

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

**MISTURA POLIMÉRICA ESPIRULINA/CARBOXIMETILCELULOSE
COMO VEÍCULO DE INOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* EM
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

CARLA DE SANT'ANNA FREITAS

2015



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

**MISTURA POLIMÉRICA ESPIRULINA/CARBOXIMETILCELULOSE
COMO VEÍCULO DE INOCULAÇÃO DE *Bradyrhizobium japonicum* EM
FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

CARLA DE SANT'ANNA FREITAS

Sob a Orientação do Professor Dr.

Paulo Jansen de Oliveira

&

Co- Orientação da Pesquisadora Dr^a.

Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciência
em Engenharia Química, Área de concentração
em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Julho de 2015

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

CARLA DE SANT'ANNA FREITAS

Dissertação/Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Engenharia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM : -----/-----/-----

Profº Paulo Jansen de Oliveira, Dr. /Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ
(Orientador e Presidente)

Profª Dilma Costa, Drª. /Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ

Gustavo Ribeiro Xavier, Dr. /Pesquisador da Embrapa Agrobiologia

*Dedico esta dissertação à minha Rainha,
minha mãe Edlea Sant'Anna, ao meu
amado pai Luiz Carlos (in memoriam) e à
minha tia Edna Sant'Ana (in memoriam),
exemplo de pessoa e profissional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha mãe Edlea, que sempre me apoiou e com todo seu amor me ajudou a vencer mais uma etapa da minha vida.

À todos os meus familiares pelo incentivo, em especial à minha prima Luciana, pela força e pelos croquis lindos!

Ao Prof. Dr. Paulo Jansen de Oliveira, pela orientação, amizade e palavras de incentivo que me fizeram acreditar na minha capacidade, me auxiliando em momentos fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Dr^a. Norma Gouvêa pela co-orientação, paciência, disponibilidade e enorme contribuição para a realização desse trabalho.

À Dr^a. Anelise Dias pela paciência e boa vontade ao me receber e orientar no início do meu trabalho, quando eu não fazia ideia por onde começar.

À Banca examinadora, Prof^a Dr^a Dilma Alves Costa e Dr. Gustavo Ribeiro Xavier e à banca de seminários, Prof^a. Dr^a. Dilma Alves Costa, Prof. Dr. Rui de Góes Casqueira, Prof^a. Dr^a. Roberta e Prof^a Dr^a Daniely pelas correções e sugestões.

A todo o corpo técnico do Instituto de Tecnologia da UFRRJ que ajudou na realização deste trabalho, em especial à Renata, que sempre se mostrou disponível a ajudar nos momentos de leve desespero.

Ao grupo do Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, em especial ao João Luiz, por toda ajuda, risadas e incentivo e aos amigos Karine, Dani,

Fernanda, Rafa, Samuel, Bárbara. Cada um de um modo especial contribuiu para a realização deste trabalho. Obrigada a todos pela amizade!

A todo o corpo técnico da Embrapa Agrobiologia, que me ajudou na realização deste trabalho, em especial ao Claudinho e seu sorriso de todos os dias e Altiberto pelas análises de N.

Aos amigos do mestrado, Ana - amiga de uma vida! -, Camilinha - minha eterna anfitriã!-, Diego, Carlos, Vinícius, Olívio, Andreia e Leandro, pela força-tarefa quando o “bicho estava pegando”.

À oportunidade de morar no Alojamento da Embrapa Agrobiologia, onde tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas que vou levar pra sempre no meu coração, em especial à Lívia, Jander, Erika, Thianny, Ariany, Iris, Cesinha, Alessandro, Wilk, Pedro, Leo, Carol, Fabiano, Lau pela amizade, conselhos e momentos memoráveis.

Às minhas amigas da vida toda que me apoiam em todos os momentos, Jéssica, Gabi, Érika, Alessandra, Vanessa.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade.

A todos que, de alguma forma, direta ou indireta, colaboraram na realização deste trabalho e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer o meu agradecimento.

“Ela sozinha é, porém, mais importante que todas vós, pois foi ela que eu reguei. Foi ela que eu pus sob a redoma. Foi ela que abriguei com o para-vento. Foi por ela que eu matei as larvas (exceto duas ou três, por causa das borboletas) (...) já que ela é a minha rosa.

(...) Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

(O pequeno príncipe – Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

FREITAS, Carla de Sant'Anna. **Mistura polimérica espirulina/carboximetilcelulose como veículo de inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O melhoramento da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), que pode ser feito através do uso de inoculantes rizobianos, supre a deficiência do nitrogênio nas culturas, sem grande aumento de custo na produção. Portanto, a busca por novos produtos para serem utilizados como veículos de inoculação que possam substituir a turfa, que é o veículo mais utilizado, é uma demanda crescente por partes das indústrias nesse setor. Para isso, nesse trabalho de dissertação foi investigada e testada a mistura polimérica espirulina/CMC como veículo de inoculação para a estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), uma das principais culturas da agricultura familiar no semiárido brasileiro. Foram preparadas seis composições de espirulina/CMC contendo diferentes concentrações de espirulina. As misturas foram inoculadas e utilizadas com tempos de incubação do rizóbio de 13 e 47 dias. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron para avaliar a estabilidade dimensional, germinação, sobrevivência de células rizobianas na mistura, teor de nitrogênio, teor de clorofila, massa seca e número de nódulos, além de testes de reologia para avaliação da interação entre as fases espirulina e CMC. Os experimentos mostraram que a mistura polimérica espirulina/CMC foi capaz de aumentar, ao fim de 28 dias, as células rizobianas inicialmente inoculadas em cerca de 100 vezes, atingindo valores de 10^9 ufc.mL⁻¹. Os resultados de teor de nitrogênio, teor de clorofila, massa seca e número de nódulos das plantas inoculadas com a mistura foram semelhantes aos obtidos com a turfa e o tempo de estocagem não apresentou diferença nos resultados. Os resultados obtidos nos ensaios reológicos mostraram que a mistura apresentou comportamento não newtoniano. Onde, em baixas frequências há predominância da espirulina sobre os efeitos elásticos da mistura, sugerindo uma boa interação entre as fases, entretanto, quando a frequência aumenta há predominância dos efeitos elásticos do CMC, sugerindo a diminuição da interação entre a espirulina e o CMC na mistura. Concluindo-se que a mistura polimérica espirulina/CMC pode ser uma alternativa aos veículos de inoculação já existentes, como a turfa.

Palavras-chave: veículo de inoculação, espirulina, carboximetilcelulose, misturas poliméricas, feijão-caupi.

ABSTRACT

FREITAS, Carla de Sant'Anna. **Polymer blend spirulin/carboxymethylcellulose as a carrier of *Bradyrhizobium japonicum* for cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Dissertation (Master science in Chemical Engineering, Chemical Technology). Technology Institute, Chemical Engineering Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The improvement of the Biological Nitrogen Fixation (BNF), which can be done through the use of rhizobial inoculants, supplies nitrogen deficiency in cultures without large increase in cost in production. Therefore, the search for new products to be used as a carrier to come replace the peat, which despite being the most used carrier in agriculture, has disadvantages as be from non-renewable source and not available in all regions the world with the same efficiency, is a growing demand of the industries in this sector. In this dissertation was investigated and tested the spirulin/CMC blends as carrier for the BR 3262 strain of *Bradyrhizobium japonicum* in cowpea (*Vigna unguiculata*), one of the main crops of family farming in the Brazilian semiarid region. Spirulin/CMC blends with different spirulin content were prepared and inoculated with Rhizobium during 13 and 47 days. The dimensional stability, germination, survival of rhizobial cells in the blend; as well the nitrogen content, chlorophyll content, dry weight and number of nodules were obtained by experiments in greenhouse and Phytotron. These results showed that spirulin/CMC blends were capable to maintain the same magnitude of initial rhizobial cells concentration, 10^9 ufc.mL⁻¹ after 28 days. The results of nitrogen content, chlorophyll content, dry weight and number of nodules of plants inoculated with the blend were consistent to those obtained with peat and the storage time showed no difference in the results. Results obtained in rheological tests showed that the blend showed non-Newtonian behavior. Where, in the low frequencies there is a predominance of spirulin on the elastic effects of the blend, suggesting a good interaction between the phases, however, when the frequency increases there is a predominance of the elastic effects of CMC, suggesting the decrease in interaction between the spirulin and the CMC in the blend. Concluding that the blend spirulin/CMC can be an alternative to existing carriers such as peat.

Keywords: carrier, spirulin, carboxymethylcellulose, blends, cowpea.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - <i>Spirulina platensis</i> | 8 |
| Figura 2 - Estrutura química da Carboximetilcelulose..... | 10 |
| Figura 3 - (a) Espirulina seca e (b) Carboximetilcelulose..... | 17 |
| Figura 4 - Preparação das misturas poliméricas. (a) Preparo das misturas em liquidificador. (b) Misturas em tubos falcon (c) Sacos sendo selados. (d) Misturas em sacos autoclaváveis. | 18 |
| Figura 5 - (a) Estirpe retirada do superfreezer e crescida em placa de Petri. (b) Passagem das bactérias para meio líquido. (c) Erlenmeyers no shaker para crescimento das bactérias. | 19 |
| Figura 6 – Preparo do inóculo: (a) Suspensão sendo centrifugada. (b) Inoculação das misturas poliméricas. | 20 |
| Figura 7 – Contagem de bactérias através do método da gota: (a) placas de petri com meio YMA (b) diluição seriada (c) placas inoculadas. | 21 |
| Figura 8 – (a) Sementes imersas nas misturas poliméricas. (b) Secagem das sementes para a peletização. | 22 |
| Figura 9 - (a) Preparação dos vasos com solo SIPA e tubetes com substrato para o teste de germinação. (b) Plantas germinadas..... | 22 |
| Figura 10 – (a) Plantas condicionadas em sacos de papel para secagem para avaliação da massa seca. (b) Pesagem da parte aérea das plantas..... | 23 |
| Figura 11 - Visão geral dos experimentos em garrafas do tipo <i>longneck</i> (a) e tubetes (b), em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ), em 2014. | 24 |
| Figura 12 - (a) Preparação das garrafas do tipo <i>longneck</i> . (b) Pré-germinação das sementes de feijão-caupi. (c) Inoculação das sementes de feijão-caupi. (d) Garrafas do tipo <i>longneck</i> com sementes inoculadas..... | 25 |
| Figura 13 – (a) Sementes imersas nas misturas poliméricas. (b) Secagem das sementes para a peletização. (c) Plantio das sementes nos tubetes..... | 26 |
| Figura 14 - Croquis inicial e final da bancada de tubetes em delineamento experimental de blocos ao acaso (DBC). | 27 |
| Figura 15 – Avaliação de clorofila utilizando o ClorofiLOG. | 28 |
| Figura 16 - Reômetro Haake RheoStress 1. | 29 |

| | |
|---|----|
| Figura 17 – (a) Misturas poliméricas condicionadas em sacos plásticos autoclaváveis e (b) em tubos Falcon depois e antes da autoclavagem. | 30 |
| Figura 18 – Tubos Falcon contendo misturas poliméricas nas concentrações de 2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina para avaliação da estabilidade dimensional através da separação de fase. | 31 |
| Figura 19 - Desenvolvimento de planta inoculada (esq.) e controle não inoculado (dir.). | 37 |
| Figura 20 – (a) Nódulos de planta sem inoculação e (b) inoculada com a mistura polimérica espirulina/CMC. | 41 |
| Figura 21 – Variação da viscosidade com o aumento da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo 0, 2,5, 5e 10% de massa de espirulina..... | 42 |
| Figura 22 - Variação do Módulo Elástico (G') em função da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo 0, 2,5, 5e 10% de massa de espirulina..... | 43 |
| Figura 23 - Variação do Crossover em função da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo: (a) 0%, (b) 2,5%, (c) 5% e (d) 10% de massa de espirulina. ... | 45 |
| Figura 24 - Variação da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo: 0, 2,5, 5 e 10% de massa de espirulina..... | 46 |
| Figura 25 - Teste de fluência e recuperação para as misturas espirulina/CMC contendo: (a) 0%, (b) 2,5%, (c) 5% e (d) 10% de massa de espirulina. | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Produção mundial média de feijão-caupi entre 2007 e 2011.. | 12 |
| Tabela 2 - Composição do meio YMA..... | 19 |
| Tabela 3 - Avaliação de sobrevivência da estirpe BR3262 através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em misturas contendo 2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina em dias..... | 32 |
| Tabela 4 - Teste de germinação em tubetes com substrato em casa de vegetação..... | 34 |
| Tabela 5 - Teste de germinação em vasos com solo em casa de vegetação..... | 35 |
| Tabela 6 – Número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em garrafas do tipo <i>longneck</i> em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014..... | 36 |
| Tabela 7 - Massa seca de parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e teor de clorofila de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em tubete em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014..... | 38 |
| Tabela 8 – Número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca de raiz de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em tubete em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014. | 40 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | OBJETIVO | 3 |
| 2.1 | Objetivo geral | 3 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 3 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| 3.1 | Microalgas | 4 |
| 3.2 | Cianobactérias | 5 |
| 3.3 | Espirulina | 7 |
| 3.4 | Carboximetilcelulose | 9 |
| 3.5 | Feijão-caupi | 10 |
| 3.6 | Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) | 12 |
| 3.7 | Inoculantes e veículos de inoculação | 14 |
| 3.8 | Aspectos reológicos de misturas poliméricas | 16 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 4.1 | Materiais | 17 |
| 4.2 | Métodos | 17 |
| 4.2.1 | Preparação das misturas poliméricas | 17 |
| 4.2.2 | Estirpe bacteriana: condições de crescimento e incubação | 18 |
| 4.2.3 | Preparo do inóculo e inoculação | 19 |
| 4.2.4 | Avaliação de sobrevivência da BR3262 (Semia 6464) nas misturas poliméricas | 20 |
| 4.2.5 | Verificação do pH | 21 |
| 4.2.6 | Teste de estabilidade dimensional (Separação de fases) | 21 |
| 4.2.7 | Teste de germinação em Casa de Vegetação | 21 |
| 4.2.8 | Experimento em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron: Delineamento experimental e condições de cultivo | 23 |
| 4.2.8.1 | Experimento com garrafas do tipo <i>longneck</i> | 24 |
| 4.2.8.2 | Experimento com tubetes | 25 |
| 4.2.9 | Ensaio de Reologia | 29 |
| 4.2.9.1 | Ensaio Dinâmicos Oscilatórios | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.1 | Preparação das misturas poliméricas | 30 |
| 5.2 | Avaliação da estabilidade dimensional das misturas poliméricas | 30 |
| 5.3 | Avaliação de sobrevivência da BR3262 (Semia 6464) nas misturas poliméricas | 31 |
| 5.4 | Verificação do pH resultados..... | 33 |
| 5.5 | Teste de germinação das sementes de feijão-caupi tratadas com espirulina/CMC não inoculadas: tubetes com substrato. | 33 |
| 5.6 | Teste de germinação das sementes de feijão-caupi tratadas com espirulina/CMC não inoculadas: vasos com solo..... | 34 |
| 5.7 | Experimentos realizados em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron. | 35 |
| 5.7.1 | GARRAFAS DO TIPO <i>LONGNECK</i> : avaliação do número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz das plantas inoculadas com a mistura espirulina/CMC..... | 35 |
| 5.7.2 | TUBETES: Avaliação da massa seca, teor de nitrogênio e acúmulo de N na parte aérea, e teor de clorofila das plantas inoculadas com a mistura espirulina/CMC. | 38 |
| 5.8 | Testes Reológicos Dinâmico Oscilatórios das Soluções espirulina/CMC..... | 41 |
| 5.8.1 | Viscosidade: Análise do comportamento reológico sob cisalhamento contínuo. | 41 |
| 5.8.2 | Avaliação do módulo elástico (G')..... | 42 |
| 5.8.3 | Variação do Crossover com a frequência..... | 43 |
| 5.8.4 | Variação da frequência para diferentes composições..... | 46 |
| 5.8.5 | Teste de fluência e recuperação..... | 47 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 49 |
| 7 | SUGESTÕES | 50 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| 9 | ANEXOS | 64 |
| | ANEXO A: Croqui inicial dos experimentos de longnecks e tubetes em Câmara de Crescimento de Plantas tipo Fitotron na Embrapa Agrobiologia..... | 64 |
| | ANEXO B: Croqui final dos experimentos de longnecks e tubetes em Câmara de Crescimento de Plantas tipo Fitotron na Embrapa Agrobiologia..... | 65 |

1 INTRODUÇÃO

As condições edafoclimáticas do Brasil propiciam a prática da agricultura, sendo essa a principal atividade do setor primário, seja na geração de renda ou de alimento, como na agricultura familiar ou agricultura de subsistência.

Um dos grandes desafios enfrentados pela agricultura é o melhoramento da Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), que pode ser feito através do uso de fertilizantes nitrogenados ou inoculantes rizobianos. O uso desses produtos para FBN aumentam a produtividade agrícola, porém encarecem os custos da produção. Outro grande problema é a transferência de tecnologia para o pequeno e médio agricultor que possui poucos recursos para investir em tecnologia voltada para o campo.

Atualmente, a turfa é o veículo de inoculação mais utilizado na agricultura, embora seja recurso natural oriundo de fonte não renovável e não estar disponível em todas as regiões do mundo. Portanto, a busca por novos produtos para serem utilizados como veículos de inoculação, que venham substituir a turfa, com mesma eficiência, é uma demanda crescente por partes das indústrias nesse setor.

Nesse cenário, várias pesquisas científicas têm investigado e testados diversos materiais como veículo de inoculação. Embora, muitos materiais já tenham sido testados em substituição a turfa, quase nenhum apresentou resultados tecnologicamente aplicável, isso se deve a impossibilidade de se reunir num único material todas as propriedades físicas e químicas apresentadas pela turfa.

Nos últimos anos, uma nova estratégia tem sido desenvolvida para obtenção de materiais que apresentem resultados equivalentes à turfa, que é a utilização de misturas poliméricas. Recentemente, destacou-se a mistura polimérica de carboximetilcelulose (CMC) e amido, com resultados semelhantes aos apresentados pela turfa, no que se refere à biocompatibilidade, a facilidade de preparação e a manutenção de células.

Na busca por outros materiais alternativos, a cianobactéria espirulina apresenta um grande potencial para ser utilizada nessas formulações, uma vez que possui em sua composição proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, entre outros componentes, os quais podem servir como fonte de carbono para o sistema. Além disso, se trata de um produto natural, biodegradável e de fácil obtenção, entretanto de elevado custo.

Por esse motivo, esse trabalho de dissertação teve como objetivo investigar e testar a mistura polimérica espirulina/CMC como veículo de inoculação. Para isso foi utilizada a estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium japonicum*, recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e testada em sementes de feijão-caupi, espécie esta oriunda do semiárido e uma das principais culturas da agricultura familiar.

Para esse experimento foram preparadas várias composições de espirulina/CMC contendo diferentes concentrações de espirulina. Foram realizados testes de germinação, com e sem a estirpe rizobiana, bem como avaliada a sobrevivência de células, o teor de nitrogênio, o teor de clorofila, a massa seca e o número de nódulos. Além disso, foram realizados testes de reologia para avaliação da interação entre as fases espirulina e CMC.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Essa dissertação tem como objetivo principal testar a mistura de espirulina/carboximetilcelulose como veículo de inoculação polimérico para feijão-caupi.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir misturas entre espirulina/CMC com estabilidade dimensional adequada para a aplicação como veículo de inoculação;
- Testar a biocompatibilidade da mistura espirulina/CMC com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*;
- Obter inoculante com desempenho compatível aos resultados obtidos com a turfa em termos de sobrevivência e eficiência;
- Testar o inoculante em sementes de feijão-caupi;
- Realizar estudo da interação espirulina/CMC por reologia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microalgas

Apesar de ser bastante difundido, os termos “microalgas” e “algas” são desprovidos de valor taxonômico (DERNER, *et al.*, 2006), esses englobam microrganismos algais que possuem clorofila ou outros pigmentos fotossintéticos.

As microalgas são responsáveis pela produção de mais oxigênio que todas as plantas juntas existentes no mundo, correspondendo por aproximadamente 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2007). Esses seres pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos que podem ser procariontes ou eucariontes.

Esses organismos microscópicos unicelulares são capazes de formar colônias com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Maior parte dessas espécies é aquática, além de serem dotadas de pigmentos, responsáveis por sua coloração variada e por um metabolismo fotoautotrófico (RAVEN *et al.*, 2005), podendo viver associadas ao fundo do mar, sendo conhecidas como microalgas bentônicas, ou suspensas na coluna d'água, constituindo o fitoplâncton (LOURENÇO, 2006).

A importância econômica das algas é determinada pela diversidade de sua aplicação tecnológica em diversos segmentos, como por exemplo: na indústria alimentícia, de medicamentos, de imunostimulantes, na produção de biocombustíveis e na produção de cosméticos (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

O cultivo de microalgas é praticado há cerca de 140 anos, acompanhando os progressos das Ciências Ambientais, da Fisiologia e da Microbiologia. No Brasil os estudos tiveram início na década de 70.

As microalgas são divididas em quatro grandes grupos, formando uma imensa população de aproximadamente 110 mil espécies: Diatomáceas (*Bacillariophyta*), Algas Verdes (*Chlorophyceae*), Algas azuis (*Cyanophyta*) e Algas Douradas (*Chrysophyceae*) (RAVEN *et al.*, 2005). Considerando que nessa dissertação o foco será voltado para o estudo da espirulina, que faz parte das *Cyanophytas* ou cianofíceas, uma atenção mais detalhada será dada a esse grupo de microalgas.

3.2 Cianobactérias

As cianobactérias ou cianofíceas, conhecidas também como algas azuis, são micro-organismos aeróbicos fotoautotróficos, ou seja, seus processos vitais requerem somente dióxido de carbono, água, substâncias inorgânicas e luz. A fotossíntese é seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo, entretanto, sua organização celular demonstra que esses micro-organismos são procariontes e, portanto, muito semelhantes bioquimicamente e estruturalmente às bactérias (AZEVEDO, 1998). As cianobactérias são caracterizadas por uma grande diversidade morfológica, podendo ser unicelulares ou filamentosas e encontradas na maior parte dos habitats aquáticos e terrestres, inclusive em ambientes inóspitos (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998; FAY, 1983).

A capacidade de crescimento nos mais diferentes meios é uma das principais características das cianobactérias, no entanto, a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro-alcalinas (pH 6-9), com temperaturas entre 15 a 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, sendo dessa forma, os ambientes de água doce mais favoráveis para seu crescimento (PAERL, 2008).

As Cianobactérias são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS) e são fonte biológica de substâncias químicas de uso comercial, como ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos livres, carotenóides, ácidos graxos e ficobiliproteínas (PINOTTI & SEGATO, 1991; MORENO *et al.*, 1998; YALCIN *et al.*, 1994).

A capacidade de produzir EPS é de grande importância e vem sendo relatada desde o início da década de cinquenta (NETO, 2004). Esses EPS (exopolissacarídeos) podem ser encontrados como uma massa mucilaginosa ou formando cápsulas que são estruturas compactas associadas à superfície celular (FAY, 1983). Os EPS excretados pelas cianobactérias também protegem a nitrogenase contra os efeitos nocivos do oxigênio. Para exemplificar, podemos citar a espécie *Nostoc cordubensis*, onde um envelope mucilaginoso (EPS) confere a proteção da atividade da nitrogenase, enzima que reduz o N₂ a N₃ (amônia), contra a inativação promovida pelo oxigênio atmosférico (PROSPERI, 1994). Outro exemplo acontece na bactéria *Cyanothece* BH68 em que os EPS atuam como quelantes de ferro e cálcio, auxiliando na fixação do nitrogênio, além de atuarem também como uma barreira física ao oxigênio (REDDY *et al.*, 1996). Já a espirulina cálcica, um exopolissacarídeo ácido, sulfatado, isolado e extraído com água quente (HAYAKAWA *et al.*, 1997), extraída da *Spirulina platensis*, tem apresentado uma potente atividade contra

os vírus herpes simplex tipo 1 e da imunodeficiência humana tipo 1 (LEE *et al.*, 2000). Esta substância também tem se mostrado eficiente contra o citomegalovírus humano, vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus da gripe tipo A e HIV-1, promovendo uma inibição seletiva da penetração do vírus nas células do hospedeiro (HAYASHI & HAYASHI, 1996)

Em algumas cianobactérias simbióticas com plantas superiores, o exopolissacarídeo (EPS) pode atuar como adesivo para as células, como por exemplo, o EPS da simbiote *Anabaena azollae* que é considerado essencial para fixação desta cianobactéria na planta hospedeira *Azolla filiculoides* (NETO, 2004).

Segundo De Caire *et al.* (2000), os EPS podem ser utilizados como inoculante em solos, como exemplo de aplicação podemos citar o uso da biomassa (EPS) das cianobactérias *Tolypothrix tenuis* e *Microchaete tenera*, que quando inoculados no solo, aumentaram a atividade de várias enzimas como protease (76-90%, 101-136%), fosfomonoesterase (19-27%, 13-22%) , arilsulfatase (148-167%, 406-174%) e desidrogenase (16-32%, 43-30%), decompondo resíduos orgânicos, resultando num aumento final da fertilidade.

Becker, em 1981, relatou o uso de cianobactérias fixadoras de nitrogênio em campos de arroz alagados em várias partes do mundo para o aumento da produtividade. Nesse caso, a fertilidade dos solos de arroz é mantida pela atividade de cianobactérias, que crescem abundantemente nesses campos, realizando a fixação do nitrogênio atmosférico, sofrendo também decomposição química que acarreta num aumento da quantidade de substâncias orgânicas do solo.

Outra aplicação tecnológica das cianobactérias tem sido voltada para proteção ambiental na degradação de resíduos (PINOTTI & SEGATO, 1991). Benemann (1990) mostrou que as cianobactérias apresentam capacidade de adsorver metais pesados, podendo ser utilizadas para remoção de vários metais no tratamento de água e ainda remoção de metais na mineração.

Pesquisas voltadas para geração de energia têm mostrado que a biomassa algal, especialmente algas que crescem em águas residuárias, podem ser utilizada na produção de energia, produzindo o biogás metano (BECKER, 1981; BENEMANN, 1990).

Na piscicultura, a biomassa pode ser usada como alternativa à farinha de peixe que apresenta alto custo e na alimentação humana é utilizada como suplemento alimentar (PINOTTI & SEGATO, 1991).

3.3 Espirulina

A espirulina é uma cianobactéria que descende dos primeiros seres fotossintetizantes e apresenta os maiores índices de produção de biomassa dentre as espécies do planeta.

Quando comparadas aos vegetais superiores e aos animais, como fontes de produtos e nutrientes imprescindíveis para a qualidade de vida do homem, estas levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem e facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para a agricultura (ANTELO *et al*, 2015). Além disso, o cultivo da espirulina pode ser direcionado para a produção de vários compostos de interesse comercial, tais como a ficocianina, clorofila a, b-caroteno, biomassa, vitaminas, polissacarídeos, ácido g-linolênico e enzimas (COZZA, 1999).

A classificação da espécie utilizada nessa dissertação é (GUIRY & GUIRY, 2015):

- **Império:** Prokaryota;
- **Reino:** Eubacteria;
- **Sub Reino:** Negibacteria;
- **Filo:** Cyanobacteria;
- **Classe:** Cyanophyceae;
- **Sub Classe:** Oscillatoriophycideae;
- **Ordem:** Oscillatoriales;
- **Família:** Spirulinaceae;
- **Gênero:** *Spirulina*;
- **Espécie:** *Spirulina platensis*.

A espirulina, apesar de unicelular, se agrupa formando tricomas ou formas filamentosas com até 1 mm de comprimento dispostas em espiral (Figura 1), com diâmetro das células variando de 1 a 3 µm nas espécies pequenas e de 3 a 12 µm nas grandes. As espécies maiores de espirulina como *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima* possuem um citoplasma granular contendo vacúolos gasosos (RICHMOND, 1990).



Figura 1 - *Spirulina platensis*. Fonte: Universidade do Texas, 2015.

Assim como os vegetais superiores, a principal fonte de energia é proveniente da luz solar através do processo de fotossíntese (VONSHAK, 1997).

A composição da espirulina se dá por aproximadamente 50 a 60% de proteínas, 5 a 15% de lipídios e 10 a 20% de carboidratos (HENRIKSON, 1994; RICHMOND, 1990; VONSHAK, 1997). Possui aproximadamente 4% de ácidos nucleicos, além de outros produtos como pigmentos (carotenóides, ficocianina e clorofila), vitaminas e ácidos graxos polinsaturados como o ômega 3 (PELIZER, 2003). Essas características possibilitam o uso da espirulina na alimentação humana, ração animal e na química fina (HENRIKSON, 1994).

A Europa, Japão e Costa Asiática do Pacífico possuem autorização legal para utilizar a espirulina como alimento ou complemento alimentar. Em 1981, foi determinado nos Estados Unidos pelo FDA (Food and Drug Administration) que a espirulina constitui fonte de proteínas e contém várias vitaminas e minerais, podendo ser comercializada legalmente como complemento alimentar (HENRIKSON, 1994).

No Japão, o pigmento ficocianina, extraído da espirulina, é usado como corante em produtos derivados do leite (KATO, 1987), gomas de mascar (LOTTE, 1980), sorvetes e bebidas (KATO, 1987).

A espirulina tem sido amplamente estudada devida a sua composição possuir substâncias de alto valor nutricional, e devido a suas propriedades terapêuticas. As principais propriedades já estudadas e confirmadas são: redução da hiperlipidemia, diminuindo os níveis de colesterol e de lipoproteína de baixa densidade, aumentando níveis de lipoproteína de alta densidade; atividade anticarcinogênica, prevenindo tumores; efeito

radioprotetor, havendo significativa redução de problemas causados por radiações gama; melhoria de problemas renais, apresentando efeito protetor contra insuficiência renal; proteção da flora intestinal, havendo aumento da quantidade de *Lactobacillus* no intestino; efeito contra diabetes, diminuindo os níveis de glicose no soro; diminuição da obesidade, mostrando redução estatisticamente significativa no peso corporal de pacientes obesos; redução de hipertensão e pressão sanguínea; inibição da redução anafilática (COLLA, 2002; ESTRADA *et al.*, 2001; TORRES DURÁN *et al.*, 1999; MIRANDA *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1997; RAMAMOORTHY & PREMAKUMARI, 1996; BELAY *et al.*, 1993; IWATA *et al.*, 1990; IWATA *et al.*, 1987).

No Brasil, a espirulina tem sido empregada, basicamente, na produção de cápsulas destinadas a dietas de emagrecimento (ANTELO *et al.*, 2015). Também tem sido utilizada em formulações de alto teor nutritivo, servindo de complementação proteica e vitamínica (HENRIKSON, 1994).

Considerando que esta dissertação versa sobre a mistura espirulina/carboximetilcelulose, adiante serão abordados alguns aspectos relevantes sobre a CMC.

3.4 Carboximetilcelulose

Os polímeros naturais compõem o grupo de polímeros derivados de plantas e animais, representados por materiais como madeira, borracha, algodão, lã, couro e seda, entre outros, podendo ainda ser incluído neste grupo as proteínas, enzimas, amidos e celulose (CALLISTER, 2002; PESTANA, 2009).

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, que pode ser obtida por meio da reação de celulose mercerizada com o monocloroacetato (CRUZ, 2011). A carboximetilcelulose é normalmente comercializada na forma sódica (sal de sódio), ou seja, como carboximetilcelulose de sódio.

A literatura registra que o comportamento reológico de dispersões de CMC é influenciado pelo tipo de CMC (diferenciados pelo grau de polimerização e grau de substituição), temperatura e concentração (PILIZOTA, 1996), portanto, quando em baixas concentrações, as moléculas de CMC se apresentam na maior parte em conformação estendida (rod-like) devido a repulsão eletrostática distribuída ao longo da cadeia principal

do polímero. Já em altas concentrações, as moléculas se enovelam, ocorrendo o emaranhamento, conduzindo a formação de um gel termorreversível. Quando há uma diminuição da força iônica, assim como a redução do pH, há diminuição da viscosidade conduzindo o polímero a uma conformação ainda mais espiralada (KÄISTNER, 1996).

A estrutura da Carboximetilcelulose, mostrada na Figura 2, é baseada no polímero β -(1,4)-D-glucopiranoose da celulose.

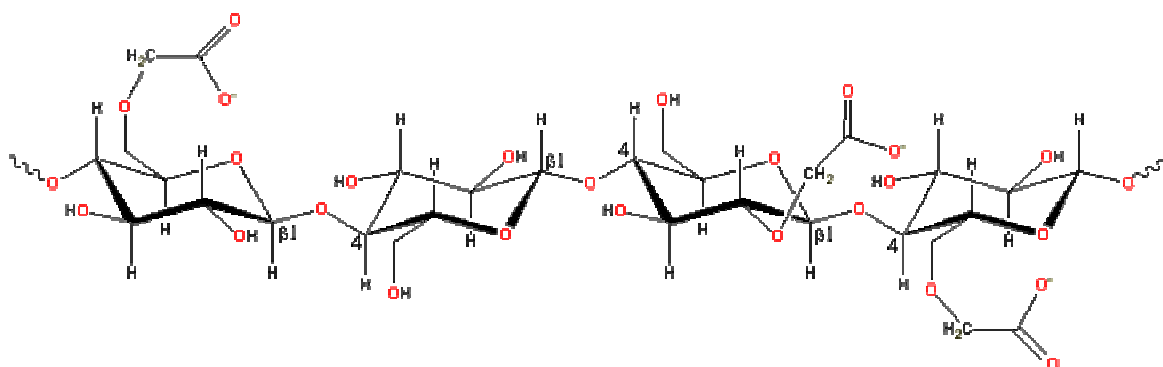


Figura 2 - Estrutura química da Carboximetilcelulose. Fonte: KÄINSTER et al., 1996.

A CMC apresenta ampla aplicação tecnológica por apresentar boa solubilidade na água fria e quente, como modificador de viscosidade de solução, habilidade para formar filmes, boa adesividade, estabilidade de suspensão, retenção da água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos (ALHAMDAN & SASTRY, 1990; PILIZOTA *et al.*, 1996).

Trabalhos realizados por Fernandes Júnior (2006) e Rhor (2007) mostraram o uso da mistura polimérica CMC/Amido como veículo de inoculação para rizóbio em culturas de feijão-caupi. Os resultados desses trabalhos mostraram-se similares aos resultados obtidos com a turfa, mostrando que é possível obter composições poliméricas que atendam as exigências para um veículo de inoculação de células rizobianas.

3.5 Feijão-caupi

O feijão-caupi é uma planta dicotiledônea, que segundo Verdcourt (1970), Marechal *et al.*, (1978) e Padulosi & Ng (1997) citado por Freire Filho *et al.*, (2005) apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- **Ordem:** Fabales;
- **Família:** Fabaceae;
- **Subfamília:** Faboideae;
- **Tribo:** Phaseoleae;
- **Subtribo:** Phaseolinae;
- **Gênero:** *Vigna*;
- **Subgênero:** *Vigna*;
- **Seção:** *Catjang*;
- **Espécie:** *Vigna unguiculata* (L.) Walp;

No Norte e Nordeste do Brasil, o feijão-caupi é um alimento básico para a população, por ser uma excelente fonte de proteínas, possuindo a maioria dos aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de ter grande quantidade de fibras e baixa quantidade de gordura (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Cultivado no Brasil, predominantemente no sertão do semiárido do Nordeste, é conhecido nas regiões de cultivo como: Nordeste (Feijão macassa, Feijão macassar, Feijão-de-corda, Feijão-de-moita), Norte (Feijão-de-praia), Bahia (Feijão Catador), Bahia e norte de Minas Gerais (Feijão gurutuba), Maranhão (Trepá-pau), Bahia e Rio de Janeiro (Feijão Fradinho) e no Sul (Feijão Miúdo) (DERAL/SEAB, 2013).

No mundo, a área de plantio ocupada pelo feijão-caupi é aproximadamente 12,5 milhões de ha, produzindo cerca de três milhões de Kg/ano (WANDER, 2013). Sendo que 64% da área ocupada mundial, equivalente a oito milhões de hectares, está localizada na parte oeste e central da África (FAO, 1999).

O feijão-caupi é responsável por 34% e 15,6%, respectivamente, da área plantada e a produção de feijão do Brasil. Para cada hectare cultivado gera-se um emprego/ano. Considerando o consumo per capita de 19,56 kg/pessoa/ano e o preço médio histórico da saca de US\$ 31,96 na safra de 2006, foram gerados no Brasil 1.375.725 empregos, com produção suficiente para alimentar 27,6 milhões de pessoas e com valor de produção correspondente a US\$ 287 milhões (OLIVEIRA, 2008).

Para avaliar a importância do feijão-caupi, essa cultura é responsável pela geração de 1.451.578 empregos por ano no Brasil, movimentando um valor global de negócios estimado em US\$ 249.142.582,00/ano (SINGHT *et al.*, 2002) .

Segundo dados da FAO (2013), a produção mundial média de feijão-caupi entre 2007 e 2011 foi 5,6 milhões de toneladas (Tabela 1). O principal país produtor de caupi é a Nigéria que responde por 48% da produção mundial. Em seguida vem o Níger, com 24% do volume total médio e em terceiro Burkina Faso com 8%. As três nações respondem por 80% da produção mundial de feijão- caupi seco.

Tabela 1 - Produção mundial média de feijão-caupi entre 2007 e 2011. (Fonte: FAO, 2013).

| Feijão-caupi seco – Produção Mundial – 2007 a 2011 | | | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| (em toneladas) | | | | | | | |
| Países | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | Média | Part. (%) |
| Nigéria | 3.000.000 | 2.916.000 | 2.371.640 | 3.368.250 | 1.860.800 | 2.703.338 | 48 |
| Níger | 1.001.139 | 1.543.943 | 787.472 | 1.744.464 | 1.517.142 | 1.324.832 | 24 |
| Burkina Faso | 253.190 | 537.680 | 453.429 | 626.113 | 441.015 | 462.285 | 8 |
| Outros | 942.304 | 1.111.232 | 1.284.014 | 1.144.341 | 1.133.425 | 1.123.063 | 20 |
| Total | 5.196.633 | 6.108.855 | 4.896.555 | 6.913.168 | 4.952.382 | 5.613.519 | 100 |

O feijão-caupi também é uma cultura importante na América do Sul, América Central, Sul dos Estados Unidos, Ásia, Oceania e Sudeste da Europa (LANGYINTUO *et al.*, 2005). No Brasil a produção de feijão-caupi está inserida no total da produção nacional.

Acredita-se que a estimativa de produção segundo os dados da FAO, esteja subestimada, considerando que vários países, como Índia, Myanmar e Brasil, não fornecem dados estatísticos que separem feijão-caupi e feijão-comum, apesar de terem um volume expressivo de produção do produto (WANDER, 2013).

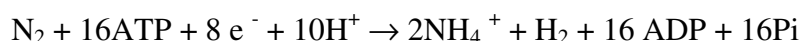
3.6 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio gasoso constitui aproximadamente 78% do ar atmosférico e, apenas 5% do nitrogênio existente no solo encontra-se na forma inorgânica, como amônio e nitrato, formas assimiláveis pelas plantas, os outros 95% encontra-se sob forma orgânica e

não assimilável pelas plantas (BARBOZA *et al.*, 2010). É o elemento mais importante e também o mais caro para produção na agricultura tropical, constituinte das proteínas, o nitrogênio está presente em compostos orgânicos, além de ter papel fundamental no metabolismo vegetal. O nitrogênio é essencial para estrutura e funções nas células para todas as reações enzimáticas nos vegetais, é componente das vitaminas como, biotina, tiamina, niacina, riboflavina, além de atuar na produção e uso de carboidratos (TASCA 2009).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico (N₂), não assimilável para a maioria dos organismos, se torna fisiologicamente e metabolicamente disponível sob a forma de amônia (NH₃) (DAMASCENO, 2011).

Apesar da habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico ser uma característica primordialmente dos procariotos, as condições fisiológicas e de especificidade necessárias variam entre as diversas espécies de micro-organismos (BURNS & HARDY, 1975; LONG, 1989). Apenas um pequeno número de micro-organismos na natureza, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, como bactérias do gênero *Rhizobium* ou *Azorhizobium* (DÖBEREINER, 1997) é capaz de reduzir N₂ a NH₃, através da complexação enzimática da nitrogenase (SILVA, 2009):



Dentre os processos de FBN existentes, se destaca a associação simbiótica entre as bactérias que vivem no solo, chamadas de rizóbios e plantas pertencentes à família das leguminosas (DAMASCENO, 2011). A simbiose entre leguminosas e rizóbios é a fonte mais importante de nitrogênio (N) fixado biologicamente em sistemas agrícolas (GRAHAM & VANCE, 2000).

As leguminosas possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas superiores com bactérias gênero *Rhizobium* (DÖBEREINER, 1989), sendo capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Após a formação de nódulos nas raízes estes micro-organismos transferem o N₂ reduzido às leguminosas, e os carboidratos produzidos por essas plantas são fornecidos às bactérias, servindo como fontes de energia, ocorrendo assim uma simbiose (ESPINDOLA *et al.*, 2005).

Estima-se que a fixação anual de N₂ por leguminosas de importância agrícola seja de 44 a 66 milhões de toneladas métricas e 3 a 5 milhões de toneladas métricas de N são

fixados por leguminosas em ecossistemas naturais, correspondendo a mais da metade de todo o N usado na agricultura (GRAHAM & VANCE, 2003).

Dessa forma, é possível aumentar a produtividade e substituir os adubos nitrogenados minerais através da otimização da FBN (FRANCO *et al.* 2002), que além de fornecer alimento à planta e trazer ganhos ambientais pela redução da poluição de lagos, rios e lençóis freáticos por nitrato, tem papel relevante na redução da emissão de gases de efeito estufa relacionado à fabricação e uso de adubos químicos (MENDES, 2010).

3.7 Inoculantes e veículos de inoculação

No Brasil, a produção de inoculante iniciou-se na década de 1950 (FREIRE, 1968), sendo considerado inoculante, todo produto que contenha micro-organismos com ação estimulante para o crescimento das plantas (RELARE, 2004).

A turfa, que do ponto de vista geológico, é um combustível fóssil de idade recente, resultante da lenta decomposição de vegetais em ambiente aquoso (FERNANDES JÚNIOR, 2006), é o veículo de inoculação mais utilizado no Brasil, especialmente porque além de possibilitar a manutenção de elevado número de bactérias viáveis, oferece proteção física contra adversidades do solo (LUPWAYI *et al.*, 2005; ZILLI *et al.*, 2010).

No entanto, a turfa apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de se encontrar turfeiras com características ideais (pH entre 3,5 a 8,5, boa retenção de água e alta capacidade de troca catiônica (MELO *et al.*, 2006) para a sobrevivência do rizóbio, o que implica no transporte deste material por longas distâncias (DEAKER *et al.*, 2004); Dificuldade ou ausência em alguns países devido às políticas de preservação de regiões de terras úmidas (TEMPRANO *et al.* 2002); Necessidade de esterilização, podendo produzir substâncias tóxicas às células rizobianas (DAZA *et al.*, 2000); Necessidade de correção do pH com carbonato de cálcio ou magnésio (DEAKER *et al.*, 2004; DAZA *et al.*, 2000); Necessidade de manutenção da umidade em torno de 40 a 50% para a proliferação e viabilidade das células rizobianas (FERNANDES JÚNIOR, 2006).

O mercado brasileiro de inoculantes com estirpes de rizóbios é um dos maiores do mundo, sendo comercializadas mais de 23 milhões de doses por ano, das quais mais de 95% são destinadas para a cultura da soja e cerca de 4% para cultura do feijão (CHUEIRE *et al.*, 2003).

Na cultura da soja, a fertilização química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes, o que representou uma economia para o país de cerca de US\$ 3 bilhões, no ano de 2005 (HUNGRIA *et al.*, 2005).

A oferta de inoculantes no mercado nacional é bem variada, podendo ser encontrados inoculantes turfosos, líquidos, géis e liofilizados (SCHUH, 2005).

Alguns veículos inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação na agricultura tem sido alvo de intensas pesquisas como, por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pó de carvão, lignita, entre outros (PANDEY & MAHESHWARI, 2007).

As qualidades desejadas para um bom veículo de inoculação são: facilidade de obtenção, baixo custo, ser inerte ao rizóbio, ser facilmente esterilizável (autoclave ou radiação), proporcionar boa adesão às sementes, manter as características de infectividade e efetividade das estirpes inoculadas durante o período de estocagem e não ser tóxico às pessoas, animais e plantas (KEYSER, 1992).

Polímeros biodegradáveis têm sido apontados como veículos ecologicamente seguros, por serem degradados pela ação de micro-organismos sem causar danos ao meio ambiente (ROSA *et al.*, 2001), como o alginato e a goma xantana que além de serem biodegradáveis são de baixo custo e promovem o encapsulamento das células, liberando-as após a degradação do material no ambiente e protegendo as células contra estresses ambientais, podendo favorecer a multiplicação e sobrevivência das células, quando aplicados ao solo (DENARDIN & FREIRE, 2000; BASHAN *et al.*, 2002).

A goma arábica, metilcelulose e polivinilpirrolidona (PVP) podem ser usadas como adesivos para inoculantes turfosos que contêm células de rizóbio, para auxiliar na cobertura das sementes, proteger as células bacterianas contra a dessecação durante a secagem a vácuo e, assim, aumentar a sobrevivência celular (DEAKER *et al.*, 2004; DEAKER *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009).

A carboximetilcelulose tem sido utilizada na mistura carboximetilcelulose/amido como veículo de inoculação para rizóbio, obtendo-se resultados de eficiência equivalentes aos da turfa. (RHOR, 2007; FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2009).

3.8 Aspectos reológicos de misturas poliméricas

A reologia ficou conhecida por Newton e Hooke no século XVII, mas foi somente em 1920, quando o comportamento mecânico de materiais industriais como a borracha, o plástico, a cerâmica, as tintas e os fluidos biológicos passou a ser do interesse da física, da mecânica, da matemática e da química que surgiu a necessidade do estudo da reologia (TANNER, 1988).

O termo reologia provém do grego (*rheo* = fluir; *logos* = ciência), significando, então, "a ciência dos fluidos", e foi sugerido por Bingham e Crawford (1929) para descrever o fluxo de líquidos e a deformação dos sólidos.

Segundo Schlumberger (1982) ela é um ramo da física e se relaciona com a mecânica dos corpos deformáveis. Portanto, reologia é a ciência que estuda como a matéria se deforma ou escoou, quando submetida a esforços originados por forças externas, podendo ser essa deformação reversível ou irreversível. As propriedades reológicas de uma substância podem ser dependentes do tempo e da taxa de cisalhamento ou variar com a continuidade da deformação (BARNES *et al.*, 1991).

Na prática, a reologia está direcionada a materiais cujas propriedades do escoamento são mais complicadas do que as de um fluido simples (líquido ou gás) ou as de um sólido elástico ideal. No entanto, é sabido que sob uma restrita variação da condição de ensaio, um material considerado simples poderá exibir um comportamento mais complexo sob outras condições (TATTERSALL & BANFILL, 1983).

Em relação aos polímeros, o comportamento reológico se diferencia do comportamento observado nos fluidos newtonianos, pois além de ter um caráter pseudoplástico, são também viscoelásticos, possuindo um comportamento reológico intermediário ao comportamento Hookeano e Newtoniano (VASQUEZ, 2007), devido existência de cadeias poliméricas de elevada massa molar, conformações e diferentes graus internos de liberdade. Através dos estudos reológicos de sistemas poliméricos é possível uma melhor compreensão da estrutura molecular de muitos tipos de polímeros, e da forma como esta conformação estrutural afeta o comportamento reológico (ROHR, 2007), auxiliando no desenvolvimento de novos produtos e na melhoria dos já existentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para os experimentos desta dissertação foi utilizada a biomassa de *Spirulina platensis* em granulados proveniente da Brasil Vital® e a carboximetilcelulose de média viscosidade (2000-3000 cP) da marca Quimesp S.A..

Foi utilizada a estirpe BR3262 de *Bradyrhizobium japonicum*, testada na cultivar BRS Guariba de feijão-caupi.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das misturas poliméricas

A biomassa de espirulina foi triturada utilizando um moinho analítico do tipo A-10 da Tekmar a fim de melhorar a sua solubilização no preparo da mistura.

Foram preparadas misturas com composições de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30% e 40% de massa de espirulina. As misturas poliméricas foram preparadas com o auxílio de um liquidificador. As quantidades de espirulina e CMC foram ajustadas para 300 mL de água destilada (Figura 3).

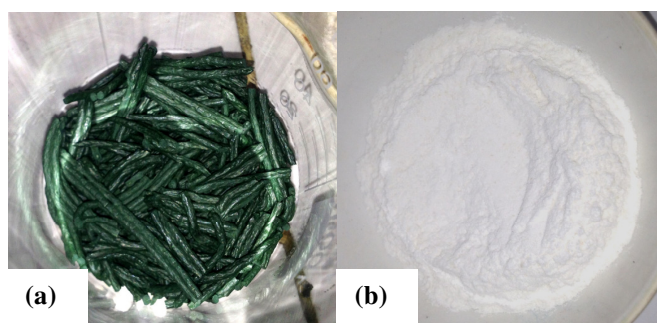


Figura 3 - (a) Espirulina seca e (b) Carboximetilcelulose.

Para o preparo, o volume total de água foi colocado no liquidificador, e foi adicionada a espirulina, seguida de uma leve agitação. Em seguida, foi adicionada a CMC e a mistura foi novamente agitada até formar uma solução de aparência homogênea (Figura 4a).

Posteriormente, as misturas (4a) foram condicionadas em tubos Falcon (Figura 4b) ou em sacos plásticos autoclaváveis que foram selados (Figura 4cd), onde permaneceram em temperatura ambiente até o dia seguinte (*overnight*) para serem esterilizados por autoclave.

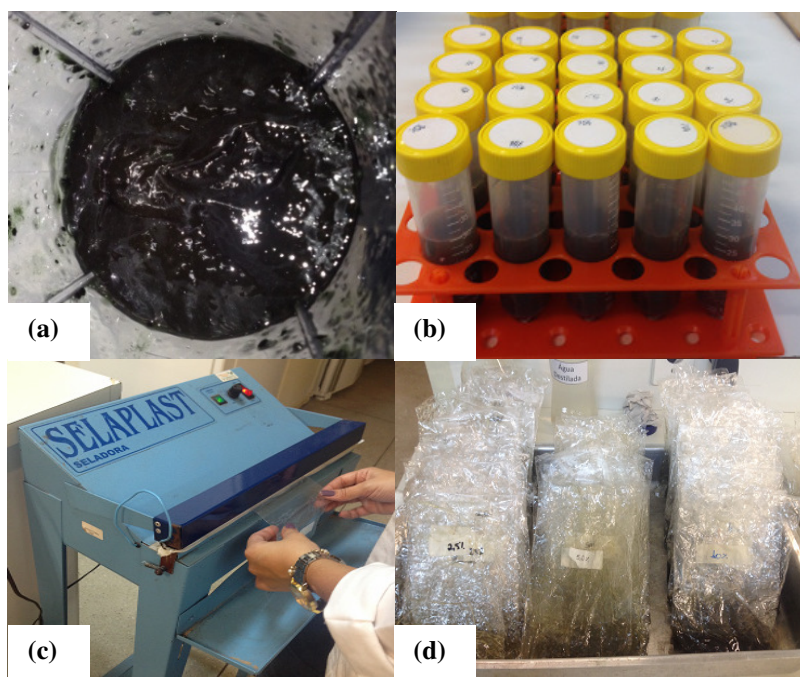


Figura 4- Preparação das misturas poliméricas. (a) Preparo das misturas em liquidificadores. (b) Misturas em tubos falcon (c) Sacos sendo selados. (d) Misturas em sacos autoclaváveis.

4.2.2 Estirpe bacteriana: condições de crescimento e incubação

A estirpe BR 3262 (Semia 6464) de *Bradyrhizobium japonicum* recomendada para a cultura do feijão-caupi (ZILLI *et al.*, 2008), foi retirada do superfreezer da Embrapa Agrobiologia e crescida em placa de petri com meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) (Tabela 2) com pH ajustado para 6.8 durante 10 dias (Figura 5a).

Tabela 2 - Composição do meio YMA (Vincent, 1970).

| Reagente | Quantidade para 1L de solução |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Manitol | 10 g |
| Solução de K_2HPO_4 10% | 1 mL |
| Solução de KH_2PO_4 | 4 mL |
| Solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10% | 2 mL |
| Solução de NaCl 10% | 1 mL |
| Azul de Bromotimol | 5 mL |
| Extrato de Levedura | 400 mg |
| Ágar bacteriológico | 15 g |
| Água destilada q.s.p. | 1000 mL |

Após 10 dias, foi retirada uma alíquota da cultura e passada para erlenmeyers contendo meio YM (Figura 5b). Os erlenmeyers foram colocados em *shakers* sob agitação orbital por seis dias, com velocidade constante de 150 RPM e temperatura de 28°C (Figura 5c).

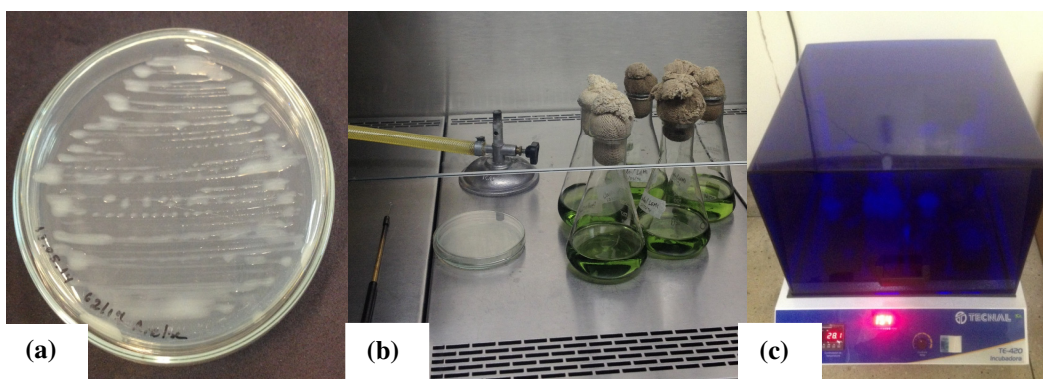


Figura 5- (a) Estirpe retirada do superfreezer e crescida em placa de petri. (b) Passagem das bactérias para meio líquido. (c) Erlenmeyers no *shaker* para crescimento das bactérias.

4.2.3 Preparo do inóculo e inoculação

Após o período de crescimento, o meio de cultivo crescido foi centrifugado a aproximadamente 2500 x g por 10 minutos a 4°C (Figura 6a).

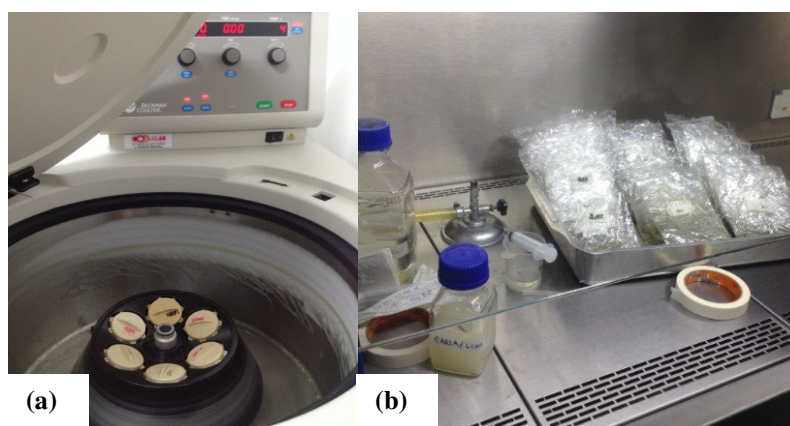


Figura 6 – Preparo do inóculo: (a) Suspensão sendo centrifugada. (b) Inoculação das misturas poliméricas.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as bactérias foi ressuspenso em água destilada estéril. Foram inoculados 5 mL da suspensão bacteriana em 25 mL do gel formado pela mistura polimérica e agitado manualmente para incorporação das células à matriz polimérica (Figura 6a). O inoculante, formado pelas composições poliméricas contendo células rizobianas, foi incubado à temperatura ambiente, por um período de até 47 dias. Durante o tempo de incubação foram realizadas contagens utilizando diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-9} em placas de petri contendo o meio de cultura YMA (VINCENT, 1970).

4.2.4 Avaliação de sobrevivência da BR3262 (Semia 6464) nas misturas poliméricas

Foram selecionadas três concentrações (2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina), com três repetições, para a inoculação com rizóbio da estirpe BR3262 na densidade de 10^9 células g^{-1} .

As contagens foram feitas em placas de petri, contendo meio YMA (VINCENT, 1970) com pH ajustado em 6,8, pelo método da gota (Drop plate) (MILES e MISRA, 1938), adotado pela RELARE, que consiste em semear uma gota (10 μ l), por setor das diluições seriadas. As placas com meio de cultura foram divididas em seis setores e a semeadura foi realizada através da gota de cada diluição (Figura 7).

As placas inoculadas foram incubadas a 30°C por um período de quatro a cinco dias para contagens das unidades formadoras de colônia (UFC).

Esse procedimento foi realizado no 3° dia, 7° dia 14° dia e 30° dia a para avaliar a sobrevivência do rizóbio na mistura Espirulina/CMC.

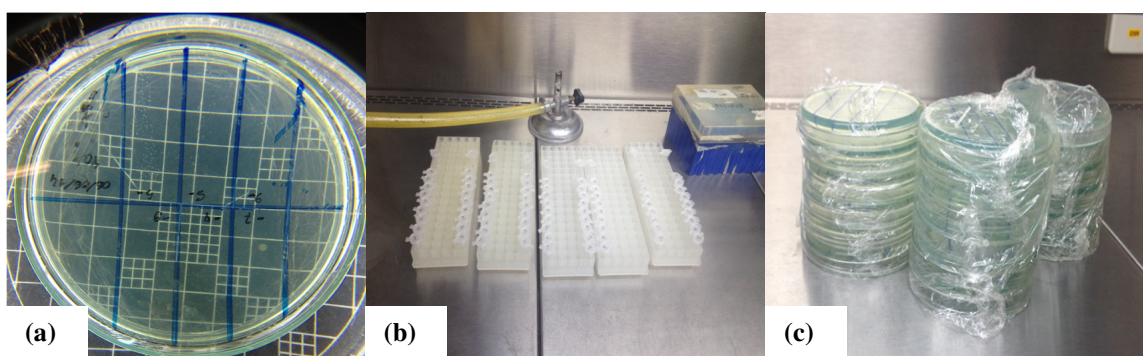


Figura 7 – Contagem de bactérias através do método da gota: (a) placas de petri com meio YMA (b) diluição seriada (c) placas inoculadas.

4.2.5 Verificação do pH

A verificação do pH foi feita antes da inoculação e após sete dias de incubação das misturas inoculadas, utilizando-se tiras indicadoras de pH na faixa de 0 a 14 da marca Merck.

4.2.6 Teste de estabilidade dimensional (Separação de fases)

Para o teste de estabilidade dimensional foram utilizadas as mesmas concentrações utilizadas na avaliação de sobrevivência de rizóbios (2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina), porém sem células rizobianas. As misturas autoclavadas foram armazenadas em tubos tipo Falcon, em temperatura ambiente (aproximadamente 26°C).

A análise visual foi realizada durante oito dias, a fim de avaliar a estabilidade, através da separação de fases.

4.2.7 Teste de germinação em Casa de Vegetação

O teste foi realizado com objetivo de avaliar o efeito da mistura polimérica espirulina/CMC na germinação de sementes de feijão-caupi.

Para isto, foram conduzidos dois experimentos em Casa de Vegetação na Embrapa Agrobiologia, um em tubete contendo substrato Multiplant® e outro em vaso de 1 kg contendo solo SIPA (Fazendinha Agroecológica KM 47).

Foram selecionadas as composições poliméricas contendo 2,5%, 5%, 10%, 20% e 30% de massa de espirulina e um controle absoluto (semente nua). As sementes foram colocadas em placas de petri (Figura 8a) com as misturas poliméricas de modo que as

sementes fossem totalmente cobertas pela mistura polimérica. Posteriormente, foram colocadas em papel até a secagem (30 minutos) para a peletização (Figura 8b).

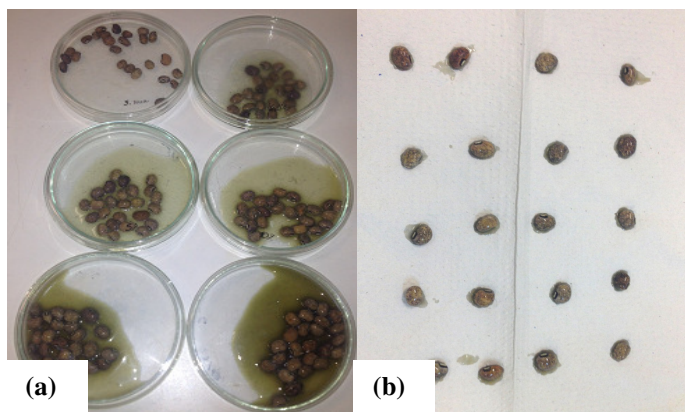


Figura 8 – (a) Sementes imersas nas misturas poliméricas. (b) Secagem das sementes para a peletização.

O experimento em tubetes foi realizado em triplicata e foram colocadas três sementes em cada tubete. Para o experimento com vaso foram colocadas 10 sementes em cada vaso sem repetição (Figura 9a).

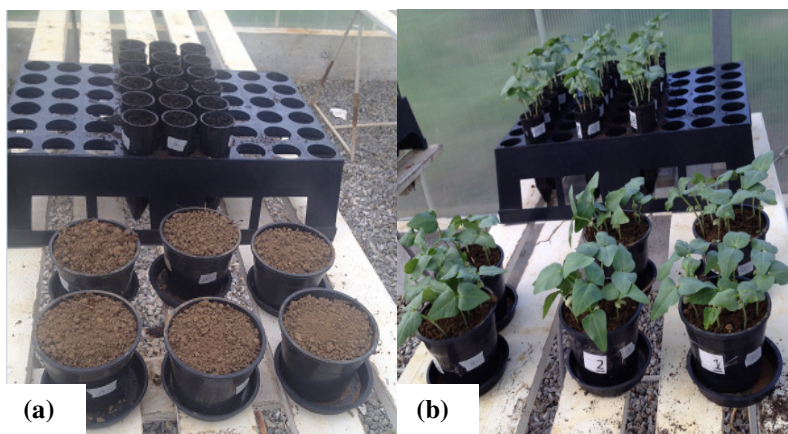


Figura 9- (a) Preparação dos vasos com solo SIPA e tubetes com substrato para o teste de germinação. (b) Plantas germinadas.

Após oito dias, as plantas do feijão-caupi foram coletadas a (Figura 9b) e as raízes foram separadas da parte aérea na altura do nó cotiledonar. Posteriormente, a raiz e a parte aérea foram colocadas em sacos de papel (Figura 10a) e secas em estufa (60°C por 72 horas) e pesadas (Figura 10b) para determinação da massa de matéria seca. As variáveis analisadas foram: massa seca de raiz, massa seca de parte aérea e altura (somente em tubetes).



Figura 10 – (a) Plantas condicionadas em sacos de papel para secagem para avaliação da massa seca. (b) Pesagem da parte aérea das plantas.

4.2.8 Experimento em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron: Delineamento experimental e condições de cultivo

Os experimentos em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron tiveram como objetivo avaliar a possibilidade da utilização das misturas poliméricas como veículo de inoculação de rizóbio em feijão-caupi, comparativamente à turfa, veículo de inoculação mais utilizado no Brasil.

Inicialmente, os experimentos foram montados em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, RJ. No entanto, devido às condições climáticas desfavoráveis, o experimento foi perdido. Como alternativa, foram feitos novos experimentos em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron, com condições de temperatura (30° dia e 25° noite) e umidade (60%) controladas e monitoramento de CO₂.

Foram montados dois experimentos, utilizando-se garrafas do tipo *longneck* com solução nutritiva de Norris (NORRIS & DATE, 1976) estéril e tubetes com substrato Multiplant®, como mostrado na Figura 11.

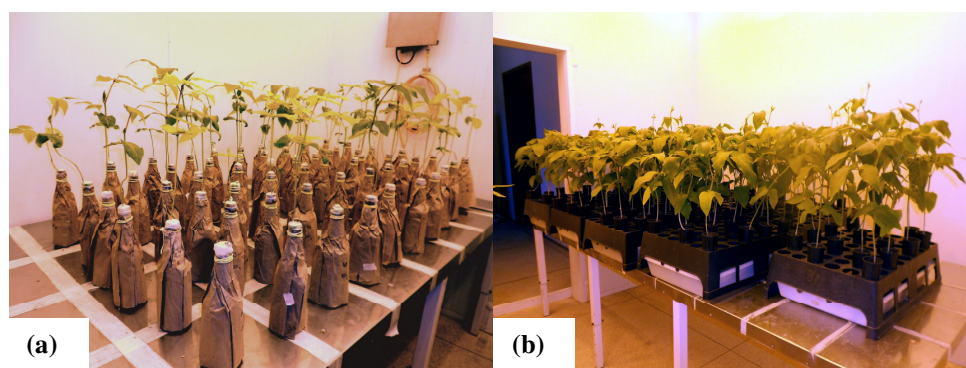


Figura 11 - Visão geral dos experimentos em garrafas do tipo *longneck* (a) e tubetes (b), em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica (RJ), em 2014.

Para esses experimentos, foram utilizadas cinco diferentes composições da mistura polimérica espirulina/CMC, com dois tempos de estocagem da mistura. Sendo as composições 2.5%, 5%, 10%, 20% e 30% de massa de espirulina e os tempos de estocagem 13 e 47 dias.

Os experimentos foram conduzidos entre novembro e dezembro de 2014, com delineamento experimental em blocos ao acaso, com 10 repetições para os tubetes e cinco repetições para as garrafas do tipo *longneck*, totalizando 120 tubetes e 60 garrafas do tipo *longneck*.

Em todos os experimentos, foi utilizada a cultivar BRS Guariba de feijão-caupi. Para a desinfestação, as sementes de feijão-caupi foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida, imersas em peróxido de hidrogênio por cinco minutos, sendo lavadas dez vezes em água destilada autoclavada.

4.2.8.1 Experimento com garrafas do tipo *longneck*

Para as garrafas do tipo *longneck* (Figura 12a), as plantas foram pré-germinadas em placas de petri com ágar- H₂O. Após a emissão da radícula (Figura 12b), as plântulas foram inoculadas colocando-se, com o auxílio de uma pipeta, 1 mL de inoculante no sistema radicular (Figura 12c). Após a inoculação, os caules das plântulas, envolvidos por algodão, foram cobertos com papel alumínio para o cultivo estéril em solução nutritiva de Norris (NORRIS & DATE, 1976) (Figura 12d). Conforme o crescimento, o papel alumínio foi retirado e foi colocado parafilm em volta do caule, evitando a contaminação do experimento.

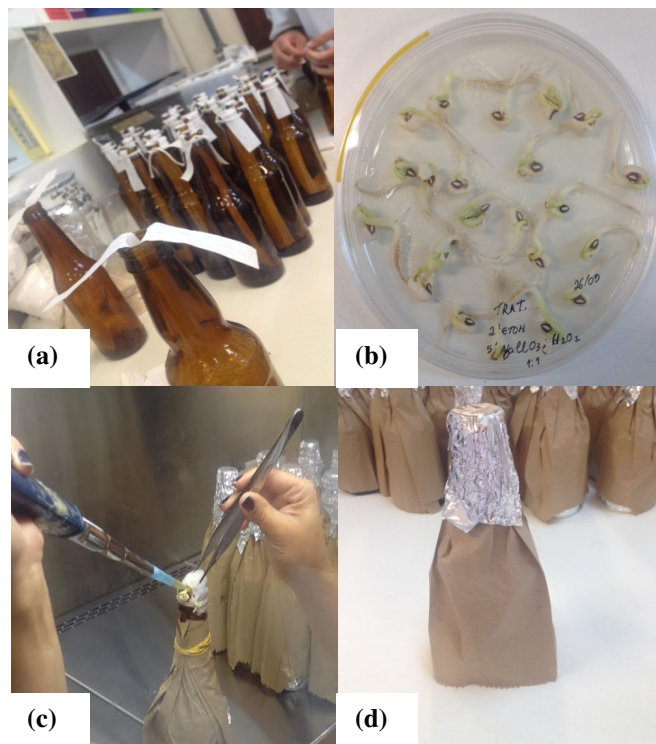


Figura 12- (a) Preparação das garrafas do tipo *longneck*. (b) Pré-germinação das sementes de feijão-caupi. (c) Inoculação das sementes de feijão-caupi. (d) Garrafas do tipo *longneck* com sementes inoculadas.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos ao acaso por 32 dias, fazendo-se reposição da solução nutritiva sempre que esta alcançava $\frac{1}{4}$ do volume da garrafa.

No 32º dia, o experimento foi coletado. As raízes foram separadas da parte aérea na altura do nó cotiledonar. Os nódulos foram destacados das raízes, lavados e contados. Posteriormente, nódulos, parte aérea (caule + folhas), e raiz foram secos em estufa de circulação de ar (60°C por 72 horas) para determinação da massa de matéria seca.

Os dados de massa seca de parte aérea, nódulos e raiz, e quantidade de nódulos, foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.2.8.2 Experimento com tubetes

Para a preparação dos tubetes, as sementes foram imersas em placas de Petri contendo inoculante (Figura 13a) e colocadas para secagem (Figura 13b) durante 20

minutos. Posteriormente, foram colocadas três sementes em cada tubete no plantio (Figura 12c). Após a germinação, foi feito o desbaste, restando uma planta por tubete.

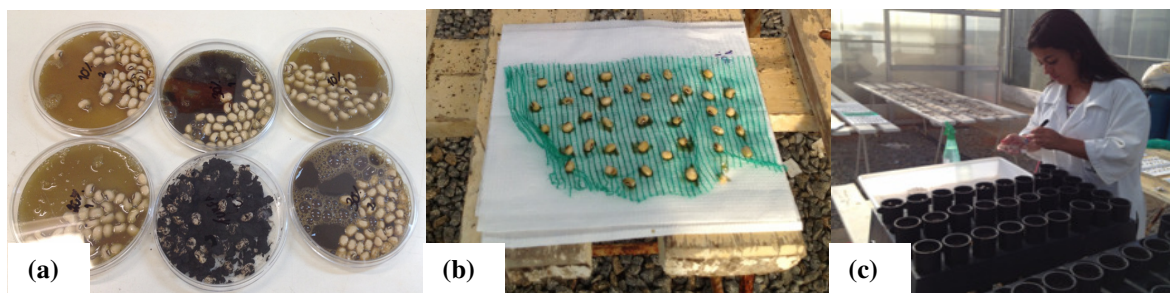


Figura 13 – (a) Sementes imersas nas misturas poliméricas. (b) Secagem das sementes para a peletização. (c) Plantio das sementes nos tubetes.

Os tubetes foram dispostos na bancada em delineamento experimental de blocos ao acaso, com arranjo de cinco na linha e quatro na linha seguinte, e assim sucessivamente. Com o crescimento das plantas, foi necessária uma reorganização dos tubetes (Figura 14).

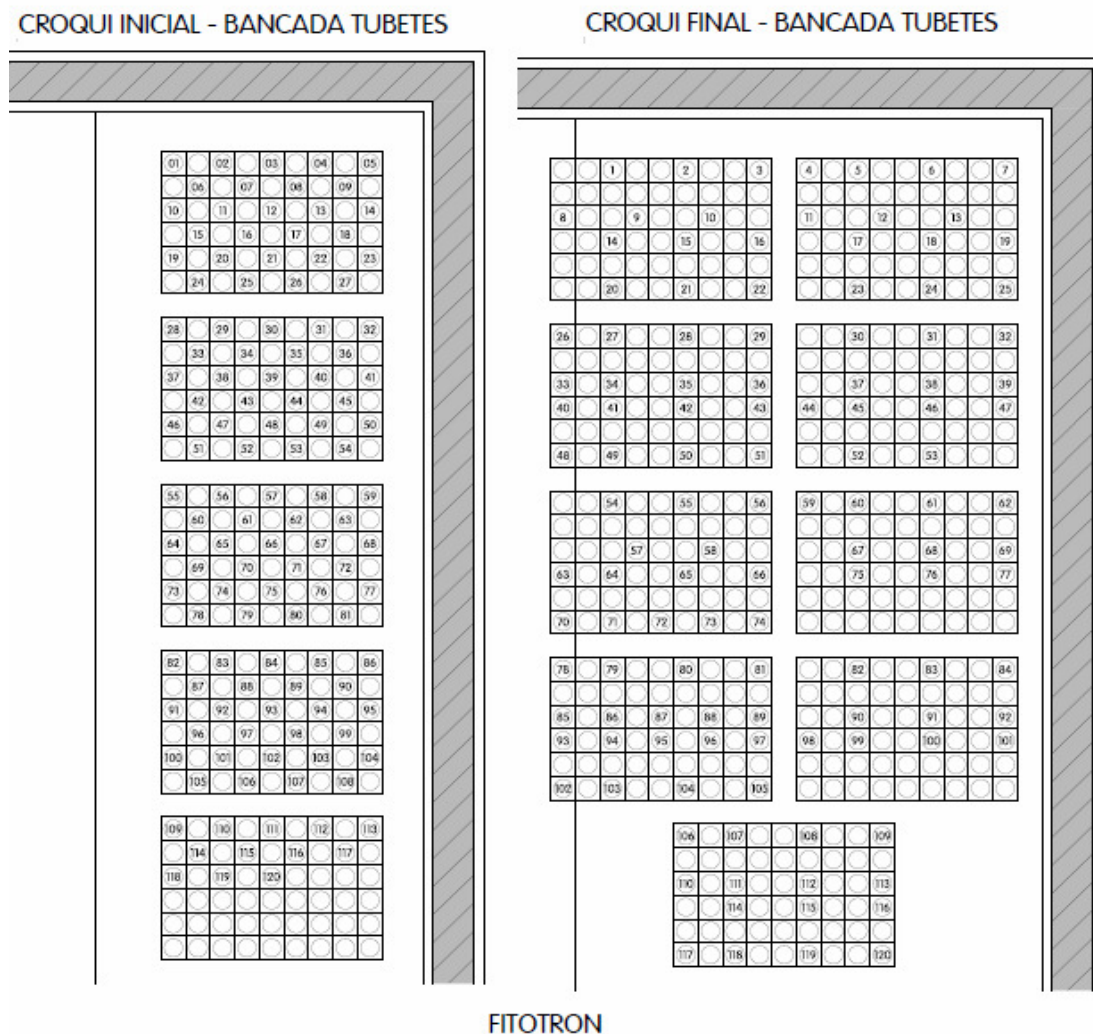


Figura 14- Croquis inicial e final da bancada de tubetes em delineamento experimental de blocos ao acaso (DBC).

Após 26 dias, o experimento foi coletado. As raízes foram separadas da parte aérea na altura do nó cotiledonar. Os nódulos foram destacados das raízes, lavados e contados. Posteriormente, nódulos, parte aérea e raiz foram secos em estufa de circulação de ar (60°C por 72 horas) para determinação da massa de matéria seca.

Após a pesagem, a parte aérea das plantas foi moída para a determinação do Nitrogênio Total pelo método de Kjeldahl (Liao, 1981) pelo Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia. O acúmulo de N foi obtido pelo produto entre o teor e a massa seca. As variáveis analisadas foram: número de nódulos, massa de nódulos secos, massa seca da parte aérea (caule + folhas), N total da parte aérea e Acúmulo de N na Parte Aérea.

Os dados de teor de N, massa seca de parte aérea, nódulos e raiz, e quantidade de nódulos, foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As avaliações de clorofila foram realizadas no dia anterior a coleta, sendo mensuradas com o auxílio de um clorofilômetro da marca comercial ClorofiLOG® modelo CFL 1030, produzido pela Falker Automação Agrícola. Este aparelho mede de maneira óptica, a quantidade de radiação transmitida através das folhas, em três comprimentos de onda, sendo dois na faixa do vermelho próximos aos picos de absorção da clorofila e um no infravermelho próximo. A combinação destes valores de transmitâncias nos três diferentes comprimentos de onda gera o Índice de Clorofila Falker (ICF) que é a unidade de medida em índice adimensional do ClorofiLOG (FALKER, 2015),

As leituras foram feitas no terço médio da folha do meio do penúltimo estágio de crescimento, com folhas totalmente abertas, em cada planta de avaliação, sendo 10 repetições para cada tratamento (Figura15).



Figura 15 – Avaliação de clorofila utilizando o ClorofiLOG.

A análise estatística foi feita utilizando o programa estatístico SISVAR. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

4.2.9 Ensaios de Reologia

Para estudar a interação espirulina/CMC, foram realizados ensaios de reologia no Laboratório de Escoamento de Fluidos (LEF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizando o reômetro Haake RheoStress 1, acoplado a um banho HAAKE C25P em temperatura de 25°C e equipado com um sensor de placas paralelas (PP 35 Ti), diâmetro de 35mm, gap de 1mm, acoplado a um computador com software Rheowin 3 (Figura 16).



Figura 16 - Reômetro Haake RheoStress 1.

4.2.9.1 Ensaios Dinâmicos Oscilatórios

- *Ensaios de Varredura de Amplitude:* Foram realizados ensaios de varreduras de amplitude na faixa de 0,01 a 100 Pa com frequência fixa de 1,0 Hz a 25°C para determinação da região de viscoelasticidade linear.
- *Variação da frequência para diferentes composições:* Foram realizados ensaios de varreduras de frequência na faixa de 0,01 a 31,62 Hz/s com amplitude de tensão de 5 Pa a 25°C, dentro da região de viscoelasticidade linear.
- *Teste de fluência e recuperação:* Os Ensaios de Fluência e Recuperação foram conduzidos à tensão constante de 5 Pa durante 180 s e, posteriormente, mantidos sob tensão de cisalhamento nula, durante 180 s para observação da recuperação das estruturas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação das misturas poliméricas

Os experimentos iniciais foram realizados condicionando as misturas poliméricas em tubos Falcon para autoclavagem, no entanto, foram perdidas muitas amostras e optou-se pela utilização de sacos plásticos autoclaváveis.

Após a autoclavagem notou-se uma mudança na coloração das misturas, passando de verde-azulado para um tom mais amarelado, com pode ser observado na Figura 17, fato que pode ser atribuído à desnaturação do pigmento ficocianina durante o processo de autoclavagem. Trabalhos de Edwards *et al.* (1997) mostraram que entre 60 e 70°C ocorre a desnaturação da ficocianina, e a temperatura na autoclave atinge 121°C, o que justifica a mudança de cor.

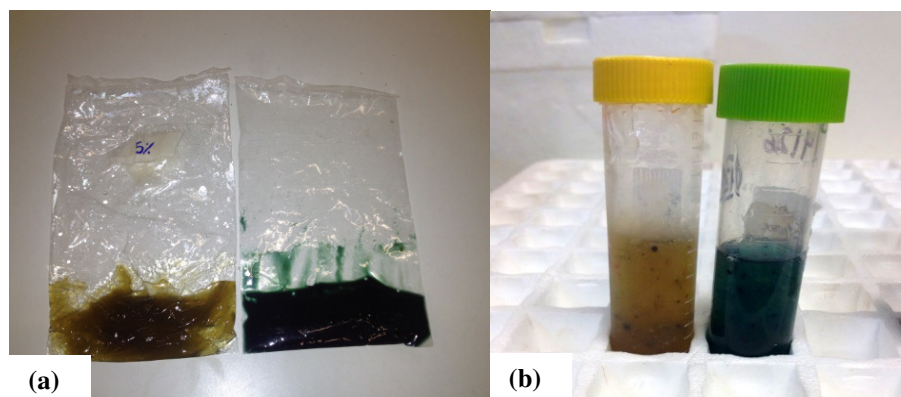


Figura 17 – (a) Misturas poliméricas condicionadas em sacos plásticos autoclaváveis e (b) em tubos Falcon depois e antes da autoclavagem.

5.2 Avaliação da estabilidade dimensional das misturas poliméricas

A avaliação da estabilidade dimensional de uma mistura com o tempo é importante para garantir a qualidade de um produto. Sistemas que são incompatíveis (imiscíveis) formam sistemas heterogêneos e separam fases (COWIE, 1989). Para misturas poliméricas, essa imiscibilidade é mais evidente (ROHR, 2007), sendo observado que

quando dois polímeros são misturados, na maioria dos casos, os componentes tendem a se separar para formar um sistema heterogêneo (JANSEN, 1996).

Para avaliar a mistura espirulina/CMC foi realizado um teste preliminar de separação de fases. Para isso, foram avaliadas somente três concentrações distintas: 2,5%, 10% e 40% de espirulina. A figura 18 mostra os resultados experimentais de separação de fase das misturas espirulina/CMC. Os testes preliminares mostraram que a mistura contendo 40% de espirulina apresentou separação de fase após oito dias. Por outro lado, as misturas com baixas concentrações, 2,5% e 10% de espirulina, não apresentaram separação de fases. Resultados apresentados por Rhor (2007) estudando a mistura CMC/amido mostram que os menores índices de sobrevivência dos microrganismos foram observados para as misturas que apresentaram separação de fase. Considerando esse resultado, a mistura contendo 40% de espirulina foi descartada dos demais experimentos.



Figura 18 – Tubos Falcon contendo misturas poliméricas nas concentrações de 2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina para avaliação da estabilidade dimensional através da separação de fases.

5.3 Avaliação de sobrevivência da BR3262 (Semia 6464) nas misturas poliméricas

A Tabela 3 mostra o resultado da avaliação da sobrevivência dos rizóbios nas misturas espirulina/CMC contendo 2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina.

Tabela 3- Avaliação de sobrevivência da estirpe BR3262 através da contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em misturas contendo 2,5%, 10% e 40% de massa de espirulina em dias.

| Teor de Espirulina (%) | Época da avaliação das UFC (Dia) | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 3° | 7° | 14° | 28° |
| 2,5 | 3,33x10 ⁸ aB* | 3,99x10 ⁸ aAB | 4,43x10 ⁸ aAB | 2,33x10 ⁹ bA |
| 10 | 1,06x10 ⁸ aBC | 3,06x10 ⁷ bC | 2,89x10 ⁸ aB | 5,09x10 ¹⁰ aA |
| 40 | 3,99x10 ⁸ aB | 3,77x10 ⁸ aB | 2,30x10 ⁸ aB | 7,09x10 ⁹ bA |

- Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A contagem do número de células do inóculo inicial foi de $2,5 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹ de inóculo, do qual 5 mL foram adicionados a 25 mL do veículo, estimando-se uma concentração de $4,1 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹ de inoculante incubado.

A contagem das UFC revelou um aumento da quantidade de células rizobianas com o tempo de inoculação após três dias de armazenamento em média de cerca de cinco vezes o número de células inoculadas. Esses valores foram mantidos nos veículos com 2,5 e 40% de espirulina até 14 dias de armazenamento. Porém o veículo que recebeu 10% de biomassa da alga teve o número de UFC reduzido após 7 dias de armazenamento em cerca de três vezes o valor observado após os três primeiros dias.

Após 14 dias de armazenamento a temperatura ambiente houve uma tendência de aumento de unidades formadoras de colônia nos três veículos avaliados que foi mais expressivo naquele que continha 10% de biomassa de espirulina. Em relação à concentração inicial, $4,1 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹, esse aumento foi de cerca de 100 vezes, chegando a valores médios de cerca de $5,1 \times 10^{10}$ ufc.mL⁻¹ e sugerindo que entre os veículos testados, a concentração de 10% de espirulina foi capaz de garantir as melhores condições para armazenamento das células da estirpe BR3262 proporcionando a multiplicação das mesmas o que pode ser um indicativo da ausência de estresses fisiológicos que tenderiam a limitar a sobrevivência.

De modo geral, os resultados indicam que todas as composições estudadas foram capazes de manter uma concentração celular acima de 10^9 ufc.mL⁻¹ durante 28 dias.

Fernandes Junior *et al.*, em 2009, observaram que as composições poliméricas CMC/Amido compatibilizadas com MgO foram capazes de manter as elevadas concentrações celulares da estirpe BR3267 ao longo de 12 semanas de incubação, não havendo diferenças significativas quando comparadas com a turfa, resultado semelhante ao obtido no presente estudo.

5.4 Verificação do pH resultados

Antes da inoculação e após sete dias de incubação das misturas inoculadas, foi verificado o pH, que se manteve entre 6 e 7 para todas as amostras. Este resultado é interessante uma vez que, trabalhos de Jordan (1984) e Hungria & Vargas (2000), mostraram que o pH ideal para o crescimento da maioria das estirpes de rizóbio varia entre 6 e 7.

5.5 Teste de germinação das sementes de feijão-caupi tratadas com espirulina /CMC não inoculadas: tubetes com substrato.

Os primeiros experimentos realizados nesse trabalho foram voltados para avaliação da toxidez da mistura espirulina/CMC. Para isso, foi realizado o teste de germinação utilizando diferentes misturas com teores de espirulina sem o rizóbio. Nesse teste foi avaliada a germinação das sementes e a massa seca da parte aérea e massa seca da raiz. Os resultados da soma das três sementes germinadas de cada tubete obtidos nesse experimento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teste de germinação em tubetes com substrato em casa de vegetação.

| Teor de espirulina (%) | Massa seca de parte aérea (mg) | Massa seca de raiz (mg) | Massa seca total (mg) |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Controle | 300 a | 80 a | 380 a |
| 2,5 | 350 a | 80 a | 430 a |
| 5 | 321 a | 91 a | 412 a |
| 10 | 352 a | 89 a | 441 a |
| 20 | 311 a | 90 a | 401 a |
| 30 | 332 a | 91 a | 423 a |

- Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que as sementes tratadas com as misturas poliméricas apresentaram boa germinação, quando comparada com o controle (semente nua). Observou-se que os resultados de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz e conseqüentemente, massa seca total não diferiram estatisticamente, indicando que o teor de espirulina na mistura não tem efeito na germinação das sementes.

5.6 Teste de germinação das sementes de feijão-caupi tratadas com espirulina/CMC não inoculadas: vasos com solo.

Os resultados do teste de germinação realizados em vasos são apresentados na Tabela 5. Considerando que esses experimentos não foram realizados com repetições, entretanto, conforme descrito na parte experimental, em cada vaso continha 10 sementes. Sendo assim, os resultados contidos na Tabela 5 representam a soma das 10 sementes germinadas.

Tabela 5- Teste de germinação em vasos com solo em casa de Vegetação.

| Teor de espirulina (%) | Massa seca de parte aérea (g) | Massa seca de raiz (mg) | Massa seca total (g) | Aumento percentual¹ (%) |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|
| Controle | 0,67 | 270 | 0,94 | - |
| 2,5 | 1,02 | 330 | 1,35 | 44 |
| 5,0 | 1,12 | 360 | 1,48 | 57 |
| 10 | 1,12 | 400 | 1,52 | 62 |
| 20 | 0,93 | 320 | 1,25 | 33 |
| 30 | 1,04 | 290 | 1,33 | 41 |

- Tabela apresentada em valores absolutos. ¹Aumento percentual da massa seca total em relação ao controle.

Diferentemente do observado nos experimentos com tubetes, os resultados apresentados na Tabela 5 mostram um aumento da quantidade de massa seca nas sementes tratadas com as misturas poliméricas. Este resultado pode ser atribuído às interações entre a mistura polimérica, a semente e os microrganismos presentes no solo contido nos vasos. Neste caso, o microrganismo pode ter utilizado a mistura polimérica como uma fonte de nutriente, contribuindo para o crescimento.

5.7 Experimentos realizados em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron.

5.7.1 GARRAFAS DO TIPO LONGNECK: avaliação do número de nódulos, massa seca de nódulos, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz das plantas inoculadas com a mistura espirulina/CMC.

Os experimentos realizados em sistema livre de contaminantes (garrafas do tipo *longneck*) foram montados com cinco repetições, no entanto, algumas amostras aleatórias foram perdidas, e o número final de repetições para as análises posteriores a coleta foi de três repetições.

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises feitas com as médias das três repetições por tratamento, com amostras com tempos de armazenamento de 47 dias e 13 dias.

Tabela 6 – Número de nódulos, massa seca de nódulo, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em garrafas do tipo *longneck* em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014.

| Teor de espirulina (%) | Armazenamento (Dias) | ¹ Número de nódulos | ¹ Massa seca de nódulos (mg) | ¹ Massa seca de parte aérea (g) | ¹ Massa seca de raiz (g) |
|------------------------|----------------------|--------------------------------|---|--|-------------------------------------|
| Controle | - | 110,3 a | 31 b | 0,447 c | 0,141 a |
| Turfa | - | 131,7 a | 128 a | 0,960 bc | 0,182 a |
| 2,5 | 47 | 132,0 a | 138 a | 1,070 abc | 0,188 a |
| 2,5 | 13 | 143,7 a | 138 a | 1,144 abc | 0,188 a |
| 5,0 | 47 | 145,3 a | 143 a | 1,192 ab | 0,198 a |
| 5,0 | 13 | 154,0 a | 143 a | 1,261 ab | 0,211 a |
| 10 | 47 | 156,0 a | 151 a | 1,273 ab | 0,214 a |
| 10 | 13 | 156,0 a | 155 a | 1,295 ab | 0,219 a |
| 20 | 47 | 161,7 a | 162 a | 1,367 ab | 0,226 a |
| 20 | 13 | 174,3 a | 163 a | 1,386 ab | 0,238 a |
| 30 | 47 | 176,3 a | 172 a | 1,387 ab | 0,252 a |
| 30 | 13 | 213,0 a | 186 a | 1,719 a | 0,274 a |
| *CV (%): | | 41,01 | 17,07 | 20,87 | 28,73 |

1 – Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. – Experimento em delineamento de blocos ao acaso (DBC) com 3 repetições. *Coeficiente de Variação.

Os resultados de número de nódulos das diferentes composições não diferiram estatisticamente quando comparados aos resultados do controle e da turfa. No entanto, os nódulos retirados do controle (semente nua) não eram nódulos funcionais, este fato pode ser observado na figura 19, onde é possível observar a diferença de cor das plantas inoculadas e do controle, mostrando o amarelamento do controle, indicando que a FBN foi ineficiente. Inclusive, é importante ressaltar que no momento da coleta, algumas plantas do controle já estavam perdendo as folhas, pela deficiência do nitrogênio. Miranda *et al.* (2010) diagnosticou alguns sintomas provocados pela deficiência do nitrogênio, sendo esses caracterizados por uma coloração amarela nas folhas maduras, clorose e crescimento estagnado.



Figura 19 - Desenvolvimento de planta inoculada (esq.) e controle não inoculado (dir.).

Em relação aos demais tratamentos, o resultado é satisfatório, visto que todas as plantas inoculadas com as diferentes composições da mistura polimérica apresentaram resultados semelhantes aos das plantas utilizando a turfa como veículo de inoculação. É possível concluir também que os tempos de estocagem do inoculante não influenciaram na nodulação.

Esse resultado é corroborado quando se avalia a massa seca de nódulos, tabela 6, as plantas inoculadas com as misturas poliméricas como veículo de inoculação, obtiveram resultado compatível às plantas inoculadas com a turfa. O controle absoluto diferiu dos demais tratamentos, visto que, os nódulos não funcionais apresentaram menores tamanhos, embora estivessem em maior quantidade, justificando assim a diferença na massa seca.

Os resultados de massa seca de parte aérea, observados na tabela 6, mostraram que as plantas inoculadas com as composições poliméricas apresentaram maior biomassa quando comparadas a turfa. O controle apresentou a menor média, como esperado e as composições contendo 30% de massa de espirulina apresentaram os melhores resultados.

Em relação aos resultados de massa seca de raiz (tabela 6), as médias não diferiram estatisticamente. No entanto, é importante observar que quando os resultados de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz das amostras controle são comparados, indicam que a planta investiu mais no sistema radicular devido a deficiência do nitrogênio.

5.7.2 TUBETES: Avaliação da massa seca, teor de nitrogênio e acúmulo de N na parte aérea, e teor de clorofila das plantas inoculadas com a mistura espirulina/CMC.

Para os experimentos realizados em tubetes com substrato foram avaliados massa seca de parte aérea (caule + folhas), teor de nitrogênio da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e teor de clorofila das plantas inoculadas com a mistura espirulina/CMC.

A Tabela 7 apresenta resultados obtidos para amostras com tempos de armazenamento de 47 dias e 13 dias.

Tabela 7 - Massa seca de parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e teor de clorofila de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em tubete em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014.

| Teor de espirulina (%) | Armazenamento (Dias) | ¹ Massa Seca de Parte aérea (g por planta) | ¹ Teor de N na Parte Aérea (%) | ¹ Acúmulo de N na Parte Aérea (mg por planta) | ¹ Teor de Clorofila (ICF) |
|------------------------|----------------------|---|---|--|--------------------------------------|
| Controle | - | 1,698 a | 3,648 b | 62 b | 50,953 b |
| Turfa | - | 1,777 a | 4,549 a | 81 a | 59,176 a |
| 2,5 | 47 | 1,919 a | 4,273 a | 80 ab | 56,836 ab |
| 2,5 | 13 | 1,839 a | 4,319 a | 80 ab | 57,416 a |
| 5,0 | 47 | 1,715 a | 4,186 ab | 72 ab | 54,276 ab |
| 5,0 | 13 | 1,787 a | 4,194 a | 75 ab | 56,283 ab |
| 10 | 47 | 1,867 a | 4,421 a | 83 a | 60,293 a |
| 10 | 13 | 1,769 a | 4,290 a | 76 a | 59,120 a |
| 20 | 47 | 1,772 a | 4,287 a | 76 a | 56,826 ab |
| 20 | 13 | 1,656 a | 4,353 a | 72 a | 56,896 ab |
| 30 | 47 | 1,843 a | 4,398 a | 81 a | 57,010 ab |
| 30 | 13 | 1,777 a | 4,544 a | 81 a | 58,876 a |
| *CV (%): | | 10,69 | 8,49 | 13,79 | 7,30 |

1 – Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. - Experimento em delineamento de blocos ao acaso (DBC) com 10 repetições. *Coeficiente de Variação.

Analisando os resultados de teor de nitrogênio e comparando os resultados obtidos entre as misturas contendo espirulina, verificou-se que o teor de nitrogênio é, estatisticamente, o mesmo para todas as amostras, indicando que o teor de Espirulina não afeta a fixação biológica do nitrogênio. Os resultados obtidos para as misturas são semelhantes aos resultados obtidos com a turfa, o veículo de inoculação padrão. Além disso, os resultados de N das misturas contendo espirulina é superior ao apresentado pelo controle (semente nua), resultado esperado uma vez que o controle não foi inoculado, e os resultados obtidos mostraram que os tempos de estocagem testados não afeta a FBN.

Para a variável acúmulo de nitrogênio na parte aérea, obtida através do produto da massa seca da parte aérea com o teor de nitrogênio da parte aérea, os melhores resultados foram obtidos com as plantas inoculadas com as misturas contendo 10, 20 e 30% de massa de espirulina. Já as plantas inoculadas com a turfa e com as composições contendo 2,5 e 5% apresentaram resultados inferiores aos das amostras contendo 10, 20 e 30% de massa de espirulina. Além disso apresentaram resultados de acúmulo de nitrogênio superiores ao obtido com a amostra controle, como esperado uma vez que o controle é deficiente na FBN.

Analisando o teor de clorofila, apresentado na tabela 7, é possível observar que as misturas poliméricas não afetam na clorofila, já que os resultados mostram que as plantas inoculadas com as misturas poliméricas são semelhantes às inoculadas com a turfa. Os valores de clorofila obtidos nas plantas inoculadas são superiores ao controle, que apresentou a menor média com 50,953 ICF. Este resultado é importante visto que, existe relação entre o teor de clorofila e o teor de nitrogênio na planta pois 50 a 70% do N total das folhas é integrante de enzimas que estão associadas aos cloroplastos, responsáveis pela fotossíntese (STOCKING & ONGUN, 1962; CHAPMAN & BARRETO, 1997; SCHADCHINA & DMITRIEVA, 1995). Portanto, os resultados de teor de clorofila são satisfatórios, visto que folhas bem nutridas têm maior poder de assimilação de CO₂ e síntese de carboidratos no processo de fotossíntese.

Para todas as variáveis não notou-se diferença significativa no tempo de estocagem.

A Tabela 8 apresenta resultados de número de nódulos, massa seca de nódulos e massa seca da raiz obtidos para amostras com tempos de armazenamento de 47 dias e 13 dias.

Tabela 8 – Número de nódulos, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz de plantas de feijão-caupi inoculadas com diferentes composições de inoculante polimérico a partir da mistura espirulina/CMC em tubete em câmara de crescimento de plantas tipo Fitotron em Seropédica – RJ, em 2014.

| Teor de espirulina (%) | Armazenamento (Dias) | Número de Nódulos | Massa seca de nódulo (mg) | Massa seca de raiz (mg) |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Controle | - | 54,6 c | 114 a | 275 a |
| Turfa | - | 102,4 ab | 114 a | 259 a |
| 2,5 | 47 | 115,5 ab | 114 a | 240 a |
| 2,5 | 13 | 117,2 ab | 111 a | 241 a |
| 5,0 | 47 | 110,2 ab | 101 a | 222 a |
| 5,0 | 13 | 114,1 ab | 103 a | 230 a |
| 10 | 47 | 117,7 ab | 117 a | 246 a |
| 10 | 13 | 102,0 ab | 100 a | 239 a |
| 20 | 47 | 118,8 ab | 104 a | 235 a |
| 20 | 13 | 82,9 bc | 94 a | 234 a |
| 30 | 47 | 119,3 ab | 130 a | 262 a |
| 30 | 13 | 129,5 a | 118 a | 240 a |
| *CV (%): | | 25,05 | 21,52 | 16,18 |

1 – Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. **(1)** Tempo de estocagem:47 dias / **(2)** Tempo de estocagem: 13 dias - Experimento em delineamento de blocos ao acaso (DBC) com 10 repetições. *Coeficiente de Variação.

Segundo Ferreira & Castro (1995), o número de nódulos e a massa de nódulos são indicadores da capacidade de nodulação da planta, no entanto, observa-se que além do número e massa de nódulos é necessário que ocorra uma boa eficiência na nodulação. Alcântara *et. al.*(2015) relatam que a massa seca de nódulos é um parâmetro relacionado com a FBN que tem sido recomendado para programas de melhoramento vegetal que tem como objetivo o aumento da fixação de N₂.

Analisando o número de nódulos e a massa seca de nódulos, apresentadas na tabela 8, é possível observar que todas as plantas inoculadas com a mistura polimérica obtiveram

resultados semelhantes aos das plantas inoculadas com a turfa e a composição contendo 30% de massa de espirulina apresentou as maiores médias.

A composição contendo 20% de massa de espirulina apresentou resultado de número de nódulos inferior aos demais tratamentos, no entanto, é possível que esse resultado decorra de um erro amostral. É importante ressaltar que na semana anterior à coleta as diferenças visuais entre as plantas controle, que apresentou as menores médias de número de nódulos, e as demais eram mais notáveis. Devido a deficiência do nitrogênio é possível que as plantas controle tenham encontrado algum rizóbio no substrato e realizado a nodulação, ainda que esta fosse menos eficiente que a das demais plantas. Foi observado que estes nódulos estavam em menor quantidade e maior tamanho (Figura 20).

Para a variável massa seca de raiz (MSR), apresentada na tabela 8, as médias comparadas de todos os tratamentos não diferiram estatisticamente.

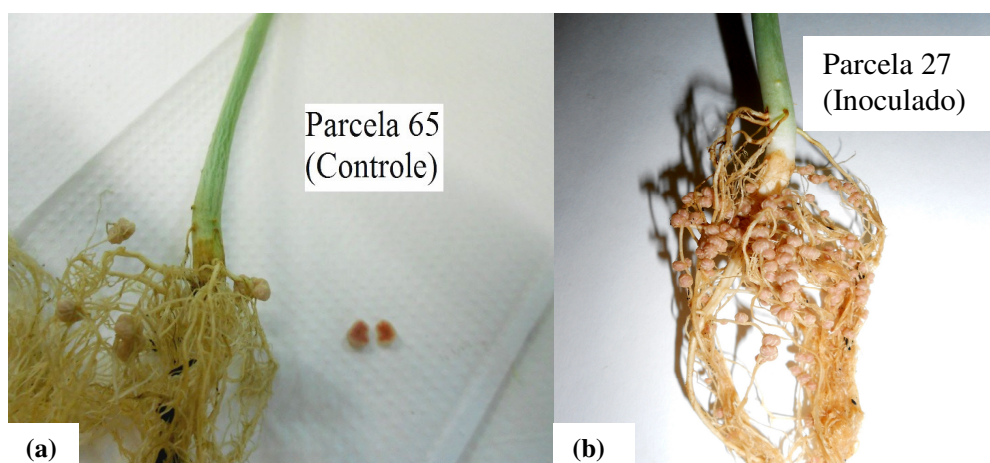


Figura 20 – (a) Nódulos de planta sem inoculação e (b) inoculada com a mistura polimérica espirulina/CMC.

5.8 Testes Reológicos Dinâmico Oscilatórios das Soluções espirulina/CMC

5.8.1 Viscosidade: Análise do comportamento reológico sob cisalhamento contínuo.

A Figura 21 mostra o efeito da adição de espirulina na viscosidade da amostra. Observa-se que todas as misturas apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, diminui a viscosidade com o aumento da taxa e cisalhamento. Observa-se que o efeito da adição de espirulina é mais acentuado a baixas taxas de cisalhamento, onde o aumento da concentração de espirulina promove uma diminuição significativa da viscosidade. É interessante notar que com o aumento da taxa de cisalhamento, as diferenças entre os valores de viscosidade das amostras diminuem acentuadamente, de modo que, quando a frequência tende a 100 Hz, o valor da viscosidade das amostras tende ao mesmo valor. Este resultado sugere que o aumento da taxa de cisalhamento reduz a interação entre a espirulina e a carboximetilcelulose tornando o comportamento reológico predominado pela CMC, devido a sua estrutura ser dinamicamente mais estável sob o cisalhamento.

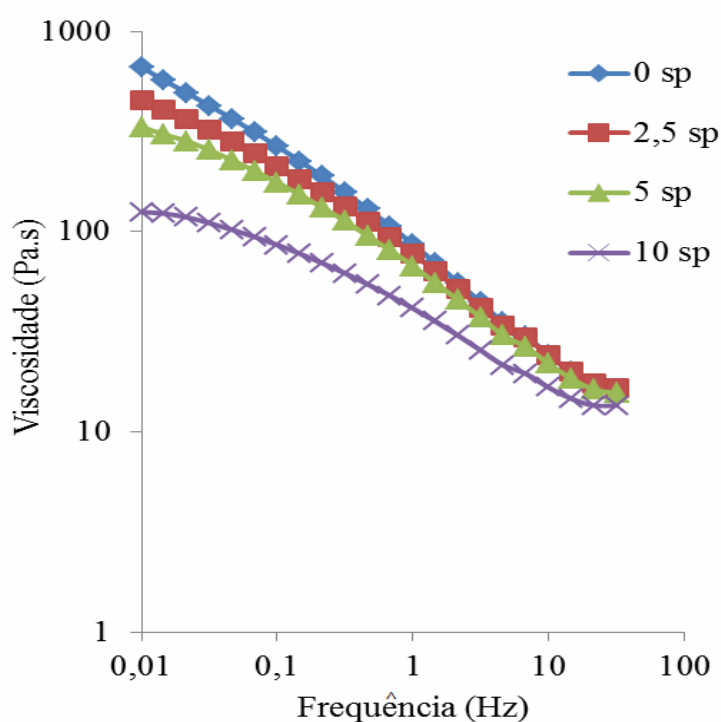


Figura 21 – Variação da viscosidade com o aumento da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo 0, 2,5, 5 e 10% de massa de espirulina.

5.8.2 Avaliação do módulo elástico (G')

A Figura 22 mostra o comportamento do módulo elástico (G') com a frequência, da mistura espirulina/CMC para diferentes concentrações de espirulina na mistura. O valor de

G' fornece uma ideia da componente elástica da mistura. Devido a sua macroestrutura e suas interações intermoleculares a CMC é a componente que apresenta o maior comportamento elástico, já extensivamente estudado na literatura (ROHR, 2007; MELO, 2008; SHIROMA, 2012). Nota-se que a adição de espirulina afeta a força elástica da mistura, principalmente a baixas taxas de cisalhamento, região em que se observa uma diminuição expressiva do módulo elástico.

Por outro lado, é interessante observar que a componente elástica, G' , aumenta com a taxa de cisalhamento, sendo esse aumento mais expressivo para as concentrações mais elevadas de espirulina, ou seja, o comportamento elástico das amostras contendo espirulina tende ao comportamento elástico da CMC a elevadas taxas de cisalhamento. Este resultado permite sugerir que o aumento da taxa de cisalhamento diminui a interação entre a CMC e a espirulina.

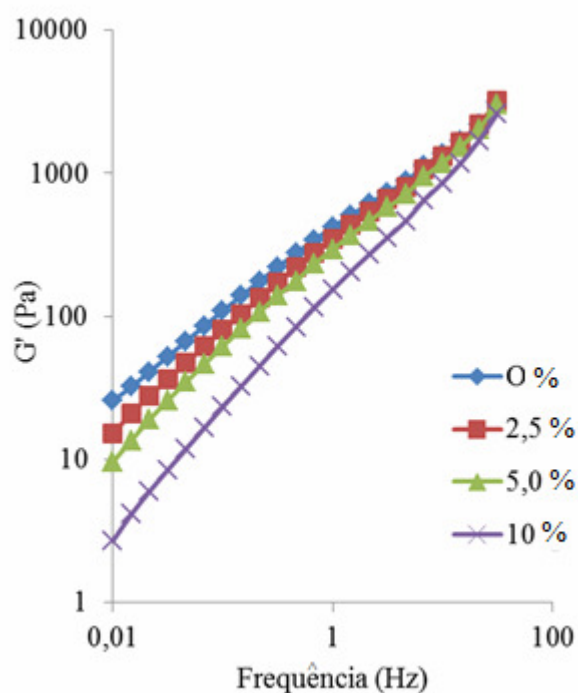


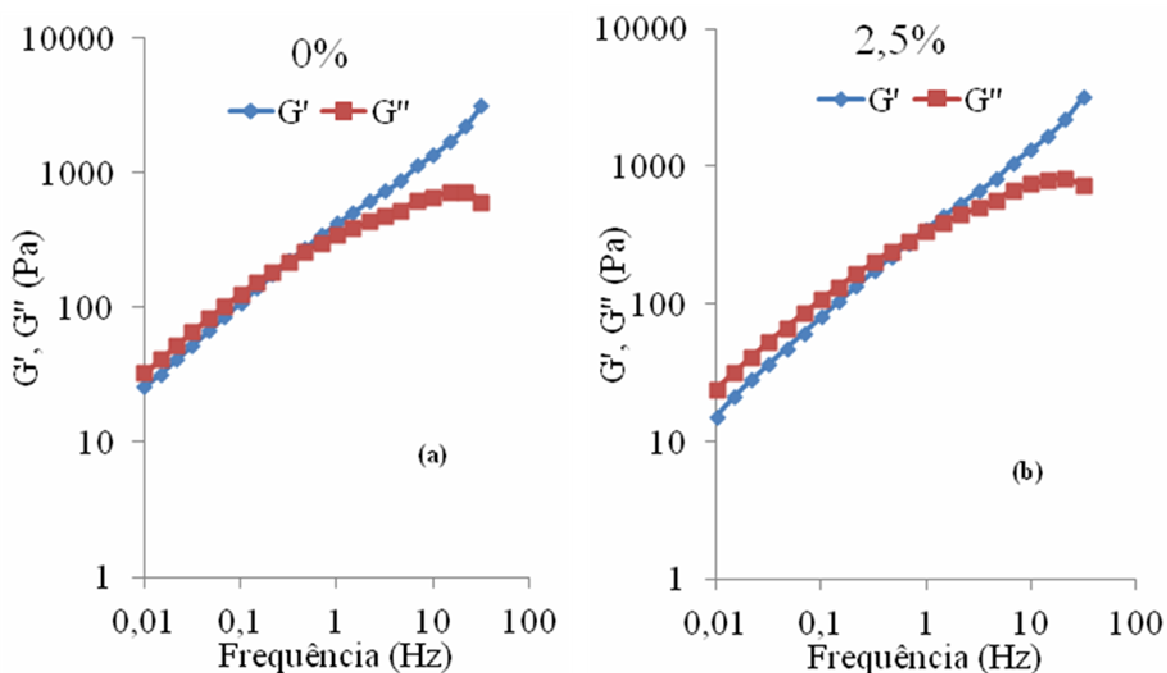
Figura 22 - Variação do Módulo Elástico (G') em função da frequência para as misturas espirulina/CMC com teor de 0, 2,5, 5e 10% de massa de espirulina.

5.8.3 Variação do Crossover com a frequência

Segundo Winter & Chambom (1986), tanto o módulo elástico quanto o módulo viscoso variam com a frequência de acordo com o modelo da lei das potências. $G' = K1 \cdot \omega^n$

e $G'' = K2 \cdot \omega^n$ em que n corresponde ao tempo de relaxação das cadeias poliméricas: $n=0$ polímero puramente elástico; $n=1$ polímero puramente viscoso e $n = 0,5$ indica o ponto gel, ou formação de estruturas gel. Quando $n=0,5$ sugere que o módulo G' e G'' apresentam o mesmo comportamento em função da frequência, $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^n$. Na Figura 23, observa-se que para baixas frequências, os valores dos módulos de perda (G'') são superiores ao módulo elástico (G'). Com o aumento da frequência, observa-se uma inversão entre os comportamentos elástico e viscoso, conhecido na literatura como *crossover*. Alguns pesquisadores relatam que esse comportamento pode ser atribuído às diferentes interações intermoleculares e fornece informações sobre a estabilidade entre os polímeros quando submetidos a elevadas deformações.

Na figura 23, observou-se que a viscosidade da amostra é mais afetada com a adição de espirulina, principalmente a baixas taxas de cisalhamento, comportamento mais viscoso. Sendo assim, os resultados observados na figura 23, de certa maneira estão de acordo com os observados na figura 22.



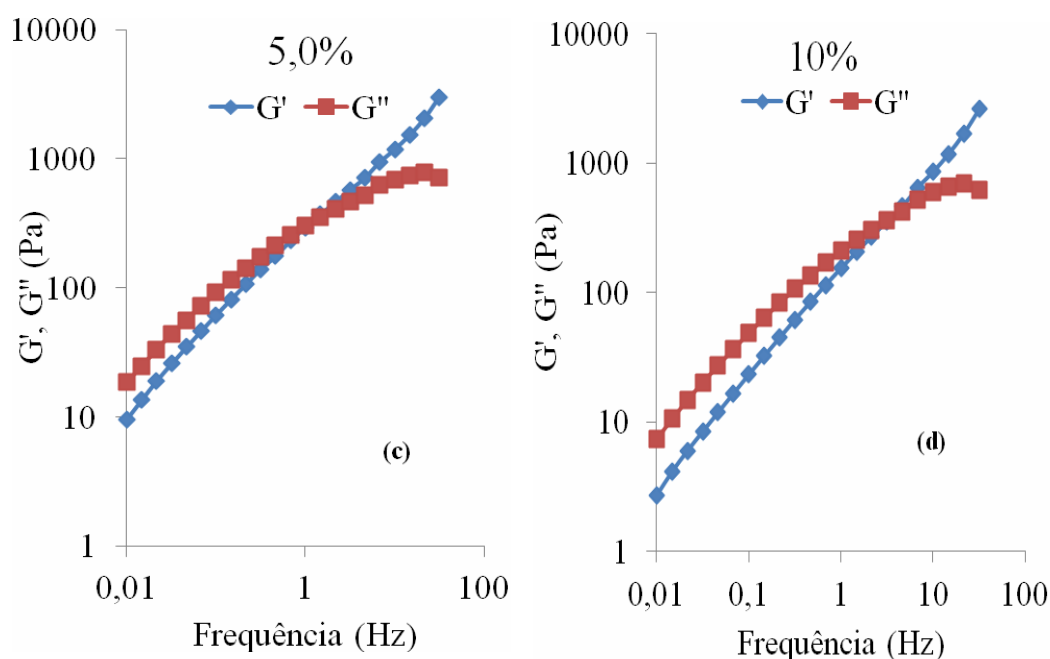


Figura 23 - Variação do *crossover* em função da frequência para as misturas espirulina/CMC com teor de espirulina de: (a) 0%, (b) 2,5%, (c) 5% e (d) 10% de massa de espirulina.

De modo a esclarecer esse comportamento, foi avaliado o valor da frequência na qual $G'(\omega) = G''(\omega)$, valor conhecido como *crossover*. Segundo Rhor 2007, este ponto não é observado para materiais perfeitamente elásticos, tampouco para materiais totalmente viscosos e para géis formados por ligações químicas e por ligações físicas fortes.

Na figura 23, observa-se um deslocamento do *crossover* para frequências mais elevadas com o aumento da quantidade de espirulina na mistura. Este resultado sugere que o aumento da quantidade de espirulina na mistura privilegia as interações intermoleculares (espirulina/CMC) em relação as interações intramoleculares. A diminuição das interações intramoleculares reduz o comportamento elástico da fase CMC, se manifestando numa diminuição da viscosidade da mistura. Quando a frequência aumenta, aumento do cisalhamento, as interações intermoleculares diminuem e a fase CMC prepondera frente a mistura. Este resultado pode ser atribuído também à grande diferença de viscosidade entre o CMC e a espirulina. Por outro lado, este resultado também mostra uma boa miscibilidade entre o CMC e a espirulina nessas concentrações estudadas, requisito importante para obtenção de um bom veículo de inoculação polimérico.

5.8.4 Variação da frequência para diferentes composições

Na figura 24, observa-se que no ponto onde os módulos G' e G'' são iguais (*crossover*), a frequência diminui com a quantidade de CMC e alcança o menor valor de frequência de *crossover* para mistura contendo 100% de CMC, predominando a característica elástica desse polímero. Este resultado pode ser atribuído ao aumento das interações atrativas das regiões hidrofílicas, que provocam um ordenamento na estrutura polimérica, principalmente da CMC, deixando a mistura mais coesa e com um aspecto mais parecido com gel (ROHR, 2007).

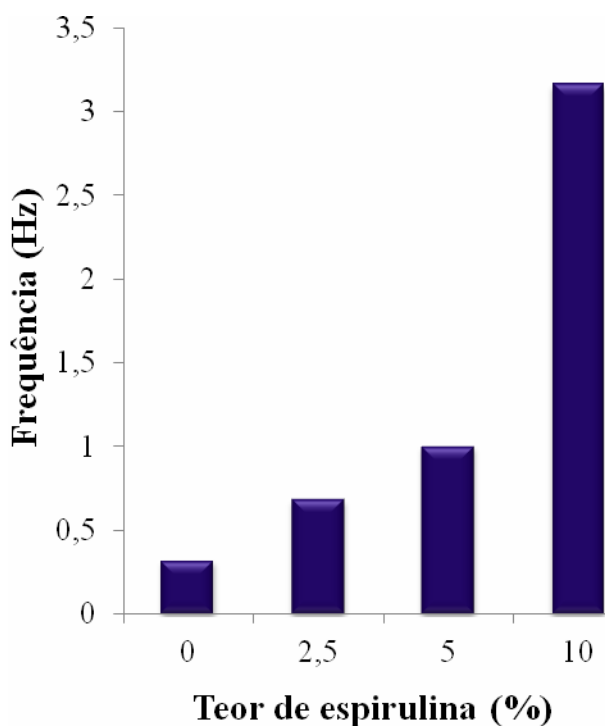


Figura 24 - Variação da frequência para as misturas espirulina/CMC contendo: 0, 2,5, 5 e 10% de massa de espirulina.

Com a adição da espirulina na mistura é observado um deslocamento do *crossover* para altas frequências, devido ao comprometimento das interações hidrofílicas e formação de outras interações.

Os resultados de variação da frequência são importantes para a aplicação tecnológica do material como veículo de inoculação, já que o material será manipulado pelo agricultor e não perderá a estabilidade.

5.8.5 Teste de fluência e recuperação

A Figura 25 mostra as curvas dos ensaios de fluência e recuperação para as misturas de espirulina/CMC. Analisando as curvas verifica-se que os valores de compliança aumentam com o aumento da quantidade de espirulina na mistura.

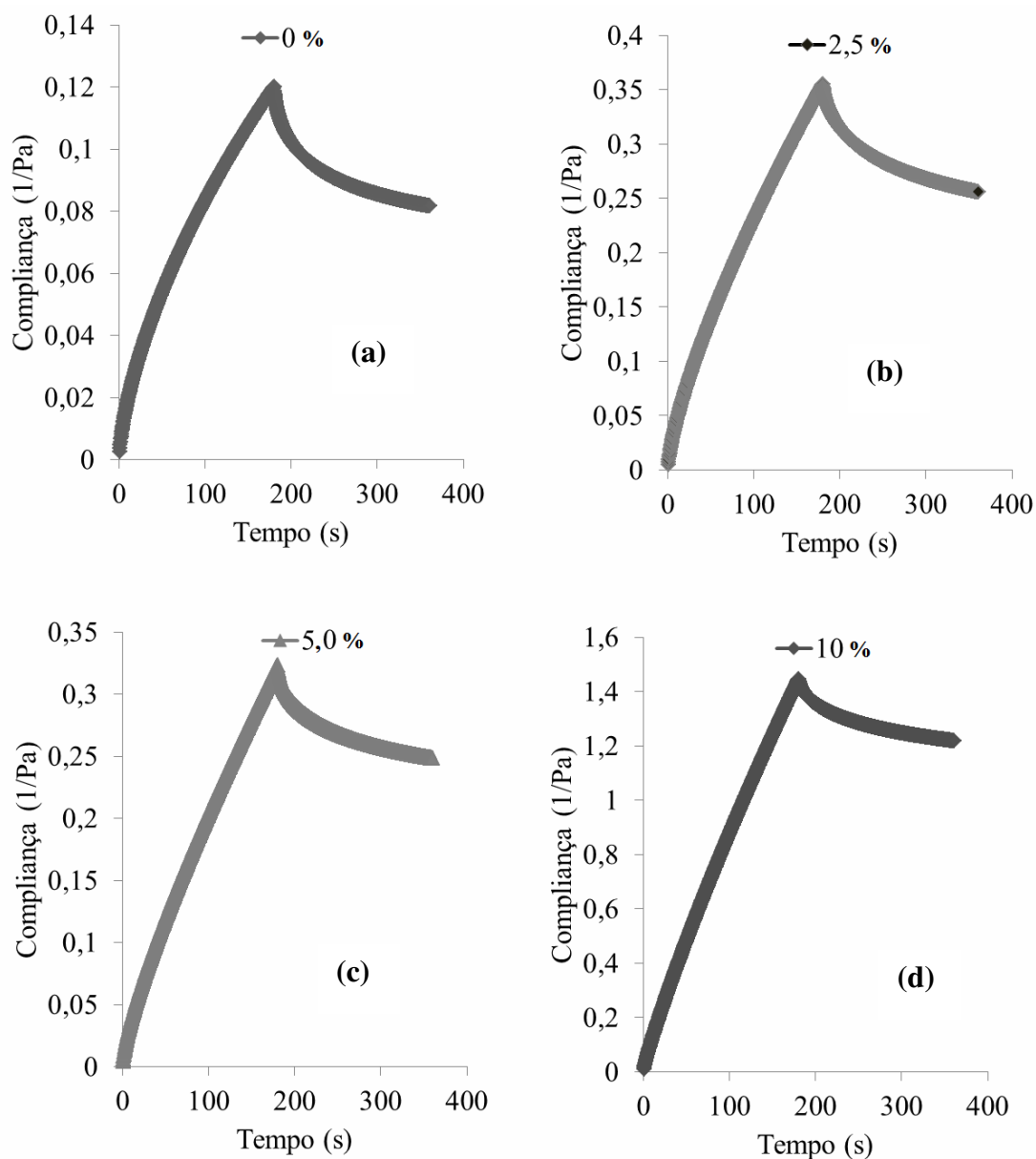


Figura 25 - Teste de fluência e recuperação para as misturas espirulina/CMC contendo: (a) 0%, (b) 2,5%, (c) 5% e (d) 10% de massa de espirulina.

É possível observar que com a adição da espirulina na mistura, há um aumento do comportamento viscoso, indicando que as amostras sofrem mais deformações irreversíveis, sendo possível perceber que a recuperação elástica do material diminui bastante quando a quantidade de espirulina aumenta. Além disso, a deformação sob tensão aumenta bastante quando a quantidade de espirulina aumenta na mistura. Nas curvas apresentadas nos gráficos da Figura 25, observa-se que a amostra com CMC puro apresenta valores de compliança mais de 10 vezes maiores que a amostra contendo CMC puro, indicando que com o aumento da espirulina na mistura há um aumento nos valores de compliança.

O resultado do teste de fluência e recuperação é compatível com resultados observados nos ensaios de frequência, onde o módulo de perda aumenta com a diminuição da quantidade de CMC. Rohr (2007) obteve resultados semelhantes com a mistura CMC/Amido e atribuiu o resultado ao fato de que a presença de amido confere estruturas menos rígidas, devido às poucas interações hidrofílicas entre as cadeias do CMC e do amido com a água. Em relação à espirulina ocorre o mesmo, portanto, à medida que a quantidade de espirulina aumenta, as cadeias do CMC ficam mais dispersas, diminuindo suas interações intermoleculares.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos realizados nessa dissertação mostraram que a espirulina, com sua rica composição química, se apresenta como um material em potencial para ser usado na agricultura e outros segmentos além da indústria alimentícia, onde é largamente utilizada como suplemento alimentar.

Os dados de teor de nitrogênio, teor de clorofila, massa seca de parte aérea e nódulos mostram que houve resposta na FBN das plantas de feijão-caupi inoculadas com as diferentes composições da mistura espirulina/CMC. Em todos os parâmetros avaliados, a mistura apresentou resultados semelhantes aos obtidos com a turfa.

Após 28 dias, a mistura se mostrou capaz de manter as células rizobianas com a mesma ordem de grandeza das células inicialmente inoculadas, 10^9 g^{-1} células de rizóbio.

Em relação aos tempos de estocagem do inoculante, não houve diferença significativa entre as misturas estocadas por 13 dias e por 47 dias, sendo esse resultado importante para a qualidade do produto.

Os resultados obtidos nos ensaios reológicos mostraram que a mistura espirulina/CMC apresentou comportamento não newtoniano. Em baixas frequências observa-se uma predominância da espirulina sobre os efeitos elásticos da mistura, sugerindo uma boa interação entre as fases. Entretanto, quando a frequência aumenta, observa-se que os valores de viscosidade, *crossover* e de módulo elástico da mistura tendem ao valor apresentado pelo CMC. A predominância dos efeitos elásticos do CMC sugere a diminuição da interação entre a espirulina e o CMC na mistura.

Diante dos experimentos realizados nessa dissertação, pôde-se concluir que é possível a mistura polimérica espirulina/CMC pode ser uma alternativa aos veículos de inoculação já existentes, como a turfa.

Além do exposto, esse trabalho de dissertação amplia a aplicabilidade da espirulina, podendo assim incentivar um aumento no cultivo, tornando esse produto mais acessível em termos de custo de obtenção.

7 SUGESTÕES

A utilização da mistura polimérica espirulina/CMC como veículo de inoculação requer novos testes em períodos mais longos para avaliar a durabilidade do veículo, testes com novas composições concentradas e diluídas e um estudo mais aprofundado das interações entre a espirulina e o CMC.

Uma investigação com outras estirpes de rizóbios seria interessante, uma vez que ainda não se sabe se o veículo teria melhores resultados outras estirpes além da testada neste trabalho, além de ser importante também conhecer sua eficiência em condições de campo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, R.M.C. M. ; XAVIER, G. R. ; RUMJANEK, N. G. ; ROCHA, M. de M. ; CARVALHO, J. dos S. . Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. *Revista Ciência Agronômica (UFC. Online)* , v. 45, p. 1-9, 2014.

ALHAMDAN, A., & SASTRY, S. K, Natural convection heat transfer between non-Newtonian fluids and an irregular shaped particle. *Journal of Food Process Engineering*, 13, 113–124, 1990.

ANTELO, F.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)*, v. 58, p. 1-11, 2015.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e consequências para a Saúde Pública. *Medicina On line - Revista Virtual de Medicina*, Vol. 1, nº 3, Ano I, 1998.

BARBOZA, R. S. L. ; MESSIAS, A.S. ; FIGUEIREDO, M.V.B. ; LIMA, V. N. ; REIS, Odemar V. . Evaluation of potential sewage sludge usage associated to the strain inoculation from *Bradyrhizobium* spp. in cowpea. *Global Journal of Management and Business Research* , v. 10, p. 61-68, 2010.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. *An Introduction to Rheology*; First Edition, New York, USA; Elsevier, 1991.

BASHAN, Y.;HERNANDEZ, J.-P.; LEYVA, L.A.; BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, v.35, p.359-368, 2002.

BECKER, E.W. Algae mass cultivation - production and utilization. *Process Biochem.*, 16(5): 10-14, 1981.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal of Applied Phycology, v. 5, p. 235-241, 1993.

BENEMANN, J.R. Microalgae products and production: an overview. Dev. Ind. Microbiol., 31: 247-256, 1990.

BURNS, R.C.; HARDY, R. W. F. Nitrogen Fixation in Bacteria and higher Plants (Molecular Biology, Biochemistry, and Biophysics, Vol. 21). X, 189 S., 27 Abb., 21 Tab. Berlin-Heidelberg, New York, 1975.

CHAPMAN, S.C.; H.J. BARRETO. Using a chlorophyll meter to estimate specific leaf nitrogen of tropical maize during vegetative growth. Agron. J. 89:557–562, 1997

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHUEIRE, L.M.O.; RANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16s rRNA. Revista Brasileira de Ciência do Solo. v. 27:833–840, 2003.

COLLA, L. M. Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução hipercolesterolemia. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.

COWIE, J. M. G., Miscibility in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Ed, by Mark, Bikales, Overberger, Menges, John Wiley & Sons, New York, vol. supplement, 1989.

COZZA, K. L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: Fatores nutricionais e custos experimentais. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 1999.

CRUZ, S.F. Síntese e caracterização da metilcelulose produzida a partir do caroço de manga para aplicação como aditivo em argamassas. 131p. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

DAMASCENO, R.G. Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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

DE CAIRE, G. Z. et al. Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v.32, p.985-1987, 2000

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.22, p.151-175, 1998.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Legume seed inoculation technology–review. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 36: 1275 – 1288. 2004.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. *Soil Biology & Biochemistry*, v.39, p.573-580, 2007.

DENARDIN, N.D.; FREIRE, J.R.J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 16:215– 217, 2000.

DERNER, R. B., S. OHSE, M. VILLELA, S. M. de CARVALHO e R. FETT. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* n. 36, v. 6, p. 1959 -1967, 2006.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. Rio de Janeiro: Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1989.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência*, p. 2-3, 1997.

EDWARDS, M.R.; HAUER, C.; STACK, R. F.; EISELE, L.E.; MACCOLL, R. Thermophilic Cphycocyanin: effect of temperature, monomer stability and structure. *Biochimica et Biophysica ACTA*, v.1321, p. 157-164, 1997.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; DE - POLLI, H.; ALMEIDA, D. L.; ABBOUD, A.C. S. Adubação verde com leguminosas. Embrapa Agrobiologia - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica,. 49p., 2005.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, v. 56, p. 497-500, 2001.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA. ClorofiLOG: Conceitos e Características Básicas. 2015. Disponível em: < <http://www.falker.com.br/faq/clorofilog.html>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

FAO. FAOSTAT. Crops. Cowpeas, dry. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acessado em 24 set. 2014.

FAY, P. The Blue Greens. London: Edward Arnold, 1983.

FERNANDES JÚNIOR, P. I., Avaliação Composições Poliméricas A Base De Carboximetilcelulose (CMC) e Amido Como Veículos De Inoculação De *Bradyrhizobium japonicum* Em Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Dissertação (Mestrado) - Curso De Pós-Graduação Em Agronomia Ciência Do Solo, UFRRJ, 52p, Seropédica, 2006.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N, G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(9), 1184-119, 2009.

FERREIRA, E. M.; CASTRO, I. V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 27, p.1177-1183, 1995.

FRANCO, M.C.; CASSINI, S.T.A.; OLIVEIRA, V.R., VIEIRA, C.; TSAI, S.M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e mesoamericano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, p.1145-1150, 2002.

FREIRE, J.R.J. Trabalhos em Rizobiologia no Rio Grande do Sul. IN: Reunião Latino-Americana. Inoculantes Leguminosa, 4, Porto Alegre, Anais..., 19-24, 1968.

FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. Artigo de Revisão, 1999.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. dos. Melhoramento genético: In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Org.). Feijão caupi: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa - Informação Tecnológica, p 28-92, 2005b.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; Acesso em 02 março 2015.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs *Field Crops Research*, v. 65, p. 93-106, 2000

HAYAKAWA, Y. et al. Calcium spirulan as an inducer of tissue-type plasminogen activator in human fetal lung fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1355, p.241-247, 1997.

HAYASHI, T.; HAYASHI, K. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Natural Products*, Columbus, v.59, p.83-87, 1996.

HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: Superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones S. A. Urano, 1994.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. *Field Crops Research*, v.65, n.1, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: Werner, D.; Newton, W.E. (eds.). (org.). *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Dordrecht, Amsterdam: Springer, v.4, p. 25-42, 2005.

IWATA, K.; INAYAMA, T.; KATO, T. Effects of *Spirulina platensis* on fructose-induced hyperlipidemia in rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v. 40, p. 463-467, 1987.

IWATA, K.; INAYAMA, T.; KATO, T. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 36, p. 165-171, 1990.

JANSEN, P.; SOARES, B. G. Effect of compatibilizer and curing system on the thermal degradation of natural rubber/EVA copolymer blends. *Polymer Degradation and Stability*, 52, p. 95-99, 1996.

JORDAN, D. C. Family III Rhizobiaceae CONN 1938, 321AL. In: KRIEG, N.R.H.J.G, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Wiliam and Wilkins. Baltimore, p. 235-244., 1984.

KÄISTNER, U., HOFFMANN, H., DÖNGES R. AND HILBIG, J. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* 123-124, 1996.

KATO, T. Utilization of blue pigment from *Spirulina* particularly for frozen desserts and drinks. *New Food Industry*, 29 (3): 17-21, 1987.

KEYSER, H.H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: Metting, F.B. (Ed) *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, New York: Marcel Decker, p. 205 – 226, 1992.

LANGYINTUO. A. S.; DeBOER, J.L.; ARNDT, C. Potential Impacts of the Proposed West African Monetary Zone on Cowpea Trade in West and Central Africa. Purdue University, Department of Agricultural Economics, Canada, 2005.

LEE, J. B. et al. Structural Analysis of Calcium Spirulan (Ca-SP)-Derived Oligosaccharides Using Eletspray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Natural Products*, Columbus, v.63, p.136-138, 2000.

LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Science Society of America Journal*, v.45, p.852-855, 1981.

LONG, S.R. Rhizobium genetics. *Annu. Rev. Genet.* 23:483-506, 1989.

LOTTE, K.K. Blue chewing gum. Japanese Patent 5547866, 1980.

LUPWAKI, N.Z; RICE, W.A.; CLAYTON, G.W. Rhizobial inoculants for legume crops. *Journal of Crop Improvement*, 15:289-321, 2005.

MELO, G.W.B.M.; BORTOLOZZO, A.R.; VARGAS, L. Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico. Sistemas de Produção, 15 (versão Eletrônica), Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 2006.

MELO, K. C. Avaliação e modelagem reológica de fluidos de perfuração base água. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2008.

MENDES, I. C.; JUNIOR, F.B.R.; CUNHA, M.H. 20 perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2010.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. Journal of Hygiene, v.38, p.732-749, 1938.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI FILHO, J. Antioxant activity of the microalga *Spirulina maxima*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 31, p. 1075-1079, 1998.

MIRANDA, R. S.; SUDERIO, F.B.; SOUSA, A.F.; GOMES FILHO, E.. Deficiência nutricional em plântulas de feijão-de-corda decorrente da omissão de macro e micronutrientes. Rev. Ciênc. Agron., Fortaleza, v. 41, n. 3, p. 326-333, Sept. 2010.

MORENO, J.; VARGAS, M. A; OLIVARES, H.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v.60, p.175-182, 1998.

NETO, D. C.; PINOTTI, M. H. Exopolissacarídeos de Cianobactérias. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, n. 1, p. 43-52, jan./jun. 2004.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. Legume bacteriology. In: SHAM, N.H.; BRYAN, W.W. (Ed.). Tropical pasture research: principles and methods. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, p.134-174, 1976.

OLIVEIRA, T. S. Seleção de genótipos tradicionais e melhorados de feijão-caupi adaptados à região semiárida piauiense. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

PAERL, H. W. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. *Adv Exp Med Biol.*,619:217-3, 2008.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D.K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.53, p.213-222, 2007.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, v. 56, p. 371-375, 2003.

PESTANA, C.C. Estrutura e Propriedades dos Materiais Poliméricos. Curso de Tecnologia em Mecatrônica, Ciência dos Materiais. UNINOVE, 2009.

PIEKIELEK, W.P.; FOX, R.H.; TOTH, J.D. & MACNEAL, K.E. Use of a chlorophyll meter at the early dent stage of corn to evaluate N sufficiency. *Agronomy Journal*, v.87, p.403- 408, 1995.

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. *Food Technology and Biotechnology*, 34(2-3), 87-90, 1996.

PINOTTI, M.H.P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. *Semina*, v. 12, n. 4, p.27S-280, dez. 1991.

PROSPERI, C. H. A cyanophyte capable of fixing nitrogen under high levels of oxygen. *Journal of Phycology*, Lawrence, v.30, p.222-224, 1994.

RAMAMOORTHY, A.; PREMAKUMARI, S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. *Journal Food Science Technology*, v. 33 (2), p. 124-128, 1996.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.& EICHHORN,S. E. *Biologia Vegetal*. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

REDDY, K. J. et al. Phenotypic variation in exopolysaccharide production in the marine, aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v.12, p.311- 318, 1996.

RELARE. Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 2004. Disponível em: <<http://www.relare.org.br>>. Acessado em janeiro de 2015

RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, ISBN 0-8493- 3240-0, 1990.

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

ROSA, D.S.; FRANCO, B.L.M.; CALIL, M.R. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. *Polímeros–Ciência e Tecnologia*. v.11 (2) 82–88, 2001.

SCHADCHINA, T. M.; DMITRIEVA, V. V. Leaf chlorophyll content as a possible diagnostic mean for the evaluation of plant nitrogen uptake from the soil. *Journal of Plant Nutrition*, New York, v.18, p.1427-1437, 1995.

SCHLUMBERGER, Dipmeter Interpretation, Volume I. Fundamentals, 61. New York, 1982.

SCHUH, C.A. Biopolímeros como suporte para inoculantes. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, 2005.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1437-1443, 2009.

SINGHT, B. B. ; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding, 2002.

SMEAL, D.; ZHANG, H. Chlorophyll meter evaluation for nitrogen management in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.25, n.9/10, p.1495-1503, 1994.

SHIROMA, P. H.. Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de bentonita e CMC: influência da concentração do NaCl. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

STOKING, C.R.; ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. *American Journal of Botany*, Columbus, v.49, n.3, p.284-289, 1962.

TANNER, R. I. *Engineering Rheology*. Ed. Rev. New York: Oxford University Press, 451p., 1988.

TASCA, F. A. Volatilização de amônia a partir da aplicação de duas fontes de nitrogênio, em laboratório. Dissertação (Mestrado em Ciência Agroveterinárias), Universidade do Estado de Santa Catarina. 2009.

TATTERSALL, G. H.; BANFILL, P. F.G. *The rheology of fresh concrete*. London: Pitman, 347p. ,1983.

TEMPRANO, F.J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO M.; DAZA A.; SANTAMARÍA, C.; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. *International Microbiology*. v. 5: 81–86, 2002.

TORRES-DÚRAN, P. V.; MIRANDA-ZAMORA, R.; PAREDES-CARBAJAL, M. C.; MASCHER, D.; BLÉ-CASTILLO, J.; DÍAZ-ZAGOYA, J. C.; JUAREZ-OROPEZA, M. A. Studies on the preventive effect of *Spirulina* maxima on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 141-147, 1999.

UNIVERSIDADE DO TEXAS. By genus. *Anacystis – Arthrospira*. UTEX #1926 *Spirulina platensis*. Disponível em: <http://www.utex.org/algaeDetail.aspx?algaeID=4383>
Acesso em: junho de 2015.

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

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quím. Nova*, v.27, n. 1, 2004.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. London: International Biological Programme, p. 3-4, 1970.

VONSHAK, A. Recent Advances in microbial biotechnology. *Biotechnology Advances*, New York, v.8, p.709-727, 1990.

WANDER, W.E. Produção e participação brasileira no mercado internacional de feijão-caupi. In: Congresso Brasileiro de feijão-caupi – III CONAC, Recife, 2013.

WINTER, H.H. e CHAMBON, F. Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 30, 367-382, 1986.

YALCIN, I. et al. Characterization of the extracellular polysaccharide from freshwater microalga *Chlorella* sp. *Lebensmittel Wissenschaft. und Technology*, London, v.27, p.158-165, 1994.

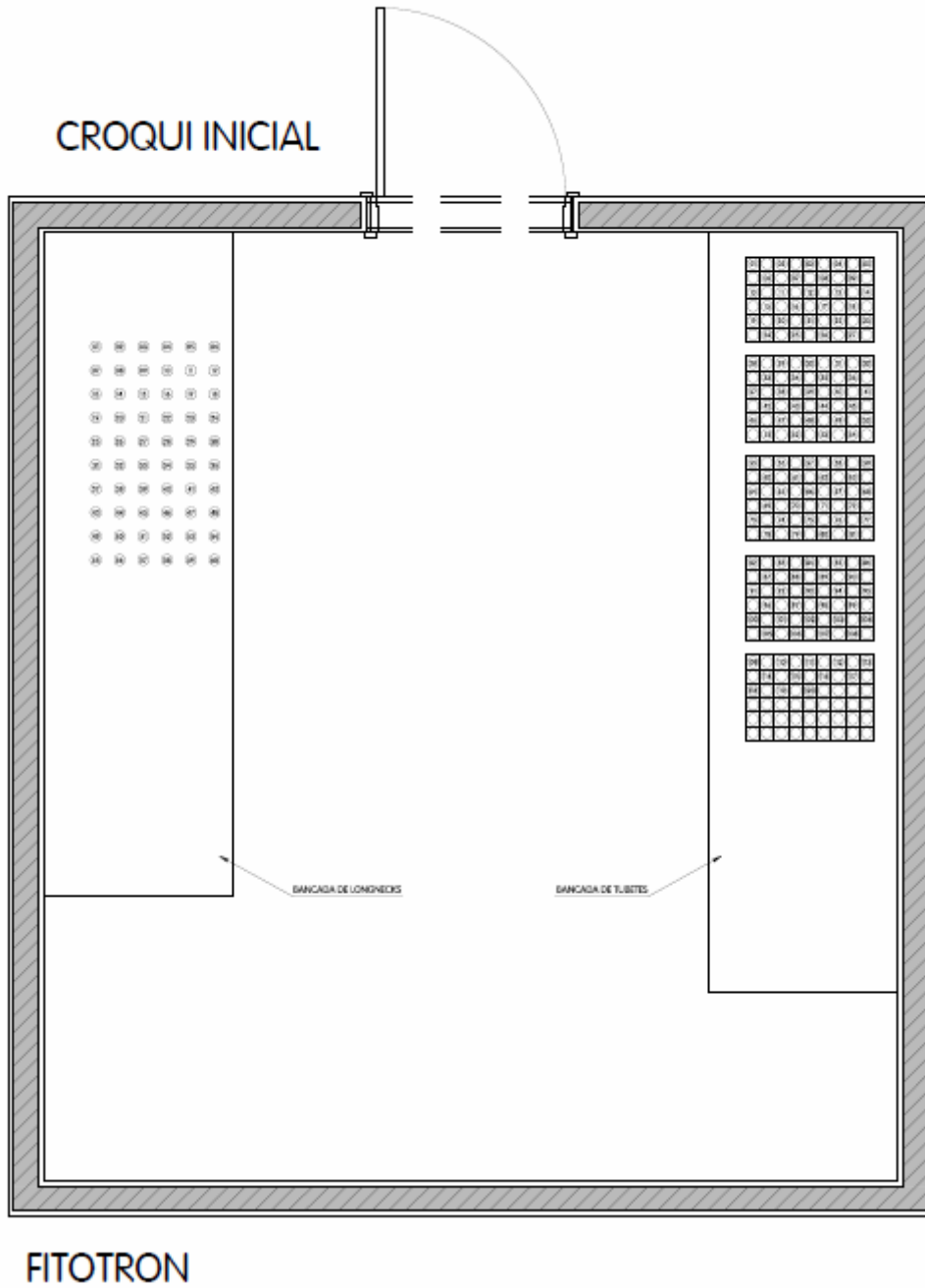
YANG, H. N.; LEE, E. H.; KIM, H. M. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sciences*, v. 61, p. 1237-1244, 1997.

ZILLI, J.E.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. BR 3262: nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 7p, 2008.

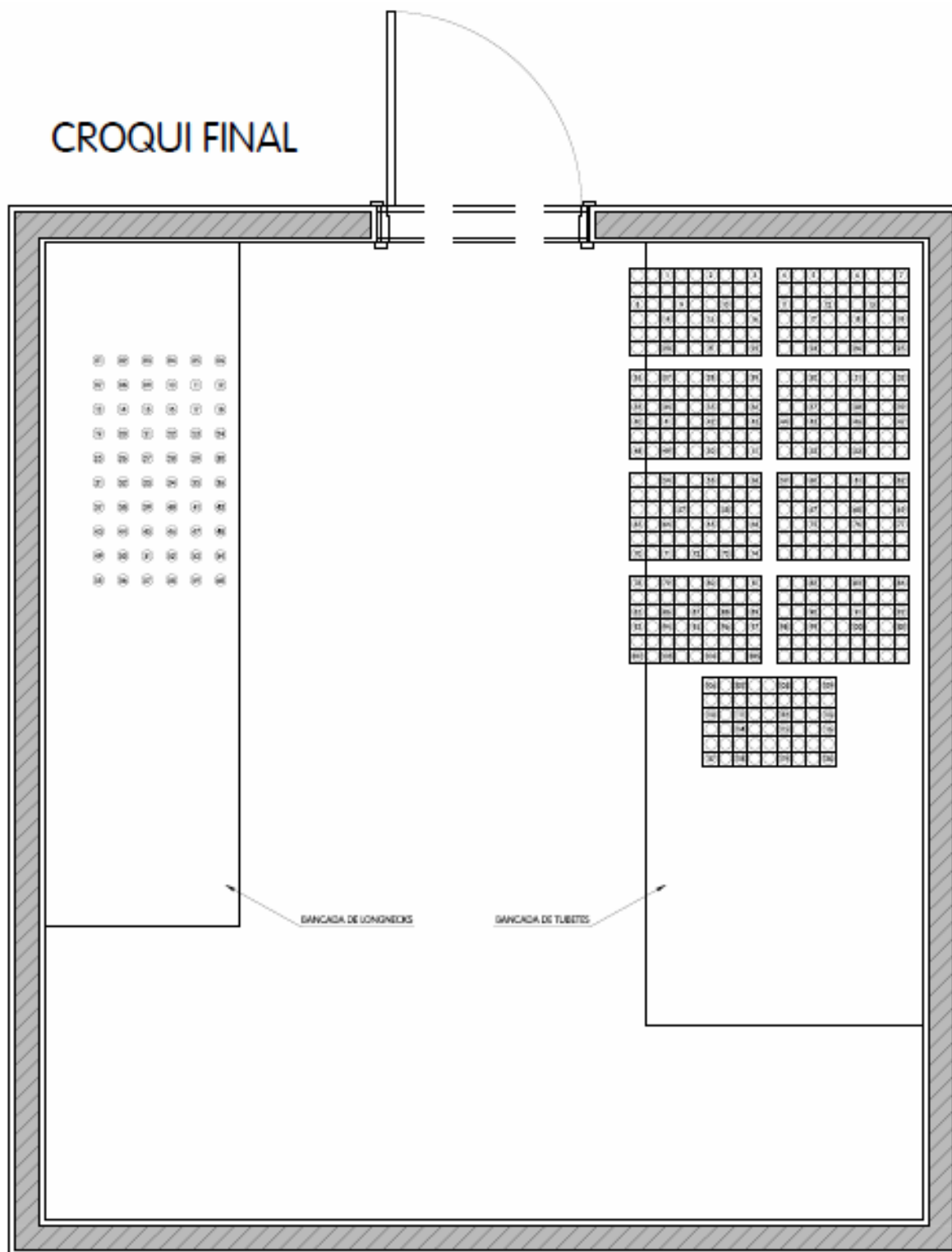
ZILLI, J.E.; SMIDERLE, O.J.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. *Revista Agro@mbiente On-line*, v.4, n.2, p.56-61, jul-dez, 2010.

9 ANEXOS

ANEXO A: Croqui inicial dos experimentos de *longnecks* e tubetes em Câmara de Crescimento de Plantas tipo *Fitotron* na Embrapa Agrobiologia.



ANEXO B: Croqui final dos experimentos de *longnecks* e tubetes em Câmara de Crescimento de Plantas tipo Fitotron na Embrapa Agrobiologia.



FITOTRON