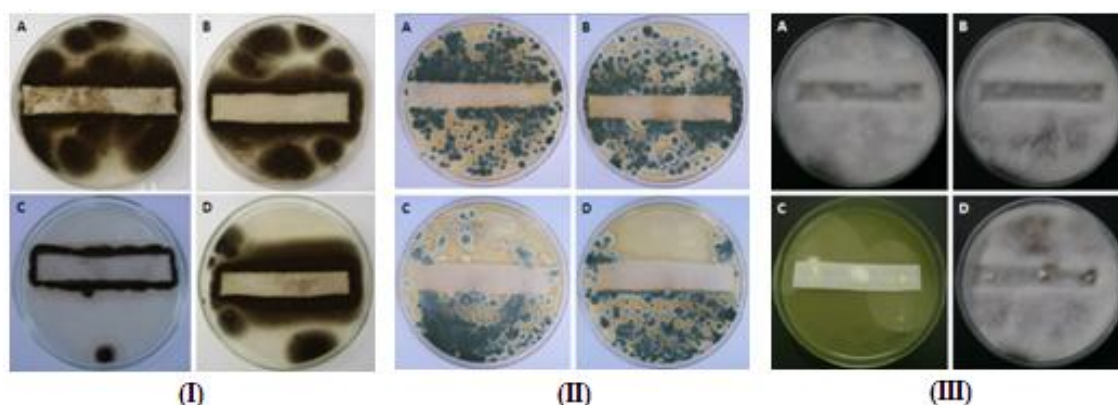


Figura 14. Crescimento dos microrganismos sobre as tiras do filme Amido-Ecoflex®. (I) *Aspergillus niger*; (II) *Penicillium* sp.; (III) *Sclerotinia sclerotiorum*. (A) tiras sem tratamento; (B) imobilização por adsorção; (C) imobilização por ligação covalente; (D) controle da imobilização.

Nos filmes PVA-PEJU, os resultados foram semelhantes aos observados nos filmes Amido-Ecoflex® contendo *T*-CWDE imobilizadas. Houve redução do crescimento sobre as tiras dos filmes em ambos os tratamentos, no entanto, com o método de imobilização por ligação covalente, os resultados são ainda mais expressivos. Apesar de os esporos de *A. niger* e *Penicillium* sp. e “plugs” de *S. sclerotiorum* terem

vido inoculados sobre as tiras, o crescimento se deu em região muito afastada do filme e no caso de *S. sclerotiorum*, houve crescimento vertical nas placas (**Figura 15**).

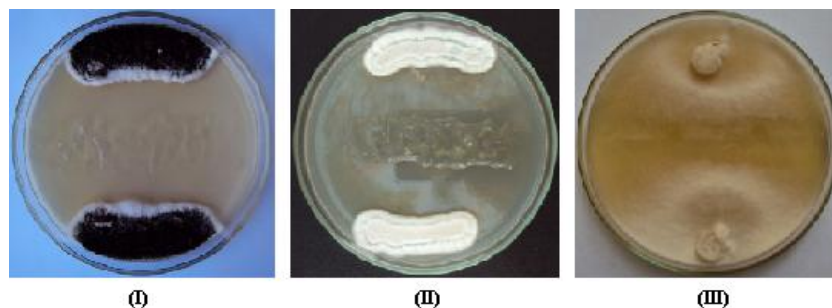


Figura 15. Crescimento dos microrganismos sobre as tiras de PVA-PEJU. (I) *Aspergillus niger*; (II) *Penicillium* sp.; (III) *Sclerotinia Sclerotiorum*. Imobilização por ligação covalente.

Assim como no crescimento em meio líquido, nos dois tipos de filme, *S. sclerotiorum* foi o microrganismo mais sensível à ação enzimática.

As diferentes respostas dos microrganismos à ação das enzimas na inibição do crescimento podem estar relacionadas à composição diferenciada da parede celular dos fungos. Embora os constituintes principais da parede celular desses microrganismos sejam de polissacarídeos (quitina e glicanas), proteínas e lipídios, a distribuição desses compostos ao longo da parede celular de *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* podem ser diferentes, resultando em diferentes níveis de hidrólise (ESCOTT et al., 1998).

Dada a eficiência observada na inibição do crescimento dos microrganismos nos filmes contendo enzimas imobilizadas por ligação covalente, os estudos de alterações estruturais em microscopia eletrônica de varredura foram conduzidos apenas com estes filmes.

5.7 Microscopia eletrônica de varredura dos filmes Amido-Ecoflex® e PVA-PEJU

A microscopia eletrônica de varredura permite caracterizar a superfície de um filme, e assim obter informações sobre a presença de poros e rugosidades (CANAVEROLO, 2003). No caso dos filmes a base de Amido-Ecoflex® a superfície

apresentou-se rugosa, provavelmente devido aos processos de homogeneização e extrusão (**Figura 16 - A**). Como PBAT é altamente hidrofóbico e com grupos funcionais de alto peso molecular, podem se formar agregados entre as cadeias de amido que dificultam a formação da estrutura dos filmes (BRANDELERO et al., 2010). Já os filmes a base de PVA-PEJU, apresentaram superfície mais uniforme e integra (**Figura 16 - B**). Rahmat et al. (2009), explicam que a presença de PVA garante uma melhoria na estrutura de filmes, devido a sua característica hidrofílica, que aumenta o número de ligações de hidrogênio e a adesão entre as cadeias de polissacarídeos.

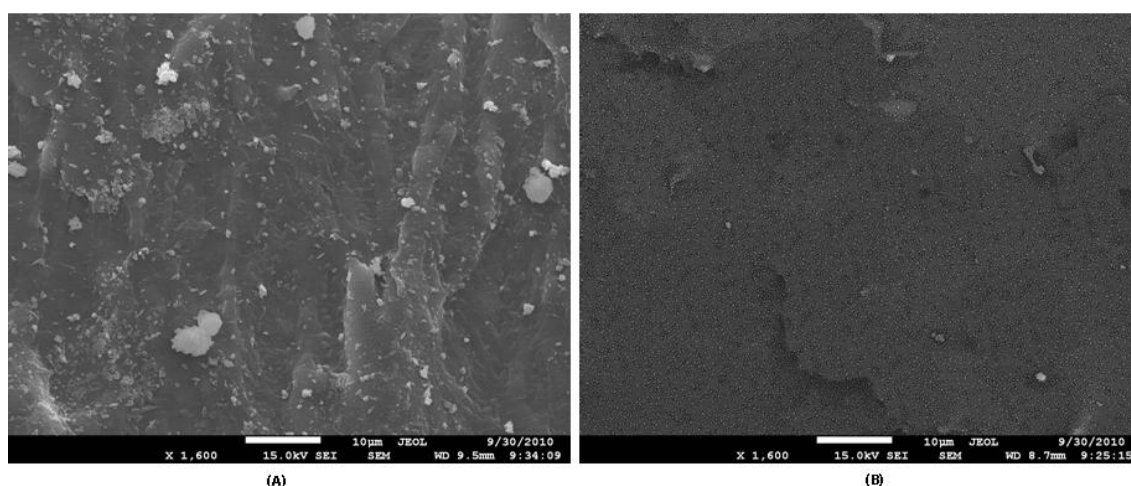


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes. (A) Amido-Ecoflex® e (B) PVA-PEJU. Aumento: 1600x.

Com relação à inibição do crescimento dos microrganismos sobre as tiras dos filmes, a microscopia eletrônica de varredura foi útil para identificação dos tipos de alterações causadas pelas enzimas nas estruturas de crescimento, hifas e esporos, dos fungos *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum*.

Durante o ataque micoparasita é comum a penetração das hifas de *Trichoderma* sp. nas hifas do hospedeiro e isso causa algumas alterações estruturais no microrganismo atacado. Por exemplo, Benhamou e Chet (1993), avaliando por citoquímica as alterações nas hifas de *R. solani* causada pela interação com *T. harzianum*, observaram que os micélios de *R. solani* eram totalmente circundados pelas hifas de *T. harzianum*, com voltas densas em apenas 2 dias após a inoculação. Após 4 dias, sinais de colapso já podiam ser observados nas células do hospedeiro, como por exemplo, perda de turgor, desintegração de compartimentos celulares e das hifas,

retração do plasmalema das células e diminuição da densidade das camadas da parede celular. Aproximadamente 90% das hifas examinadas apresentavam retração e ruptura da membrana, além de desorganização citoplasmática.

Lima et al. (1997) purificaram quitinases de *Trichoderma* sp. e testaram sua ação sobre a parede celular de *Sclerotium rolfsii* e *R. solani*. O efeito hidrolítico das enzimas no extrato enzimático, bem como de quitinase purificada, nos micélios e hifas foi confirmado por microscopia eletrônica de varredura. Os micélios incubados na presença de enzimas evidentemente mostraram rompimento nas estruturas celulares no tratamento após 48 h. Sendo que a ação apenas de quitinase purificada não foi tão intensa na destruição das estruturas celulares quanto a ação sinérgica do filtrado de enzimas.

Neste trabalho, a análise por microscopia eletrônica de varredura mostrou que a ação das enzimas hidrolíticas é responsável pelo rompimento das estruturas celulares de *A. niger*, *Penicillium* sp. e *S. sclerotiorum* e diminuição do crescimento de hifas. Além disso, para *A. niger* e *Penicillium* sp., as enzimas afetaram a germinação dos esporos inoculados. De acordo com Benítez et al. (2004), já é bem conhecido o fato de que β -1,3-glicanases inibem a germinação de esporos em cooperação com quitinases e antibióticos.

Em ambos os filmes a inibição do crescimento e o ataque às estruturas celulares dos microrganismos se deram de forma semelhante. No entanto, nos filmes PVA-PEJU, as enzimas atacaram também a membrana do filme, causando a formação de poros (**Figuras 17 e 19**). A degradação de regiões do filme pode ter se dado pela ação das β -1,3-glicanases, responsáveis pela clivagem de ligações do tipo $\beta \rightarrow 1,3$, que ligam as unidades de β -D-galactopiranosil da goma de cajueiro.

Para *A. niger*, nos filmes controle, os esporos germinaram e as hifas formadas cresceram e se espalharam sobre a superfície do filme. Já no tratamento com as enzimas hidrolíticas, no filme Amido-Ecoflex[®], as hifas atacadas pelas enzimas mostraram aparente perda de turgor, além de rompimentos e os esporos que foram inoculados inicialmente não germinaram, apresentando-se em forma alterada. Esporos de *A. niger* comumente se apresentam sob a forma ovóide, no entanto, em função da ação enzimática se apresentaram sob a forma bicôncava (**Figura 17 - I**). Nos filmes PVA-PEJU, a imobilização de T-CWDE resultou em redução mais evidente do crescimento

de *A. niger*, sendo que os esporos inoculados não chegaram a se desenvolver, portanto observa-se ausência de hifas (**Figura 17 - II**)

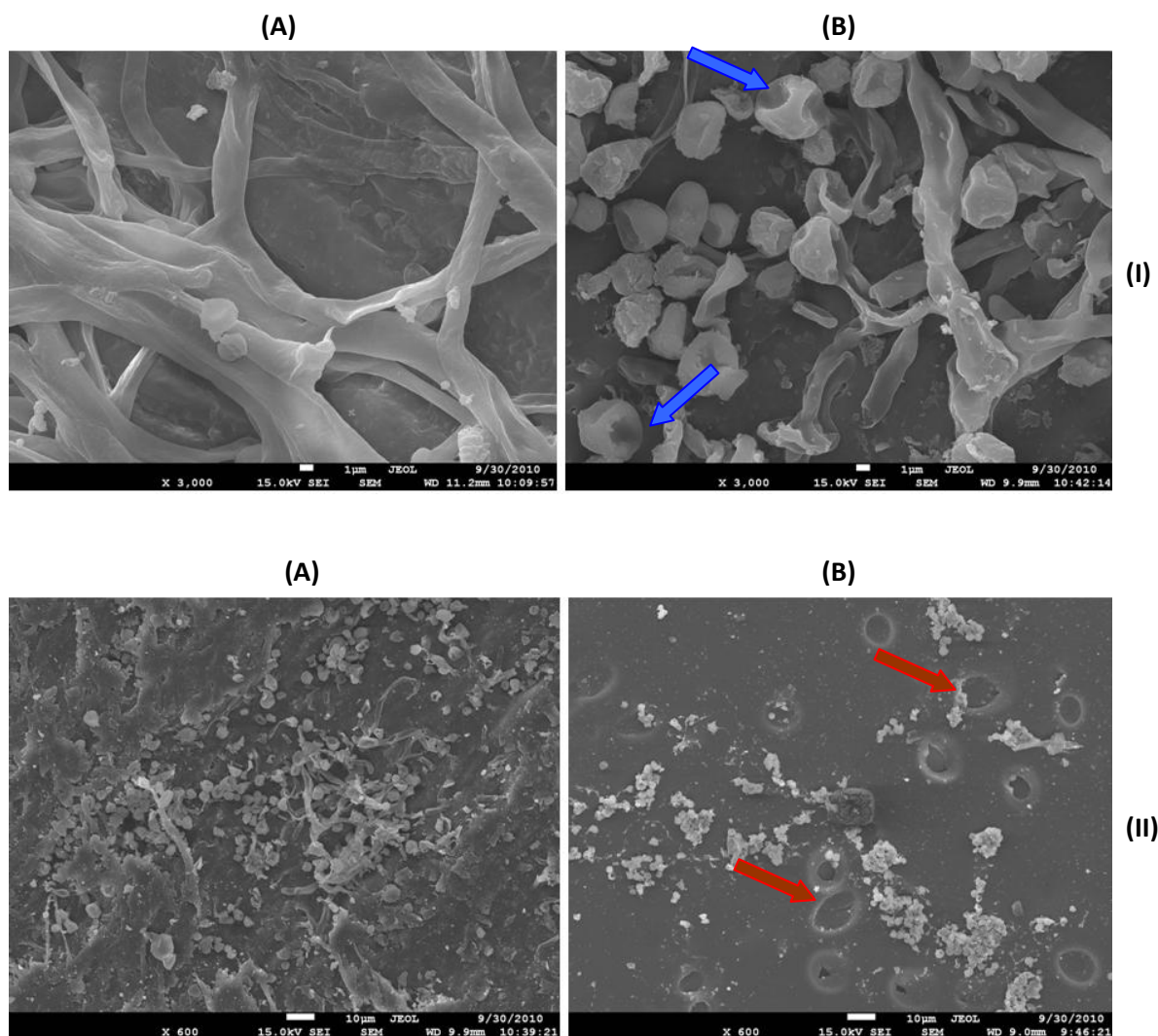


Figura 17. Ação das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum* sobre *Aspergillus niger*. (I) Filme Amido-Ecoflex[®]; (II) Filme PVA-PEJU. (A) controle; (B) enzimas imobilizadas por ligação covalente (via metaperiodato de sódio). As setas azuis evidenciam o aspecto bicôncavo dos esporos. As setas vermelhas apontam os poros formados no filme PVA-PEJU.

Penicillium sp. foi o microrganismo que respondeu menos sensivelmente à ação das enzimas hidrolíticas de *T. asperellum* em todos os tratamentos (crescimento em meio líquido e crescimento sobre as tiras dos filmes). As análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram que nos filmes controle, hifas e esporos desenvolveram-se formando aglomerados e se sobrepondo. Já na presença de *T*-CWDE,

as hifas cresceram em menor proporção e sofreram intenso processo de destruição. Os esporos inoculados em sua maioria não se desenvolveram e apresentaram alterações muito semelhantes às apresentadas pelos esporos de *A. niger*. Em geral, apresentaram-se bicôncavos (**Figura 18**).

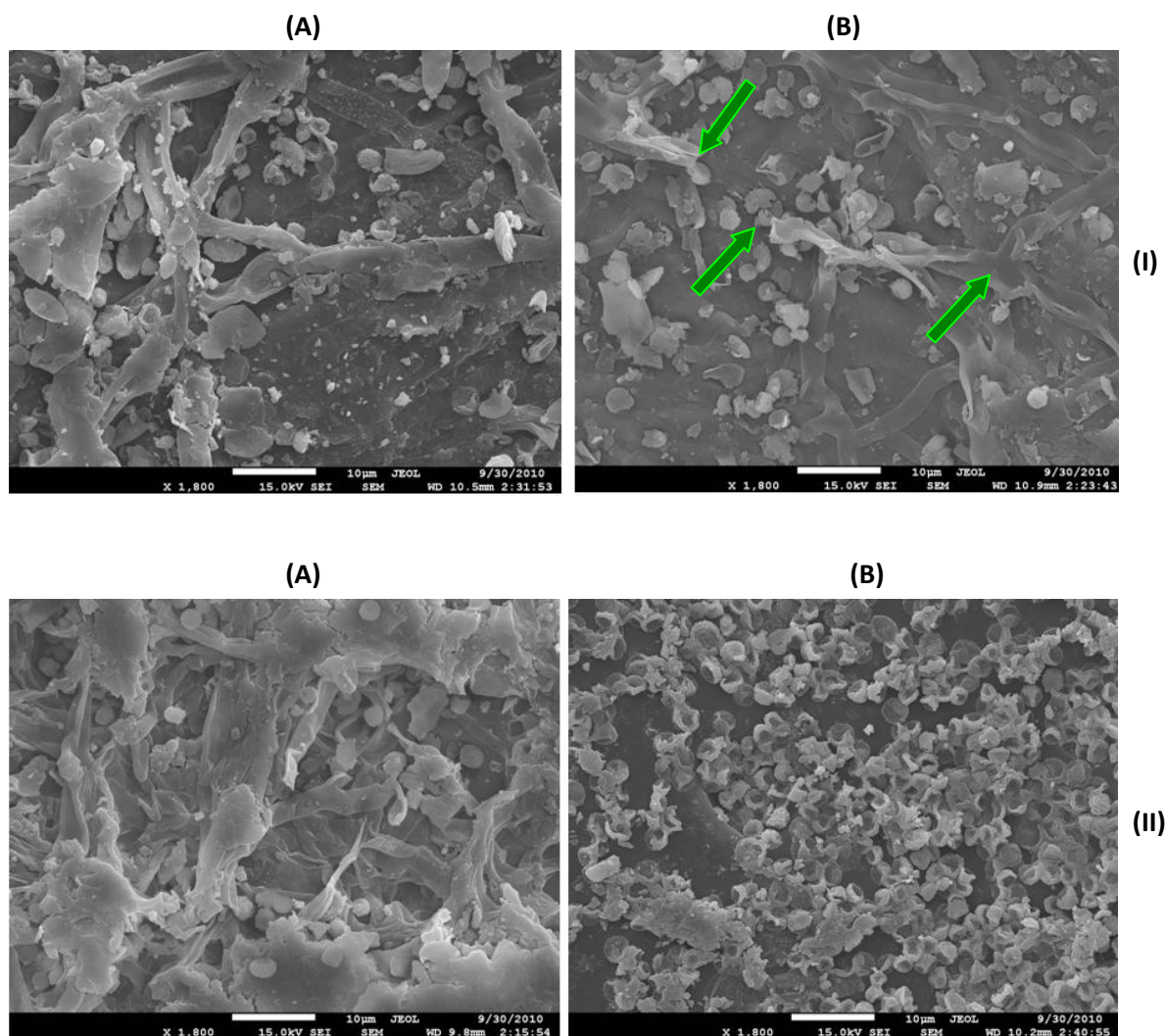


Figura 18. Ação das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum* sobre *Penicillium* sp. (I) Filme Amido-Ecoflex®; (II) Filme PVA-PEJU. (A) controle; (B) enzimas imobilizadas por ligação covalente (via metaperiodato de sódio). As setas verdes apontam os locais de rompimento das hifas.

Com relação a *S. sclerotiorum*, nos filmes controle as hifas se desenvolveram normalmente e em grande quantidade. Já nas tiras com enzimas imobilizadas, a diminuição do crescimento e a lise das estruturas celulares foi muito evidente (**Figura 19**).

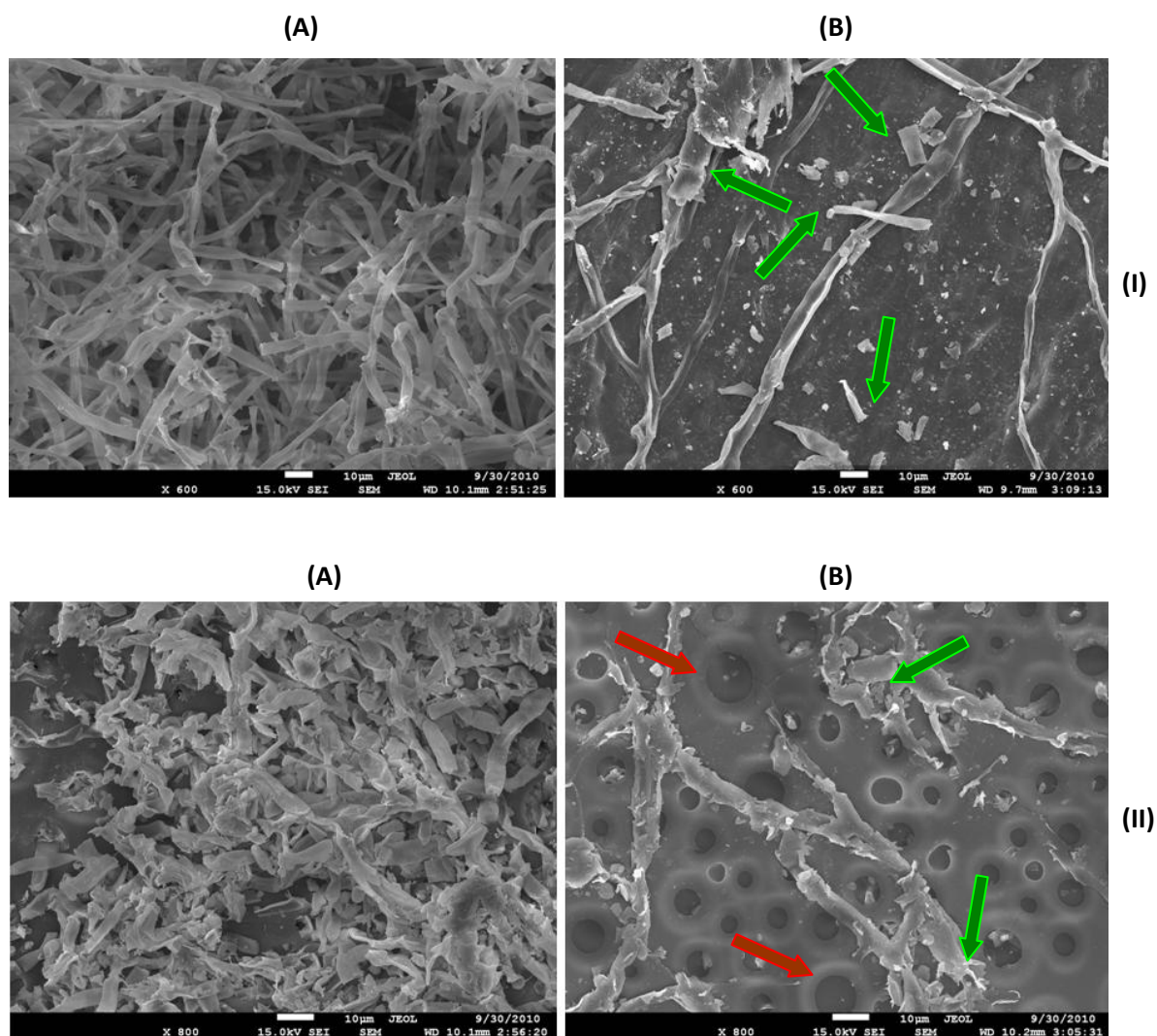


Figura 19. Ação das enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. (I) Filme Amido-Ecoflex®; (II) Filme PVA-PEJU. (A) controle; (B) enzimas imobilizadas por ligação covalente (via metaperiodato de sódio). As setas verdes apontam os locais de rompimento das hifas. As setas vermelhas apontam os poros formados no filme PVA-PEJU.

6 CONCLUSÕES

As enzimas hidrolíticas produzidas por *T. asperellum* foram imobilizadas com sucesso sobre a superfície dos filmes Amido-Ecoflex[®] e PVA-EPJU, garantindo uma ação antimicrobiana que inibiu o crescimento de *A. niger*, *Penicillium sp.* e *S. sclerotiorum*, principalmente quando o método utilizado para imobilização foi ligação covalente. Tal inibição se deu pelos mecanismos de ação das enzimas hidrolíticas produzidas, que causaram alterações nas estruturas celulares dos microrganismos, incluindo redução, ou, perda de turgor, rompimento das hifas e alteração na forma dos esporos. Além disso, as propriedades físicas e mecânicas observadas no filme PVA-PEJU podem garantir sua utilização como embalagem biodegradável.

7 PERSPECTIVAS

- A realização deste trabalho abre novas perspectivas para os estudos sobre o uso de polissacarídeos na composição de blendas de polímeros biodegradáveis e ainda, abre uma nova aplicação para enzimas de fonte microbiológica;
- Os filmes a base de Amido-Ecoflex[®], já utilizados na agricultura e indústria de alimentos pelas suas características de biodegradabilidade e aparência, agora se apresentam também como superfície adequada para a imobilização de enzimas;
- *Trichoderma asperellum* já é uma espécie conhecida pela atividade micoparasita e consequente produção de enzimas hidrolíticas. Nossos estudos sobre a aplicação dessas enzimas como agente inibidor do crescimento de outros microrganismos abre um novo espaço para o uso deste fungo como agente de controle biológico;
- O uso das enzimas produzidas por *Trichoderma asperellum*, imobilizadas em materiais biodegradáveis pode reduzir o impacto ambiental causado pela degradação de polímeros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M.T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, p. 1354-1359. 2008.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029-2035. 2004.
- ÁLVAREZ, M. F. Revisión: Envasado activo de los alimentos. **Food Science and Technology Internacional**, v. 6, n. 2, p. 97-108. 2000.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Designation: D638M-93, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**. Philadelphia: ASTM, 1995.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113-126. 2002.
- ARNON, R. Papain. In: PERLMANN, G.; LORAND, L. (orgs). **Methods in Enzimology**. New York: Academic Press, p. 226-244. 1970.
- ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 17-22. 2004.
- AVÉROUS, L. Etude de systèmes polymer multiphases: approche des relations matériaux-procédés-propriétés. Habilitation à diriger des recherches. **Université de Reims**, 46 p. 2002.
- AVÉROUS, L.; BOQUILLO, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 111-122. 2004.
- BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 21-24. 2007.
- BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatrics**, v. 23, n. 4, p. 320-328. 2001.
- BARA, M. T. F. Purificação e caracterização de uma exo- β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma asperellum*. **Universidade de Brasília**. Tese de Doutorado apresentada ao departamento de Biologia Celular. 78 p. 2002.
- BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo-b-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 81-85. 2003.
- BASF. Ficha de produtos: Ecoflex[®]. 2003. Disponível em <http://www.basf.com/ecoflex>. Acessado em 2 de outubro de 2010.

BASTIOLI, C. Global status of the production of biobased packaging materials. In: **The Food Biopack Conference**. Copenhagen, p. 2-7. 2000.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**, v. 83, n. 10, p. 1062-1071. 1993.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, p. 249-260. 2004.

BERGER, L. R.; REYNOLDS, D. M. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 29, p. 552-634. 1958.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 680-85. 1976.

BRANDELERO, R. P. H.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. The effect of surfactant tween 80 on the hydrophilicity, water vapor permeation, and the mechanical properties of cassava starch and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 4, p. 1102-1109. 2010.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 147, 03 ago. 2010. Seção 1, p. 3.

CANAVEROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2º ed. São Paulo: Artiber Editora. 2003.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; SOUZA, M. P.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 379-385. 2009.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DIÁZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1895-1902. 2009.

CASELI, L.; SANTOS, D. S.; FOSCHINI, M.; GONCALVES, D.; OLIVEIRA, O. N. J. R. Control of catalytic activity of glucose oxidase in layer-by-layer films of chitosan and glucose oxidase. **Materials Science and Engineering**, v. 27, p. 1108-1110. 2007.

CESSNA, S. G.; SEARS, V. E.; DICKMAN, M. B.; LOW, P. S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, v. 12, p. 2191-2199. 2000.

CLEMMENSEN, L. H.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C.; ERSBØLL, B. K. A method for comparasion of growth media in objective identification of *Penicillium*

based on multi-spectral imaging. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 249-255. 2007.

CONKOVA, E.; LACIAKOVA, A.; STYRIAK, I.; CZERWIECKI, L.; WILCZYNSKA, G. Fungal Contamination and the levels of mycotoxins (DON and OTA) in Cereal samples from Poland and East Slovakia. **Czech Journal of Food Science**, v. 24, n. 1, p. 33-40. 2006.

COOKSEY, K. Antimicrobial food packaging materials. **Additives for Polymers**, p. 6-10. 2001.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 773-782. 2006.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 3, p. 859-867. 1992.

ESCOTT, G. M.; HEAM, V. M.; ADAMS, D. J. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 144, p. 1575-1581. 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Mycotoxins in grain. **Agriculture and Consumer Protection**. Netherlands, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Climate change: implications for food safety. **Agriculture and Consumer Protection**. Roma, 2008.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603. 1954.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal Biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, p. 577-587. 2009.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 190-195. 1992.

GONZÁLEZ-SALGADO, A.; PATIÑO, B.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 353-361. 2005.

GOODAY, G. W.; ZHU, W. Y.; O'DONEL, R. W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 387-92. 1992.

GUILBERT, S. Potential of the protein based biomaterials for the food industry. In: **The food Biopack Conference**. Copenhagen, p. 13-18. 2000.

- HAN, J. H. Antimicrobial packaging systems. In: HAN, J. H. (org.). **Innovations in Food Packaging**. London: Elsevier Academic Press, p. 80-107. 2005.
- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56. 2004.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. M. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fung**. Reino Unido: IMI. 1995.
- HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not be” a pathogen?. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 177-184. 2005.
- HERRERA-ESTRELA, A.; CHET, I. E. **Biocontrol of bacteria and phitopatogenic fungi**. New York: Ed. Arien Altman. Marcel Dekker, p. 263-282. 1998.
- IBRAHIM, C. O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial source. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4572-4582. 2008.
- INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 757-763. 1996.
- JOEGER, R. D. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. **Packaging Technology and Science**, v. 20, p. 231-273. 2007.
- KANDIMALLA, V. B.; TRIPATHI, V. S.; JU, H. Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 73-106. 2006.
- KASUYA, K.; ISHII, N.; INOUE, Y.; YASAWA, K.; TAGAYA, T.; YOTSUMOTO, T.; KAZAHAYA, J.; NAGAI, D. Characterization of a mesophilic aliphatic-aromatic copolyester-degrading fungus. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 1190-1196. 2009.
- KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, R. T. Assesment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: field study. **Chemosphere**, v. 71, p. 942-953. 2008.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzymes application. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351. 2002.
- KULLNIG-GRADINGER, C. M.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. **Mycological Research**, v. 106, p. 757-767. 2002.
- LIMA, L. H. C.; ULHOA, C. J.; FERNANDES, A. P.; FÉLIX, C. R. Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and this action on *Sclerotium rofsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 43, p. 31-37. 1997.

LEE, W.; YOUN, Y.; YUN, Y.; YOON, S. Physical properties of chemically modified starch (RS4)/PVA blend films. Part 1. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 15, p. 35-42. 2007.

LIMA, A. L. Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isolados de solo do cerrado brasileiro. **Universidade de Brasília**. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Fitopatologia. 73p. 2002.

LOPEZ-RUBIO, A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, p. 567-575. 2006.

MARCELLO, C. M.; STEINDORFF, A. S.; SILVA, S. P.; SILVA, R. N.; BATAUS, L. A.. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, v. 165, n. 1, p. 75-81. 2008.

McHUGH, T. H, KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs glycerol- plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 841-845. 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 1101-1105. 1994.

MOLANO, J.; DURAM, A.; CABIB, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. **Analytical Biochemistry**, v. 83, p. 648-656. 1977.

MONTEIRO, F. M. F.; MEDEIROS E SILVA, G. M.; SILVA, J. B. R.; PORTO, C. S.; *et al.* Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 884-888. 2007.

MOTHÉ, C. G.; HAO, M. A. Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum Arabic: effect of concentration and blending. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 501-506. 1999.

NAMPOOTHIRI, K. M.; BAIJU, T. V.; SANDHYA, C.; SABU, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1583-90. 2004.

NOMBELA, C.; MOLINA, M.; CENAMOR, R.; SANCHEZ, M. Yeast beta-glucanases: a complex system of secreted enzymes. **Microbiology Science**, v. 5, p. 328-32. 1998.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, p. 119-23. 2000.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOLLO P. H.; MATHUR, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 329-334. 2004.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 161-165. 2004.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: na exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 473-83. 2000.

PAULA, H. C. B.; GOMES, F. J. S.; DE PAULA, R. C. M. Swelling studies of chitosan/cashew nur gum physical gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 313-318. 2002.

PIZA, F. A. T.; SILOTO, A. P.; CARVALHO, C. V.; FRANCO, T. T. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, p.185-92. 1999.

RAHMAT, A. R.; RAHMAN, W. A. W.; SIN, L. T.; YUSSUF, A. A. Approaches to improve compatibility of starch filled polymer system: a review. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 2370-2377. 2009.

RUDRA, J. S.; DAVE, K.; HAYNIE, D. T. Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings. **Journal of Biomaterials Science – Polymer Edition**, v. 17, n. 11, p. 1301–1315. 2006.

RUNDBERGET, T.; SKAAR, I.; FLÅØYEN, A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 181-188. 2004.

RUTIAGA, M. O.; GALAN, L. J.; MORALES, L. H.; GORDON, S. H.; IMAM. S. H.; ORTS, W. J.; GLENN, G. M.; NIÑO, K. A. Mechanical property and biodegradability of cast films prepared from blends of oppositely charged biopolymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 2, p. 185-191. 2005.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. **FEMS Microbiology Letters**, v. 11, p. 317-38. 1993.

SAKANAKA, L. S. Filmes biodegradáveis de blendas de amido termoplástico e polibutileno adipato co-succinato (PBSA). Universidade Estadual de Londrina. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Ciência de Alimentos. 2006.

SANTANA, R. M.; MANRICH, S. Filmes tubulares de compósitos de termoplásticos pós-consumo: análise térmica e mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 163-170. 2005.

SCAPIM, M. R. S. Produção, caracterização, aplicação e biodegradabilidade de filmes de blendas de amido e poli(butileno adipato co-tereftalato) produzidos por extrusão.

Universidade Estadual de Londrina. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 132p. 2009.

SEIDL V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 36-42. 2008.

SHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 468-75. 1993.

SHI, X. Q.; ITO, H.; KIKUTANI, T. Characterization on mixed-crystal structure and properties of poly (butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable fibers. **Polymers**, v. 46, p. 11442-11450. 2005.

SILVA, A. R. Produção e caracterização de uma endo- β -1,3-glucanase de *Trichoderma asperellum*. **Universidade Federal de Goiás.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia. 2005.

SILVA, D. A.; FEITOSA, J. P. A.; MACIEL, J. S.; PAULA, H. C. B.; DE PAULA, R. C. M. Characterization of crosslinked cashew gum derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 16-26. 2006.

SILVA, T. M.; SANTIAGO, P. O.; PURCENA, L. L. A.; FERNANDES, K. F. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization - structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 526-530. 2010.

STACCIARINI, J. H. R. A fome e a globalização X a globalização da fome: causas e consequências da fome... **Boletim Goiano e Geografia**, v. 16, n. 1, p. 41-51. 1996.

VITERBO, A.; HAREL, M.; CHET, I. Isolation of two aspartil proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 151-158. 2004.

VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEM, D.; MONTE, E.; LLOBEL, A.; CHET, I. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, v. 42, p. 114-122. 2002.

VIZCAÍNO, J. A.; REDONDO, J. SUÁREZ, M. B.; CARDOZA, R. E.; HERMOSA, R.; GONZÁLEZ, F. J.; REY, M.; MONTE, E. Generation, annotation, and analysis of ESTs from four different *Trichoderma* strains grown under conditions related to biocontrol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 853-862. 2007.

WITT, U.; EINIG, T.; YAMAMOTO, M.; KLEEGER, I.; DECKWER, W. -D.; MÜLLER, R. -J. Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. **Chemosphere**, v. 44, p. 289-299. 2001.

YABUKI, M.; MIZUSHIMA, K.; AMATATSU, T.; ANDO, A.; FUJII, T.; SHIMADA, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and chitinase produced by *Aeromonas hydrophyla* subsp. *Anaerogenes*. **Applied Microbiology**, v. 32, p. 25-32. 1986.

YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Biodegradable active packaging for minimally processed fruits and vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 4, p. 335-343. 2005.

YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Active packaging for West Indian cherry fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p. 95-100. 2006.

9 APÊNDICES

Apêndice 1. Análises Estatísticas (Teste t)

1. Curva de crescimento dos microrganismos

A) *Aspergillus niger*

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,1%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,009438	0,008229
Variância	0,000176	0,000133
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	14	
Stat t	0,194164	
P(T<=t) uni-caudal	0,424418	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	0,848837	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,5%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,009438	0,0021
Variância	0,000176	2,43E-06
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	1,552169	
P(T<=t) uni-caudal	0,082281	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,164563	
t crítico bi-caudal	2,364624	

Comparação entre o crescimento na presença de enzima (0,1% x 0,5%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,008229	0,0021
Variância	0,000133	2,43E-06
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	1,486909	
P(T<=t) uni-caudal	0,090316	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,180633	
t crítico bi-caudal	2,364624	

B) *Penicillium* sp.

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,1%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,005188	0,004725
Variância	3,74E-05	3,31E-05
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	0,155829	
P(T<=t) uni-caudal	0,439196	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	0,878393	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,5%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,005188	0,003271
Variância	3,74E-05	5,96E-06
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	9	
Stat t	0,82357	
P(T<=t) uni-caudal	0,215733	
t crítico uni-caudal	1,833113	
P(T<=t) bi-caudal	0,431466	
t crítico bi-caudal	2,262157	

Comparação entre o crescimento na presença de enzima (0,1% x 0,5%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,004725	0,003271
Variância	3,31E-05	5,96E-06
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	9	
Stat t	0,658133	
P(T<=t) uni-caudal	0,263463	
t crítico uni-caudal	1,833113	
P(T<=t) bi-caudal	0,526927	
t crítico bi-caudal	2,262157	

A) *Sclerotinia sclerotiorum*

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,1%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,004875	0,003658
Variância	4,99E-05	2,75E-05
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	0,390967	
P(T<=t) uni-caudal	0,351077	
t crítico uni-caudal	1,770933	
P(T<=t) bi-caudal	0,702154	
t crítico bi-caudal	2,160369	

Comparação entre o crescimento das amostras controle e na presença de enzima (0,5%)

	Variável 1	Variável 2
Média	0,004875	0
Variância	4,99E-05	0
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	1,951073	
P(T<=t) uni-caudal	0,046011	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,092022	
t crítico bi-caudal	2,364624	

Comparação entre o crescimento na presença de enzima (0,1% x 0,5%)

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,003658	0
Variância	2,75E-05	0
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	7	
Stat t	1,972137	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

2. Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente em Ecoflex[®]

A) Proteínas totais

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	18,86	30,30
Variância	0,000196	0,000143
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	1,972137	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

B) Atividade de quitinase

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	203,51	375,85
Variância	0,000394	0,000253
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	1,572154	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

C) Atividade específica de quitinase por área

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	814,04	1503,4
Variância	0,000395	0,000312
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	1,472927	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

3. Atividade da enzima quitinase imobilizada por adsorção e ligação covalente em PVA-PEJU

A) Proteínas totais

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	14,34	33,02
Variância	0,000212	0,000233
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	1,982154	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

B) Atividade de quitinase

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	198,32	394,68
Variância	0,000234	0,000212
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	2,072927	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	

C) Atividade específica de quitinase por área

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	793,28	1578,72
Variância	0,000251	0,000364
Observações	3	3
Hipótese da diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	1,972137	
P(T<=t) uni-caudal	0,044605	
t crítico uni-caudal	1,894579	
P(T<=t) bi-caudal	0,08921	
t crítico bi-caudal	2,364624	