

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOCOMPOSTOS UTILIZANDO UMA ESTRATÉGIA SEQUENCIAL DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS VISANDO A REDUÇÃO NO USO DE HERBICIDAS QUÍMICOS

EDUARDA ROBERTA BORDIN^{1,2}, ALINE F. CAMARGO^{1,2}, SABRINA WEIRICH^{2,3},
CARINE CAREZIA^{2,3}, HELEN TREICHEL^{2,4}

1 Introdução

O aumento da produção agrícola devido ao crescimento da população mundial corroborou com a incessante busca por novas tecnologias de manejo visando à ampliação da produtividade (ALMEIDA, 2014). Entretanto, a intensificação desta produção acarreta, direta ou indiretamente, em impactos ao meio ambiente, principalmente por consequência do aumento de cerca de dois milhões de toneladas no uso de pesticidas por ano (FAO & ITPS, 2015).

Diante das consequências negativas da utilização dos herbicidas químicos é significativo considerar o manejo sustentável das plantas daninhas integrado ao uso de novas ferramentas como os herbicidas biológicos. Dessa forma, através de uma metodologia de otimização de processos utilizando uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais, é possível delimitar as melhores condições para a produção dos bioherbicidas (KLAIC, 2014).

2 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de biocompostos utilizando a técnica de planejamento de experimentos, visando a redução no uso de herbicidas químicos.

3 Metodologia

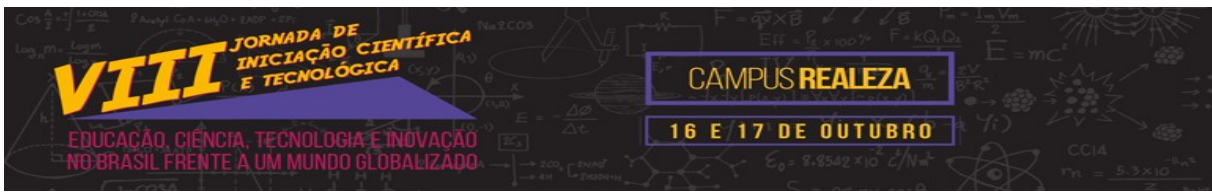
O microrganismo *Trichoderma koningiopsis* foi utilizado por apresentar resultados promissores em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. A otimização da produção dos biocompostos foi realizada através de uma sequência de planejamentos

1Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Bolsista** contato: eduardabordin@yahoo.com.br

2Grupo de Pesquisa em Agroenergia e Linha de Pesquisa em Bioprocessos e Aplicação em Bioenergias

³Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

⁴Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Orientador**



experimentais, iniciada pela metodologia de delineamento experimental do tipo Plackett&Burman (PB) com 12 ensaios mais 3 pontos centrais, onde foram investigados: pH (5.0 - 7.0); glicose (0.75 - 2.25 g/mL); extrato de levedura (0.75 - 1.50 g/mL); peptona (0.75 - 2.25g/mL); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.00 - 0.15 g/mL); $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ (0.00 - 0.15 g/mL); $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ (0.00 - 0.30 g/mL) e $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ (0.00 - 0.30 g/mL). Após, uma fermentação com as condições que apresentaram melhores resultados no primeiro planejamento foi conduzida em triplicata, com as condições fixas de pH (6.00), glicose (1.50 g/mL), extrato de levedura (1.12 g/mL), peptona (1.50 g/mL), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.07 g/mL) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.15 g/mL). O Delineamento Composto Central Rotacional com três fatores investigados (DCCR 2³), o qual foi composto pelos pontos fatoriais, por 6 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios, e teve os parâmetros: glicose (0.99 - 3.51 g/mL), extrato de levedura (0.24 - 2.76 g/mL) e peptona (0.12 - 1.30 g/mL) avaliados, foi o último planejamento realizado. Os dados obtidos através dos ensaios foram analisados com auxílio do Software STATISTICA8.0 através da análise de variância (ANOVA).

As fermentações submersas foram realizadas a uma temperatura de 28 °C em, sob agitação de 120 rpm, por um período de 72 horas. O meio obtido foi posteriormente filtrado para obtenção da biomassa fúngica e do extrato enzimático, sendo a quantificação da biomassa fúngica determinada através do método de massa do micélio seco por mL de meio de cultura. As atividades de amilases e celulases foram determinadas pelo método de ácido dinitrossalicílico (DNS), utilizando a Equação 1. A atividade de lipases foi determinada utilizando a Equação 2, e para a atividade de peroxidases foi utilizado o cálculo da média dos valores da triplicata multiplicado por 1000.

$$ABS = 0.2672 * []ART$$

$$[]ART = \frac{ABS}{0,2672}$$

Equação (1)

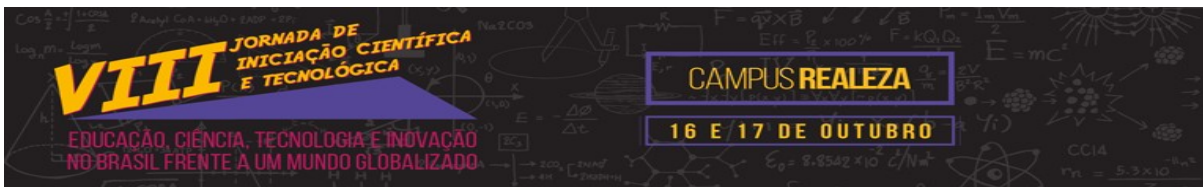
Onde ART corresponde aos açúcares redutores totais.

$$At = \frac{(\bar{A}a - Vb) * MNaOH}{t * Vc} * 1000$$

Equação (2)

Onde, $\bar{A}a$ = média dos valores observados, Vb = valor apresentado pelo controle,

$MNaOH$ = molaridade do Hidróxido de sódio, t = tempo de reação e Vc = volume enzimático utilizado.



A unidade de atividade enzimática (U/mL) foi a quantidade de enzima capaz de catalisar a reação com formação de 1 μmol por minuto de produto nas condições de reação.

O extrato obtido em sua forma bruta e filtrada foi administrado na planta *Euphorbia heterophylla*, com aplicações de até três repetições. Os efeitos foram visualizados após 7 e 14 dias da aplicação, comparando-os a escala diagramática descrita por Nunes e Alves (2012).

4 Resultados e Discussão

Os resultados do primeiro planejamento (PB), indicaram que para praticamente todos os parâmetros analisados, os sais $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram significância ($p < 0,05$) negativa e positiva, respectivamente, enquanto o sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não apresentou significância ($p > 0,05$) para nenhum dos parâmetros. Entretanto, o planejamento PB é fatorial fracionário, e não são feitas todas as combinações possíveis entre as variáveis.

Na fermentação em triplicata os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram retirados e fixados valores para as condições das variáveis que apresentaram os maiores resultados. No entanto, foram obtidos valores inferiores aos do primeiro planejamento, e dessa forma, um planejamento fatorial completo foi realizado, por proporcionar todas as combinações possíveis entre os níveis fatoriais investigados. O planejamento DCCR 2^3 teve as variáveis pH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fixadas em 5,0, 0,60 g/mL e 0,30 g/mL, respectivamente, e os sais $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ retirados após a avaliação dos testes precedentes.

Estes últimos resultados indicaram que o ensaio 8 foi o responsável pela maior produção de biomassa fúngica (9,81 g/L), e quanto as atividades enzimáticas, os ensaios que apresentaram maiores respostas foram o ensaio 2 para amilases (17,25 U/mL) e celulasas (10,62 U/mL), o ensaio 4 para lipases (8,22 U/mL), e o ensaio 14 para peroxidases (169,00 U/mL). Com os resultados satisfatórios obtidos, foi possível identificar a significância das variáveis, e verificar a validação dos modelos empíricos propostos (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta os modelos matemáticos validados para biomassa fúngica e atividade de celulasas, sendo que os modelos para atividade de amilases, lipases e peroxidases não foram validados. Sendo assim, através das análises e após a otimização do processo fermentativo percebeu-se que os ensaios 2 e 12 apresentaram melhores características para serem utilizados com potencial bioherbicida, pois o ensaio 2 apresentou maiores respostas para a atividade de amilases, celulasas e lipases, e o ensaio 12 apresentou maiores respostas para a quantificação de biomassa fúngica e para a atividade de peroxidases.



Dessa forma, os mesmos foram utilizados para análise do potencial fitotóxico, onde foi possível identificar uma fitotoxicidade de até 90% na área foliar das plantas *E. heterophylla* que obtiveram aplicações com três repetições do biocomposto produzido através do ensaio 2 não filtrado e uma fitotoxicidade de até 60% através da aplicação do ensaio 12 não filtrado utilizando três repetições de aplicações.

5 Conclusão

Biocompostos foram desenvolvidos e otimizados através da utilização do microrganismo *T. koningiopsis*, visando sua aplicação com função bioherbicida. Atividades enzimáticas foram registradas para diferentes enzimas estudadas, indicando uma ação de forma conjunta na planta teste permitindo a atuação do microrganismo, evidenciada através da aplicação preliminar, onde foram observados efeitos de amarelecimento das folhas da planta *E. heterophylla*.

Tabela 1. Modelos matemáticos validados para a produção de biomassa fúngica e para a atividade enzimática de celulases.

	Modelo	R ²	F _{calc} /F _{tab}
Produção de biomassa fúngica	$4,57+0,42*v_1+0,27*v_1*v_1+2,93*v_2+0,37*v_2*v_2+0,86*v_3-0,03*v_3*v_3-0,13*v_1*v_2+0,05*v_1*v_3+0,35*v_2*v_3$	0.93	2.71
Atividade enzimática para celulases	$3.92+0,98*v_1 - 3.71*v_2-0,43*v_3 -0,89*v_1*v_2-0,10*v_1*v_3+0,44*v_2*v_3$	0.87	73.80

Onde, V1 = glicose, V2 = extrato de levedura e V3 = peptona.

Referências

ALMEIDA, T. C. **Formulação de um herbicida biológico produzido através da fermentação submersa em biorreator**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

FAO; ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.

KLAIC, R. **Produção de bioherbicida por processos fermentativos a partir do fungo *Phoma sp.*** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

NUNES, C. C.; ALVES, S. A. M. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da severidade de entomosporiose em folhas de pereira. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 239-244, 2012.

Palavras-chave: atividade enzimática; biomassa fúngica; microrganismo; biocompostos.

Financiamento PROBITI - CNPq