BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Estudo da produção de *Trichoderma stromaticum*
em fermentação em substrato sólido**

Rodrigo de Oliveira Moraes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora
Dr^a Deise Maria Fontana Capalbo

São Paulo
2004

17943

DEDALUS - Acervo - CQ

30100006119

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moraes, RodrigodeOliveira
M827e Estudo da produção de *Trichoderma stromaticum* em
fermentação em substrato sólido / Rodrigo de Oliveira Moraes.
São Paulo, 2004.
131p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Capalbo, Deise Maria Fontana

1. Fermentação : Tecnologia química 2. Cacau : Biotecnologia
Biotecnologia 3. Trichoderma : Micologia I. T. II. Capalbo,
Deise Maria Fontana, orientador.

660.28449 CDD

Rodrigo de Oliveira Moraes

Estudo da produção de *Trichoderma stromaticum*
em fermentação em substrato sólido

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Dr^a Deise Maria Fontana Capalbo
Orientadora / Presidente

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São Paulo, 18 de fevereiro de 2004

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Aos meus pais Edézio, o porto seguro,
e Iracema, a conselheira na vida e na profissão.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Deise Maria Fontana Capalbo pela amizade, paciência, confiança e orientação antes, durante e depois (espero) deste trabalho.

À Rosana de Oliveira Moraes, obrigado de coração por segurar o rojão toda vez que precisei.

À Regina de Oliveira Moraes Arruda, ao Renato Martins Arruda, e aos pequeninos Ian e Lon, obrigado por animarem meus finais de semana com suas visitas.

Aos “irmãos” Carlos Alberto Rodrigues Torres e Adriano Grassi de Lima e à “mãe” Maria Goreti Grassi, obrigado por saber que estão aí.

Aos professores, funcionários e colegas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP que colaboraram para o desenvolvimento desta tese.

À Embrapa Meio Ambiente pela oportunidade de realizar a parte experimental deste trabalho em suas dependências. Em especial aos pesquisadores Claudia Medugno, Itamar Melo, Raquel Nogueira, Roberto Cesnik, Shirlei Scramin, Sonia Queiroz e Vera Ferracini, que muito me auxiliaram neste trabalho.

Aos amigos da Embrapa Meio Ambiente, Cadu, Carla, Dagmar, Décio, Emanuelle, Erica, Lidiane, Manoel, Marisa, Miriam, Paulo e Rosely, tanto pela ajuda em relação ao trabalho quanto pelas horas de descontração.

Aos Professores Ranulfo Monte Alegre (FEA – Unicamp) e Vanildo Luiz Del Bianchi (Ibilce – Unesp), pelas valiosas colaborações para a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Renato Haddad (FCM – Unicamp), Regina Sparrapan (IQ – Unicamp) e Marcos Eberlin (IQ – Unicamp) pelos ensaios de Espectrometria de Massas.

Aos amigos do Pio XII, da Unesp, da Unicamp, do tênis, do squash, do motociclismo, obrigado por tudo e desculpem a ausência.

A Deus, pela vida e por colocar toda essa gente boa no meu caminho.

À Fapesp pela bolsa de estudos e por financiar em parte este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fermentação em Substrato Sólido	1
1.2. <i>Trichoderma</i> sp.	2
1.3. Desenvolvimento de uma metodologia rápida e precisa para a determinação do crescimento microbiano	2
1.4. Otimização da produção de <i>Trichoderma stromaticum</i> em FSS	3
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. A lavoura do cacau - aspectos relevantes	5
3.1.1. Aspectos econômicos	5
3.1.2. Aspectos fitossanitários de importância econômica para a cultura de cacau	6
3.2. Controle biológico na cultura do cacau	9
3.2.1. O fungo <i>Trichoderma</i>	9

3.2.2. A espécie <i>Trichoderma stromaticum</i>	12
3.3. Processo Fermentativo	16
3.3.1. Fermentação em Substrato Sólido (FSS)	16
3.3.2. Aplicações da FSS	17
3.3.3. Vantagens e desvantagens da FSS	18
3.3.4. Reatores para FSS	20
3.3.5. Microrganismos usados em FSS	21
3.3.6. Substratos para FSS	22
3.3.7. Parâmetros importantes em processos de FSS	23
3.3.7.1. Temperatura	24
3.3.7.2. pH	24
3.3.7.3. Atividade de água (a_w)	25
3.3.7.4. Nível de oxigênio	26
3.4. Determinação de biomassa	26
3.5. Espectrometria de Massas	29
3.6. Otimização dos parâmetros para produção em FSS	31
3.6.1. Planejamento de experimentos	32
3.6.2. Otimização	32
3.6.3. Modelagem de misturas	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Microrganismo	34
4.2. Meios de cultura	35
4.3. Biorreator	36
4.4. Determinação de atividade de água	37
4.4.1. Correlação entre umidade em base úmida (U_{bu}) e atividade de água (a_w) para o substrato farelo de trigo	37
4.5. Determinação do pH	39
4.6. Obtenção e padronização do inóculo	39
4.7. Extração da enzima quitinase	40
4.7.1. Centrifugação	40

4.8. Estabelecimento de uma análise rápida da viabilidade do produto	46
4.8.1. Plaqueamento	46
4.8.2. Contagem direta do extrato ao microscópio	47
4.8.3. Atividade enzimática de quitinase	48
4.8.2. Determinação da concentração de <i>T. Stromaticum</i> através da redução de DMSO	50
4.9. Planejamento Experimental: Triagem de variáveis e otimização do processo	51
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 52
5.1. Fermentação em reator de bandeja	52
5.1.1. Estimativa do pH inicial do substrato	52
5.1.2. Estimativa de biomassa através da atividade enzimática de quitinase	53
5.1.3. Primeiro planejamento para triagem de variáveis	55
5.1.4. Segundo planejamento para triagem de variáveis	57
5.1.5. Terceiro planejamento para triagem de variáveis	59
5.2. Troca dos bioreatores de bandeja pelas bolsas de polipropileno	65
5.2.1. Primeiro planejamento para fermentação em reatores de bolsa	68
5.2.2. Segundo planejamento para fermentação em reatores de bolsa	72
5.2.3. Terceiro planejamento para fermentação em reatores de bolsa	74
5.3. Estudo da cinética do crescimento de <i>T. stromaticum</i> em reator de bolsa	77
5.4. Determinação da concentração de <i>T. stromaticum</i> através da concentração de DMS liberado, por espectrometria de massas	78
5.4.1. Detecção de DMS e escolha dos sinais característicos deste composto por espectrometria de massas	79
5.4.2. Determinação do tempo de reação para a redução de DMSO para DMS por <i>T. stromaticum</i>	81
5.4.3. Realização da Curva Analítica para relação entre concentração de DMS e resposta do espectrômetro de massas	83

5.4.4. Correlação entre a quantidade de <i>T. stromaticum</i> e a concentração de DMS liberado	86
5.5. Discussão dos resultados	90
5.5.1. Fermentação em reatores de bandeja	90
5.5.2. Fermentação em reatores de bolsa	91
5.5.3. Determinação da concentração fúngica através da redução de DMSO a DMS	93
6. CONCLUSÕES	94
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

FIGURAS

1. Produção Mundial de Cacau em Grão (dados CEPLAC, 2003)	7
2. Cacaueiro saudável encontrado na Bahia. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo	8
3. Galho de cacaueiro com ramificações excessivas (vassoura-de-bruxa), encontrado na Bahia. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo	8
4. Exemplos de sintomas de vassoura-de-bruxa encontrados em Manaus/AM. Fotos superiores mostram plantas de cupuaçu. Fotos inferiores mostram cacaueiros. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo	9
5. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostradas estromas do fungo, com aumento de 100 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente)	13
6. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostradas pústulas do fungo (formação esférica mais escura), com aumento de 200 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente)	14
7. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostrados tecidos parenquimatosos do fungo, com aumento de 1000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente)	14
8. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostrados conidióforos e conídios do fungo, com aumento de 1400 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente)	15

9. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostrados conídios do fungo, com aumento de 2000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).	15
10. Eletromicrografia de varredura de <i>Trichoderma stromaticum</i> , crescendo em meio BDA, onde são mostrados conídios do fungo, com aumento de 20000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente)	16
11. Esquema básico do espectrômetro de massas monoquadrupolar e seus componentes	30
12. Frasco de manutenção do microrganismo	35
13. Representação gráfica da correlação entre U_{bu} e a_w para farelo de trigo a 25° C	38
14. Frasco de Roux com meio de cultura colonizado por <i>T. stromaticum</i>	41
15. Adição de 100 mL de água esterilizada em frasco de Roux	41
16. Pérolas de vidro usadas para a raspagem do microrganismo	42
17. Frasco de Roux com o microrganismo já raspado	42
18. Coleta da suspensão de esporos de <i>T. stromaticum</i>	43
19. Diluição e homogeneização da amostra para contagem de esporos	43
20. Câmara de Neubauer para contagem de esporos	44
21. Imagem dos esporos de <i>T. stromaticum</i> na Câmara de Neubauer, em microscópio ótico	44
22. Diferentes concentrações de esporos de <i>T. stromaticum</i>	45
23. Inoculação em reator de bandeja	45
24. Estrutura da Poli-[1→4]-β-N-acetil- -glucosamina	49
25. Estrutura da N-acetil-D-glucosamina	50
26. Curva-padrão de concentração de N-acetil-D-glucosamina por absorvância	54
27. Estimativa dos efeitos dos parâmetros em comparação ao valor de $t_{(3, 0,025)}$, com três graus de liberdade e área de probabilidade de 0,025 (3,182)	57
28. Fotografia dos reatores com o substrato fermentado para o terceiro planejamento. Os números em branco referem-se aos ensaios respectivos	61
29. Fotografia de um reator com o substrato fermentado com a_w inicial maior	62
30. Fotografia de um reator com o substrato fermentado com a_w inicial menor	62

31. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da atividade de água (a_w) e do fotoperíodo (L), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central)	65
32. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da concentração inicial de esporos (X) e da atividade de água (a_w), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central)	69
33. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da adição de aveia e da atividade de água (a_w), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central)	70
34. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da concentração de esporos (X) e da adição de aveia, em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central).	70
35. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da atividade de água (a_w) e do fotoperíodo (L), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central)	74
36. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da atividade de água (a_w) e da massa de substrato por reator (m), em valores codificados	76
37. Cinética do crescimento de <i>T. stromaticum</i> observada em relação à atividade enzimática de quitinase	78
38. Esquema do sistema utilizado para análise de DMS em espectrômetro de massas	79
39. Espectro de massas do DMS. Fonte: National Institute of Standards Technology	80
40. Esquema do sistema para análise da cinética da reação de DMSO para DMS por espectrometria de massas	82
41. Espectro da cinética da redução de DMSO para DMS por <i>T. stromaticum</i> obtido através do espectrômetro de massas operando em modo seletivo de íons (SIM)	82
42: Espectro de massas em modo SIM do íon de m/z 47 para os padrões de diferentes concentrações de DMS	85
43. Curva Analítica do íon de m/z 47 que relaciona a intensidade do sinal do espectrômetro de massas, em modo SIM, com a concentração de DMS dos padrões	85

44. Espectro de massas para as amostras de *T. stromaticum* com DMSO após seis horas de reação (os números sob cada uma das curvas referem-se à amostra correspondente). 87
45. Correlação entre a concentração de DMS obtida através da Curva Analítica e o valor do logaritmo na base dez da quantidade de esporos presente em cada amostra 89

QUADROS

1. Níveis de garantia do farelo de trigo	35
2. Níveis nutricionais da aveia	36
3. Amostras de farelo de trigo com diferentes U_{bu} e o valor correspondente em a_w	38
4. Planejamento para criação de um modelo para a estimativa de pH inicial do substrato, e as respostas obtidas	53
5. Absorvância observada a 540 nm para diferentes concentrações de N-acetil-D-glucosamina	54
6. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o primeiro ensaio	55
7. Estimativa dos efeitos de todos os fatores estudados no planejamento	55
8. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o segundo ensaio	58
9. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento	58
10. Estimativa dos efeitos para os fatores de maiores efeitos estudados no planejamento	59
11. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o terceiro ensaio	60
12. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no terceiro planejamento	63
13. Estimativa dos efeitos para os fatores de maiores efeitos estudados no planejamento	63
14. Experimentos para determinação das causas do não crescimento do microrganismo em bolsas de polipropileno	67

15. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o primeiro ensaio em bolsa	68
16. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento	68
17. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o segundo ensaio em bolsa	72
18. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento	73
19. Estimativa dos efeitos para os fatores mais importantes estudados	73
20. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o terceiro ensaio em bolsa	75
21. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados	75
22. Respostas obtidas em atividade enzimática para cada um dos ensaios de fermentação de <i>T. stromaticum</i> em função do tempo de fermentação	77
23: Padrões de DMS para elaboração da curva padrão	84
24: Valores de intensidades máximas para cada uma das concentrações padrão de DMS obtidas no espectrômetro de massas (m/z 47)	84
25. Quantidade de esporos de <i>T. stromaticum</i> por amostra e o valor de intensidade encontrado ao espectrômetro de massas (m/z 47)	88
26. Valor do logaritmo na base dez da quantidade de esporos e concentração de DMS obtida através da Curva Analítica [DMS] x Intensidade	89

ANEXOS

1. Planejamento Experimental: Triagem de variáveis e otimização do processo	106
1.1. Exemplo de Planejamento de Experimentos	106
1.2. Triagem de Variáveis	106
1.3. Otimização de Variáveis	112
2. Planejamento de experimentos em valores codificados para o primeiro ensaio	120
3. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o primeiro ensaio	120
4. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o primeiro planejamento de experimentos	121
5. Planejamento de experimentos em valores codificados para o segundo ensaio	122
6. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o segundo ensaio	122
Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o segundo planejamento de experimentos	123
8. Planejamento de experimentos em valores codificados para o terceiro ensaio	124
9. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o terceiro ensaio	124
10. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o terceiro planejamento de experimentos	125
11. Planejamento de experimentos em valores codificados para o primeiro ensaio em bolsa	126
12. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o primeiro ensaio em bolsa	126
13. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o primeiro planejamento de experimentos em bolsa	127

14. Planejamento de experimentos em valores codificados para o segundo ensaio em bolsa	128
15. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o segundo ensaio em bolsa	128
16. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o segundo planejamento de experimentos em bolsa	129
17. Planejamento de experimentos em valores codificados para o terceiro ensaio em bolsa	130
18. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o terceiro ensaio em bolsa	130
19. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o terceiro planejamento de experimentos em bolsa	131

FIGURAS (ANEXO)

1.1. Valores previstos para o modelo contra valores observados nas respostas	108
1.2. Coeficientes da Regressão retornados pelo programa Statistica, onde $t(v)$: o valor para análise da distribuição t com v graus de liberdade; p : valor de α para cada fator. α máximo foi definido para esta análise como sendo 0,05, ou seja, o valor previsto ter 95% de probabilidade de estar no limite de confiança; 95%, Lim.Cnf.: valores mínimos e máximos esperados para cada fator ao Nível de Confiança de 95%	108
1.3. Cálculo matricial dos coeficientes da regressão	109
1.4. Cálculo matricial dos erros padrão	110
1.5. Valores de t tabelados, para vários graus de liberdade v e áreas de probabilidade	111
1.6. Previsão dos resultados variando-se T , X e U entre seus maiores e menores níveis	111
1.7. Valores previstos para o modelo contra valores observados nas respostas	114
1.8. Coeficientes da Regressão retornados pelo programa Statistica, onde $t(v)$: o valor para análise da distribuição t com v graus de liberdade; p : valor de α para cada fator. α máximo foi definido para esta análise como sendo 0,05, ou seja, o valor previsto ter 95% de probabilidade de estar no limite de confiança; 95%, Lim.Cnf.: valores mínimos e máximos esperados para cada fator ao Nível de Confiança de 95%	115
1.9. Superfície de Resposta para concentração de inóculo (X) contra umidade (U), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI)	116
1.10. Superfície de Resposta para temperatura (T) contra umidade (U), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI)	117
1.11. Superfície de Resposta para concentração de inóculo (X) contra temperatura (T), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI)	117

QUADROS (ANEXO)

1.1. Valores dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados	106
1.2. Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} , em valores codificados	107
1.3. Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} , em valores reais	107
1.4. Respostas dos ensaios do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2}	107
1.5. Valores dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados	112
1.6. Valores arredondados dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados	112
1.7. Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Ponto Central e Planejamento estrela, em valores codificados	113
1.8. Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Ponto Central e Planejamento estrela, em valores reais	113
1.9. Respostas do Planejamento Fatorial Completo 2^3 com ponto central e Planejamento Estrela	114

NOMENCLATURA

Aveia	Concentração de aveia (% - porcentagem de aveia em relação à massa de farelo de trigo)
a_w	Atividade de água
L	Fotoperíodo (h/dia – horas de exposição à luz por dia)
m	Massa de substrato umedecido por reator (g)
m/z	Razão massa/carga – espectrometria de massas
RCF	Força centrífuga relativa
t	Tempo (dias)
U	Unidade de atividade enzimática de quitinase (capacidade do extrato enzimático em produzir 1 μ mol de açúcar redutor por hora por mililitro, nas condições descritas na metodologia)
U/g _{subs.seco}	Unidade de atividade enzimática de quitinase por grama de substrato seco
U _{bu}	Umidade em base úmida (%)
X	Concentração de inóculo (esp/g – esporos por grama de substrato umedecido)

RESUMO

Vários microrganismos apresentam capacidade de crescer sob condições de Fermentação em Substrato Sólido (FSS). Dentre bactérias, leveduras e fungos, estes últimos representam o grupo mais importante em processos de FSS devido a aspectos fisiológicos e bioquímicos que lhes permitem desenvolvimento em menores níveis de atividade de água. Os parâmetros importantes de sistemas fermentativos são a temperatura, o pH, o nível de oxigênio disponível e a concentração de nutrientes e produtos. Para sistemas FSS, também a atividade de água é muito importante.

O fungo *Trichoderma* sp. vem sendo constantemente estudado como agente fermentador em sistemas de FSS, e o produto da fermentação se mostra efetivo como agente de controle biológico de fitopatógenos. A espécie *Trichoderma stromaticum* mostrou-se capaz de parasitar outro fungo, *Crinipellis pernicioso*, causador da doença do cacaueteiro conhecida como vassoura-de-bruxa, que é a principal determinante da produção limitada da indústria cacaueteira em vários países latino-americanos.

Neste trabalho, estudou-se a fermentação de *T. stromaticum* em meio sólido e a otimização de sua produção em relação a vários parâmetros importantes no sistema, e desenvolveu-se um método rápido e preciso para a determinação de crescimento microbiano através da liberação de dimetilsulfeto (DMS).

Melhores resultados foram obtidos em reatores do tipo bandeja, com o meio de cultura com atividade de água de 0,987, sem iluminação e com concentração de inóculo de $5,0 \times 10^5$ esporos por grama de substrato umedecido contendo farelo de trigo e aveia. A metodologia de determinação da concentração microbiana através da análise da concentração de DMS se mostrou simples e de grande precisão, apresentando uma correlação entre DMS liberado e concentração de esporos de *T. stromaticum* com coeficiente de regressão $R^2 = 0,950$.

ABSTRACT

Bacteria, yeasts and fungi are capable of growing on solid substrates. Amongst these microorganisms, filamentous fungi are the most important for Solid Substrate Fermentation (SSF), owing to their physiological and biochemical properties. Growth at low water activity (a_w) and low pH, production of extra-cellular hydrolytic enzymes and sporulation are some of the characteristics of filamentous fungi which make them suitable for SSF. Parameters such as temperature, a_w , pH, oxygen levels and concentration of nutrients and products are important in SSF processes.

Mass production of *Trichoderma* sp. has been widely studied in SSF process, to apply it in the control of several phytopathogenic fungi. The species *T. stromaticum* production is desired for field application to control *Crinipellis pernicioso*, the agent of a serious fungal disease of cacao, in Latin America, called "witches' broom".

The objectives of this work were to study the mass production of *T. stromaticum* in SSF; to optimize the most important environmental parameters of the system; and to develop a method for biomass estimation through the measurement of dimethyl sulfide (DMS) released during the process.

Best results were obtained in tray bioreactor, a_w of 0.987, in the dark, and inoculum concentration of 5.0×10^5 spores per gram of moisturized substrate containing wheat bran and oatmeal. The methodology for biomass estimation through the analysis of DMS concentration showed to be simple and accurate. The correlation coefficient between the DMS released and the spore concentration of *T. stromaticum* was 0.950.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fermentação em Substrato Sólido

A Fermentação em Substrato Sólido (FSS) é definida como o processo microbiano que ocorre, principalmente, na superfície de materiais umedecidos com capacidade de conter ou absorver água, sem que haja água drenada.

São utilizados processos de FSS atualmente na indústria de alimentos para a obtenção de produtos fermentados, aditivos de alimentos, enzimas, fármacos, ácidos orgânicos, metabólitos fúngicos e agentes de controle biológico.

Os sistemas convencionais de fermentação são conhecidos como Fermentação em Substrato Líquido (FSL), processo em que os microrganismos crescem na fase líquida e onde os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano se apresentam solúveis.

Os sistemas de FSS apresentam vantagens em relação aos sistemas convencionais (FSL) por possibilitarem o uso de substratos insolúveis (subprodutos da agroindústria), permitir condições de assepsia mais amenas, consumir menos água, gerar menos efluentes, apresentar facilidade de aeração e apresentar menores volumes e custos de equipamentos.

Como desvantagens, destacam-se a dificuldade de homogeneização do meio, a baixa capacidade de transferência de calor, a dificuldade na inoculação e o fato dos processos empregados serem descontínuos.

Os tipos de reatores mais usados em sistemas de FSS são: os de leito fixo; os passíveis de agitação, e os agitados.

Bactérias, leveduras e fungos têm capacidade de crescer sob condições de FSS. Os fungos filamentosos, porém, representam o grupo de microrganismos mais importante em processos de FSS devido às suas características fisiológicas e bioquímicas que lhes permitem crescer em menores níveis de atividade de água.

São parâmetros importantes de sistemas de FSS a temperatura, o pH, a atividade de água, o nível de oxigênio e a concentração de nutrientes e produtos.

1.2. *Trichoderma* sp.

O fungo *Trichoderma* sp. apresenta bom desenvolvimento em sistemas de FSS. Sua principal aplicação é como agente de controle biológico de fitopatógenos. O fungo *Trichoderma stromaticum* (Samuels et al., 1999) é uma espécie de *Trichoderma* capaz de parasitar o fungo *Crinipellis perniciosa*, causador da doença do cacauete conhecida como vassoura-de-bruxa. Essa doença é a causa principal da produção limitada de cacau em vários países latino-americanos. No Brasil, causa prejuízos principalmente na região sul da Bahia, onde existem aproximadamente 600.000 ha de cacauetes infectados e mais 700.000 ha de plantas susceptíveis.

1.3. Desenvolvimento de uma metodologia rápida e precisa para a determinação do crescimento microbiano

Um dos entraves no desenvolvimento de estudos em FSS é a determinação do crescimento microbiano no processo. Os métodos frequentemente utilizados necessitam de etapas prévias de extração e purificação para a determinação da concentração de microrganismos. Estas etapas, além de trabalhosas, agregam erros às análises. Um método

promissor para a quantificação microbiana é o da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) a dimetilsulfeto (DMS), pois não há necessidade de preparação prévia do material a ser estudado.

A maioria dos microrganismos já estudados mostra capacidade de reduzir DMSO a DMS. A concentração de DMS liberada por um microrganismo é facilmente determinada através da análise dos gases que envolvem o meio, e resulta em uma precisa correlação com a população microbiana.

1.4. Otimização da produção de *Trichoderma stromaticum* em FSS

Para otimizar a produção de *Trichoderma stromaticum* em FSS, podem ser utilizadas ferramentas estatísticas que permitem extrair de um sistema o máximo de informação útil com um número mínimo de experimentos.

Para a triagem das variáveis mais importantes do processo, pode-se utilizar o Planejamento Fatorial Fracionado. Com as variáveis selecionadas, procede-se a sua otimização através de um Planejamento Fatorial Completo e o conseqüente emprego da Metodologia de Superfícies de Resposta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho visa a obtenção de um produto da fermentação de *Trichoderma stromaticum*, concentrado, com geração mínima de efluente, utilizando um substrato econômico e disponível, e com tecnologia apropriada para a reprodutibilidade do processo nas regiões de cultivo do cacauero.

2.2. Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- determinar um método de análise do produto mais rápido do que os bioensaios normalmente empregados;
- selecionar substratos econômicos e disponíveis nas regiões de aplicação e os nutrientes a serem adicionados a estes substratos em suas devidas proporções;
- selecionar as variáveis mais significativas do processo fermentativo, e
- otimizar a produção através do modelamento empírico do sistema utilizando ferramentas estatísticas de planejamento e otimização de experimentos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A lavoura do **cacau** – aspectos relevantes

3.1.1. Aspectos econômicos

Antigamente, o cacau era produzido principalmente em grandes plantações na América do Sul, África e Ásia. Já para o final dos anos 90, de cinco a seis milhões de pequenos produtores foram responsáveis por mais de 85% da colheita. Tipicamente, cada fazendeiro possui entre 2,5 e 5,0 acres de terra onde crescem cerca de mil pés de cacau.

O cacaueiro cresce melhor entre as latitudes de 20° para o norte ou para o sul do equador. São árvores naturais da floresta tropical, que gostam de crescer à sombra, tradicionalmente sob a cabruca (BECKER, 1999a). Cabruca é o nome do sistema de cultivo do cacau sombreado por diferentes árvores da mata atlântica original, através do raleamento do sub-bosque. A cabruca tem extensão, no sul da Bahia, que varia de 300 e 400 mil hectares, de um total de 550 mil hectares de plantação de cacau (IESB, 2003). Lavouras de cacau não sombreadas estão sendo testadas em larga escala na África Ocidental usando híbridos tolerantes ao sol recentemente desenvolvidos, mas a sustentabilidade destas fazendas de cacau vem sendo questionada principalmente pela necessidade do uso de defensivos químicos e suporte técnico.

A cada ano, é estimado que um terço da lavoura de cacau é perdido devido a doenças e pragas. Inseticidas e fungicidas químicos convencionais não apresentam bons

resultados em regiões tropicais, onde a resistência de insetos se desenvolve rapidamente e chuvas torrenciais simplesmente lavam e carregam os fungicidas das plantas. O alto custo dos defensivos agrícolas e a falta de suporte técnico aumentam este problema (BECKER, 1999a).

O Brasil exporta cerca de US\$ 100 milhões em cacau para os Estados Unidos anualmente, e era tradicionalmente o principal exportador sul-americano. A vassoura-de-bruxa fez com que o Brasil caísse do topo para a oitava posição entre os exportadores. O sul da Bahia produzia e exportava para os Estados Unidos 430 mil toneladas em 1985-86, tendo caído para apenas 130 mil toneladas em 1999 (BECKER, 1999b).

A representação gráfica apresentada na Figura 1 mostra a evolução na produção de cacau em grãos no mundo, por continentes, e no Brasil. Observa-se que, enquanto a produção mundial apresenta tendência de crescimento, a produção nas Américas e notadamente no Brasil decresce, principalmente devido à vassoura-de-bruxa (CEPLAC, 2003).

3.1.2. Aspectos fitossanitários de importância econômica para a cultura de cacau

O cacaueiro, quando atacado pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, apresenta ramificação excessiva nas extremidades dos galhos. Esta ramificação anormal demanda grande quantidade de nutrientes da árvore, ocasionando a diminuição na produção de frutos. Com o posterior ressecamento da ramificação causada pela praga, esta fica com a aparência de uma vassoura, razão da denominação “vassoura-de-bruxa”. A Figura 2 apresenta um cacaueiro saudável, enquanto a Figura 3 mostra um ramo de cacaueiro afetado pela vassoura-de-bruxa, ambos na Bahia. A Figura 4 mostra exemplos de vassouras-de-bruxa encontradas na Amazônia.

A vassoura-de-bruxa é causa fundamental da produção limitada de cacau em vários países latino-americanos. No Peru, *C. perniciosa* é considerada como uma das

enfermidades endêmicas mais destrutivas dos cacauzeiros em nível nacional e na selva do Alto Huallaga (ARÉVALO e CERNA, 1996). No Brasil, causa prejuízos principalmente na região sul da Bahia, onde existem aproximadamente 600.000 ha de cacauzeiros infectados, e 700.000 ha contínuos de cacauzeiros susceptíveis, situação muito semelhante à observada na Amazônia. O controle da doença é fundamental para a preservação das plantações no Brasil (EMBRAPA, 1999).

Figura 1. Produção Mundial de Cacau em Grão (dados CEPLAC, 2003).

Figura 2. Cacaueiro saudável encontrado na Bahia. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo.

Figura 3. Galho de cacaueiro com ramificações excessivas (vassoura-de-bruxa), encontrado na Bahia. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo.

Figura 4. Exemplos de sintomas de vassoura-de-bruxa encontrados em Manaus/AM. Fotos superiores mostram plantas de cupuaçu. Fotos inferiores mostram cacaueiros. Arquivo pessoal de Dr. Itamar Soares de Melo.

3.2. Controle biológico na cultura do cacau

3.2.1. O fungo *Trichoderma*

Com a recente preocupação dos ambientalistas e das autoridades governamentais com a poluição e, especificamente, com a utilização indiscriminada de fungicidas potencialmente tóxicos, alguns estudiosos procuraram medidas alternativas de controle de doenças de plantas. Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o fungo *Trichoderma* sp. tem sido um dos mais estudados, dadas suas características peculiares de antagonismos em condições naturais, principalmente no solo. É um fungo naturalmente presente no solo, e como tal tem sido estudado no sentido de aumentar a densidade de inóculo com a utilização de práticas agrícolas, ou simplesmente pela introdução massal direta no solo (MELO, 1991).

SARHY-BAGNON et al. (1997) estudaram a produção de 6-pentil- α -pirona (6-PP), um aromatizante de coco, utilizando *Trichoderma harzianum* (IMI 206040) em meio sólido, e bagaço de cana-de-açúcar e coco dessecado como substrato.

AGOSIN et al. (1997) compararam a produção de *Trichoderma harzianum* P1 (ATCC 74058) em Fermentação em Substrato Sólido (FSS) e em Fermentação em Substrato Líquido (FSL). Para a produção em FSS, utilizaram um substrato baseado em farelo de trigo. Os resultados mostraram que a FSS apresenta melhores resultados em produtividade (8,1 contra 6,3 log esporos/mL/h), e que o produto obtido apresenta maiores resistência a raios ultravioleta e longevidade (determinada a partir de estocagem de 45 dias a 25° C e 75% de umidade relativa). Sabendo que o produto obtido do crescimento de *T. harzianum* P1 tem grande aplicabilidade e eficiência no controle de vários fungos fitopatogênicos, os autores concluem que o produto da FSS é melhor do que o da FSL por ser mais durável e hidrofóbico, evitando a necessidade de formulações sofisticadas para aplicação no campo.

ICONOMOU et al. (1997) utilizaram *Trichoderma reesei* (NRRL 6156, Syn. Q.M 9414) para o enriquecimento protéico de polpa de beterraba, um subproduto agrícola, para utilização como ração animal. Este fungo foi escolhido por sua característica de alta produtividade protéica e capacidade de degradação de hemicelulose e celulose. A polpa de beterraba fermentada apresentou aumento de concentração protéica da ordem de 70% (de 13,3% para 22,5%).

Trichoderma harzianum foi estudado por HADAR et al. (1979) como um antagonista ao fungo *Rhizoctonia solani*, que causa a redução na produção de berinjela, feijão e tomate. Não foram encontradas atividades antibióticas de *T. harzianum* em relação ao patógeno. Quando cresce em meio mineral contendo laminarina ou quitina como fontes de carbono, *T. harzianum* produz as enzimas β -(1-3) glucanase e quitinase. Em estufa, *T. harzianum*, aplicado na forma de cultura de farelo de trigo em solo infectado por *R. solani*, aumentou o rendimento em plantas novas de berinjela, feijão e tomate.

LYNCH (1987) identificou *in vitro* *Trichoderma harzianum* como um potencial antagonista de fitopatógenos, como *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phomopsis* sp., *Pyrenochaeta lycopersici* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Descobriu-se que *T. harzianum* cresce mais rapidamente do que todos estes patógenos em placas com ágar inoculadas com ambos os microrganismos.

SIVAN et al. (1987) mostraram que *Trichoderma harzianum* é um potencial agente de biocontrole para a podridão do tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. O rendimento de tomates nos ensaios tratados com *T. harzianum* foi 26,2% superior ao rendimento dos ensaios controle. Quando *T. harzianum* foi aplicado na zona radicular dos transplantados de tomate, este fungo se proliferou com sucesso pela rizosfera.

MARTINS (1988) estudou o potencial antagônico de espécies de *Trichoderma* contra *Verticillium dahliae*, doença que afeta a berinjela, conhecida como murcha verticilar. Várias linhagens mostraram-se eficientes como antagonistas, utilizando como mecanismos de parasitismo a lise e o enrolamento de hifas, o crescimento paralelo de hifas parasitas e hospedeiras, a formação de ganchos e de rede de hifas. Ainda se descobriu que a temperatura ótima para crescimento e produção de antibióticos de *T. koningii* e *T. viride* é de 28°C, sendo o pH preferencialmente mais ácido, principalmente para a produção de metabólitos. Os agentes de biocontrole podem sobreviver no solo durante todo o ciclo da cultura de berinjela, e controlar ou reduzir a incidência da murcha verticilar.

BENHAMOU e CHET (1997) estudaram a interação entre *T. harzianum* e *Pythium ultimum*, um patógeno que causa a podridão de raízes de diversas culturas de plantas. O contato entre antagonista e patógeno foi acompanhado por um depósito anormal de material rico em celulose em locais de potencial penetração do antagonista, que mostrou capacidade em penetrar esta barreira, indicando que enzimas celulolíticas eram produzidas. Entretanto, a presença de celulose nas paredes de hifas de *Pythium* severamente danificadas mostrou que a presença de enzimas celulolíticas não era a única característica envolvendo o processo de antagonismo. A marcante alteração no componente β -(1-3)-glucano da parede

celular do fungo *Pythium* sugeriu que as β -(1-3)-glucanases exerciam um papel importante no processo.

ARÉVALO e CERNA (1996) coletaram amostras de áreas de Tlumayo, Afiliador, Naranjillo e Tingo Maria, no Peru, em plantações de cacau com alta incidência de vassoura-de-bruxa. O parasita causador da doença foi isolado e identificado como *Crinipellis perniciosa*. Foram obtidos vinte e oito isolados, dos quais quatorze foram selecionados. Foram encontrados efeitos antagonistas *in vitro* em todos os fungos por eles testados, dentre os quais os mais efetivos foram *Botrodiploia theobromae*, *Trichoderma* sp., *Cladobotryum amazonense*, *Fusarium* sp. e *Aspergillus clavatus*.

3.2.2. A espécie *Trichoderma stromaticum*

Muitos fungos utilizados em biocontrole são do gênero *Trichoderma*. O fungo que parasita a vassoura-de-bruxa foi anteriormente identificado como *T. viride*, mas por diferir deste em aparência e características do DNA, foi renomeado para *T. stromaticum*. As várias espécies de *Trichoderma* são o fungo mais utilizado em formulações comerciais como fungicidas no mundo (BECKER, 1999b). SAMUELS et al. (1999) estudaram o fungo *Trichoderma stromaticum* sp. nov., descrevendo-o através de suas características morfológicas e moleculares.

O fungo *Trichoderma* spp. linhagem TVC, isolado originalmente no Pará, parasitando basidiocarpos do fungo *Crinipellis perniciosa* (agente da vassoura-de-bruxa), tem sido empregado com sucesso como fungicida, na forma de suspensões aquosas, no controle da doença em cacaueiro no Norte e Nordeste do Brasil (EMBRAPA, 1999). As Figuras de 5 a 10 mostram as características visuais desta linhagem de *Trichoderma*, obtidas através de eletromicrografia de varredura.

O Brasil é conhecido por suas pesquisas em controle microbiano de pragas. Embora a maioria dessas pesquisas esteja direcionada ao controle de insetos, já existem várias para

o controle de fitopatógenos e ervas daninhas. Para todas elas, entretanto, têm sido observados poucos estudos de engenharia para o desenvolvimento de processos fermentativos que permitam transformá-las em produtos tecnológicos. Há carência de biopesticidas no mercado nacional, que precisa ser suprida rapidamente para que produtos agrícolas "saudáveis" cheguem ao consumidor. Entre as soluções para suprir esta deficiência, o ensino e pesquisa da engenharia precisam, rapidamente, ser reforçados para que seus profissionais atendam a esta demanda do mercado (MORAES e SANTANA, 2001).

Figura 5. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostradas estromas do fungo, com aumento de 100 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

Figura 6. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostradas pústulas do fungo (formação esférica mais escura), com aumento de 200 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

Figura 7. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostrados tecidos parenquimatosos do fungo, com aumento de 1000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

Figura 8. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostrados conidióforos e conídios do fungo, com aumento de 1400 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

Figura 9. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostrados conídios do fungo, com aumento de 2000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

Figura 10. Eletromicrografia de varredura de *Trichoderma stromaticum*, crescendo em meio BDA, onde são mostrados conídios do fungo, com aumento de 20000 vezes (Imagem cedida pela Embrapa Meio Ambiente).

3.3. Processo Fermentativo

3.3.1. Fermentação em Substrato Sólido (FSS)

A FSS é também conhecida como “fermentação em estado sólido”, “fermentação em meio semi-sólido”, “fermentação semi-sólida”, “fermentação sólida”, “fermentação koji”, “cultivo em estado sólido” e “cultivo em substrato sólido”.

A FSS é definida por VINIEGRA-GONZÁLEZ (1997) como o processo microbiano que ocorre principalmente na superfície de materiais sólidos, biodegradáveis ou não, que têm como propriedade a capacidade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis.

DEL BIANCHI et al. (2001) definem FSS como sendo o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida.

São exemplos típicos de processos de FSS o “Koji” japonês, produzido através do arroz com o uso do fungo *Aspergillus oryzae*; o “Tempeh” da Indonésia ou o “Ragi” da Índia, produzidos a partir de sementes de leguminosas quebradas, inoculadas por uma variedade de fungos não-tóxicos; o queijo azul francês, que usa queijo fresco como substrato e fungos como o *Penicillium roquefortii* como inóculo; e a compostagem de fibras lignocelulósicas, que são naturalmente infestadas por uma grande variedade de bactérias celulolíticas, fungos e *Streptomyces* sp. (RAIMBAULT, 1997).

3.3.2. Aplicações da FSS

A FSS é aplicada na indústria de fermentação para a produção de alimentos fermentados (“Koji”, “Tempeh”, “Ragi”, “Attieke”, queijos), aditivos de alimentos (flavorizantes, corantes, óleos essenciais), enzimas (amilases, celulasas, proteases, pectinases, xilanases), fármacos (penicilina, probióticos), ácidos orgânicos (cítrico, fumárico, gálico, láctico) e metabólitos fúngicos (hormônios, alcalóides).

MITCHELL e LONSANE (1992) separam as aplicações para FSS entre “geradoras de lucro” e “sócio-econômicas” e consideram a aplicação sócio-econômica como a mais importante. Exemplos de aplicação voltada para esta área seriam a compostagem de lixo urbano e o enriquecimento protéico de alimentos. A produção de agentes de controle biológico também se incluiria nesta aplicação, pois seu mercado principal seria o setor primário da economia, que é a base econômica dos países em desenvolvimento. As aplicações geradoras de lucro são mais desenvolvidas no Japão, não apenas por seu alto

grau de desenvolvimento industrial mas também por sua experiência significativa em FSS de larga escala, na indústria de "koji".

Para a obtenção de biopesticidas para controle biológico, atualmente, a indústria de fermentação utiliza processos de FSS para a produção de *Beauveria*, *Metarhizium* e *Trichoderma* (RAIMBAULT, 1997).

3.3.3. Vantagens e desvantagens da FSS

Em relação à Fermentação em Substrato Líquido (FSL – processo em que o microrganismo se desenvolve na fase líquida, contendo nutrientes solúveis), a FSS possui vantagens principalmente para o uso de fungos filamentosos como agente da fermentação. Estas vantagens são descritas a seguir (ARRUDA, 1999; MITCHELL et al., 1992; RAIMBAULT, 1997).

Nos processos de FSS, há a possibilidade do uso de substratos insolúveis poliméricos, comumente resíduos agro-industriais que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Exemplos comuns são os grãos de cereais, farelos, bagaços e outros. São produtos de baixo valor para a indústria, ou até de valor negativo, já que necessitam de tratamento para seu descarte no ambiente. A riqueza e a variedade de nutrientes presentes nestes substratos significa que menos pré-tratamento será necessário, em comparação com a FSL. Este pré-tratamento pode ser apenas o cozimento com água para umidificar o substrato, quebrar sua superfície para aumentar a acessibilidade aos nutrientes internos, ou moer substratos para obter pequenas partículas, aumentando a área disponível ao microrganismo.

As condições de assepsia podem ser mais amenas, utilizando-se, por exemplo, tratamento por vapor ou microondas. A restrita disponibilidade de água ajuda a eliminar seletivamente contaminantes indesejáveis, especialmente bactérias e leveduras, que não se adaptam facilmente a condições de menores atividades de água. Isto faz com que a FSS seja

mais prática e adaptável a situações com baixa tecnologia e onde a mão-de-obra não é altamente especializada, refletindo em menores custos de processo. Ainda, produtos podem ter diferentes – e desejáveis – propriedades quando obtidos a partir de processo em sólido ou em submerso.

A natureza do substrato, concentrado, significa que menores reatores podem ser utilizados. A produtividade volumétrica pode ser maior em FSS comparada com FSL, mesmo em casos com menores taxas de crescimento microbiano.

Há grande superfície de transferência de massa, facilitando a aeração forçada – menores pressões (energia) são necessárias – e a transferência de ar fresco aos filmes de líquido presentes na superfície do substrato.

A possibilidade de inoculação através de esporos, no caso do cultivo de fungos, evita a necessidade de grandes tanques para a produção de inóculo, embora apresente a desvantagem de ter maior tempo de fase lag devido à necessidade de germinar.

A obtenção do produto final, extração e purificação (*downstream*) são mais fáceis e a quantidade de efluentes é minimizada. Há ainda o caso onde se pode usar todo o produto, como no enriquecimento protéico ou pesticida biológico, com a conseqüente ausência de rejeitos. Se necessária a secagem, muito menos água deve ser retirada em relação à FSL, do mesmo modo que menos solvente é necessário em casos de produtos obtidos através de extração.

As desvantagens dos processos de FSS em relação aos de FSL devem-se principalmente a: dificuldades na homogeneização do meio e na difusão de substratos e produtos em relação à biomassa; baixa capacidade de transferência de calor, o que causa a ocorrência de gradientes de temperatura em reatores estáticos; necessidade de inoculação por esporos; e processos descontínuos. Além disso, o escalonamento de plantas de FSS ainda é pouco desenvolvido no Ocidente, enquanto equipamentos industriais de FSL já são disponíveis (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997; RAIMBAULT, 1997; MORAES, 1999).

3.3.4. Reatores para FSS

Há três tipos básicos de reatores para FSS: os de bandeja, os agitados e os de leito empacotado.

Os reatores de bandeja são caracterizados por sua simplicidade. O substrato é disposto sobre bandejas de madeira ou aço-inox, normalmente perfuradas a fim de se facilitar a convecção de ar. Além das bandejas, são utilizadas bolsas plásticas microporosas para o acondicionamento do substrato a fermentar. Neste tipo de reator, não há aeração forçada nem agitação mecânica. Por esse motivo, para evitar o aquecimento metabólico do meio e para manter condições aeróbias, apenas camadas finas de sólidos podem ser usadas.

Entre os reatores agitados, incluem-se os rotativos, tradicionalmente em forma de tambor, podendo ou não conter chicanas em seu interior. Existem também os reatores estáticos, em que outros sistemas de agitação asseguram a mistura do meio sólido, como, por exemplo, um tacho de bater massa de panificação adaptado e um vaso cilíndrico horizontal com uma rosca sem-fim interna. A agitação pode ser contínua ou esporádica e a mistura do meio é associada a problemas de cisalhamento e danificação da estrutura de alguns microrganismos ou do próprio meio. O controle de temperatura é difícil.

Os reatores do último tipo incluem os de leito empacotado e aeração forçada através da camada de substrato. Muitas variações de projeto são possíveis. Para uso em laboratório, esses reatores são tipicamente colunas cilíndricas feitas de vidro ou plástico. O controle da temperatura é feito por um banho térmico ou utilizando-se colunas encamisadas com circulação de líquido refrigerante. A própria aeração forçada permite o controle da temperatura ao forçar a evaporação da água constituinte do substrato (DURAND et al., 1997).

Outra classificação, mais discriminatória, sobre os reatores utilizados na FSS é proposta por DEL BIANCHI et al. (2001):

- reatores de vidro: utilizados em nível de laboratório, são muito importantes devido à relativa facilidade nos estudos deste tipo de processo. Os mais conhecidos e utilizados são os frascos Erlenmeyer, frascos de Fernbach e garrafas de cultura.
- bandejas: construídas dos mais diversos materiais, como madeira, bambu, alumínio e outros. Podem possuir fundo intacto ou perfurado.
- tanques circulares: vertical, rotativo, com agitador helicoidal fixo.
- esteira rolante: uma variante do fermentador de bandejas. O substrato é incubado em longas esteiras de fundo perfurado com circulação de ar úmido.
- tubular horizontal: também denominado tambor rotativo, com o substrato incubado em seu interior. O rolamento pode ser causado tanto por um eixo central como por roletes sobre os quais o reator se apoia.
- tubular vertical: também denominado reator de coluna, muito utilizado em pesquisas em que se necessita melhor controle do processo. Tem controle de temperatura por aeração forçada através do leito empacotado. Há também estudo sobre a utilização de um sistema de leito fluidizado gás-sólido em colunas.
- sacos plásticos: feitos normalmente de polietileno autoclavável; além de reator podem servir como embalagem em produtos cujo processo final seja apenas a secagem.

3.3.5. Microrganismos usados em FSS

Bactérias, leveduras e fungos podem crescer sob condições de fermentação sólida. As bactérias são principalmente utilizadas em compostagem, silagem e processos alimentícios. Leveduras são usadas para a produção alcoólica, de alimentos ou de ração. Os fungos filamentosos, porém, constituem o grupo de microrganismos mais importante usado em processos de FSS devido a características fisiológicas e bioquímicas que lhes permitem crescer sob baixos níveis de atividade de água (MORAES, 1999).

3.3.6. Substratos para FSS

Os substratos para FSS geralmente são compostos ou produtos heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Suas estruturas macromoleculares básicas (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras) conferem as propriedades de sólido aos substratos. O substrato pode consistir de várias macromoléculas, o que é o caso de subprodutos agro-industriais. A macromolécula estrutural pode simplesmente fornecer uma matriz inerte onde o carbono e as fontes de energia (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos) são absorvidos (bagaço de cana, fibras inertes, resinas). Na maioria dos casos, porém, a matriz macromolecular representa o substrato, fornecendo também o carbono e a fonte de energia (por exemplo, a celulose), e neste caso a estrutura do substrato sólido pode se degenerar durante o processo (MITCHELL et al., 1992b; RAIMBAULT, 1997).

Os resíduos agro-industriais, obviamente dependendo do valor do produto que se deseja obter, têm tido a preferência nas pesquisas, devido ao baixo ou nenhum valor comercial. O substrato deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo. A principal peculiaridade desejável é o alto grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio, sendo importantes, portanto, a porosidade, o tamanho e o formato das partículas. Em relação ao tamanho da partícula, há o problema de que, se por um lado, quanto menor o tamanho maior a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação, por outro lado o processo necessita ter uma granulometria adequada que permita a circulação do ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos (DEL BIANCHI et al., 2001). MORAES e SANTANA (2001), por exemplo, usaram farelo de trigo, um produto agro-industrial de baixo custo, comercializado normalmente para ração animal, para a produção da enzima β -galactosidase em reatores de colunas utilizando uma linhagem do fungo *Scopulariopsis* sp.

Os materiais agrícolas que, por suas características naturais, são suscetíveis de emprego como substrato para a FSS, podem ser classificados em duas categorias:

- celulósicos: polpa de café, bagaços, palhas, cascas, cascas de frutas processadas, etc.
- amiláceos: batata, milho, mandioca, banana e seus resíduos, entre outros.

No caso de produtos celulósicos, o conteúdo de celulose não se encontra facilmente disponível para ser utilizado na fermentação e para isso necessita de tratamentos prévios. Isto geralmente causa um aumento no custo do processo. Os materiais amiláceos necessitam também de pré-tratamentos, menos drásticos, mas também complicados.

Os materiais agroindustriais apresentam as seguintes características comuns:

- são recursos naturais renováveis.
- sua produção depende de outra atividade produtiva (geralmente são subprodutos de disponibilidade concentrada geograficamente).
- são produzidos em grande quantidade e constituem um problema sanitário e ecológico em sua região.
- necessitam de um prévio tratamento físico ou químico para a FSS, que lhes dêem novas características físicas que facilitem seu processamento e industrialização (ARRUDA et al., 2001).

3.3.7. Parâmetros importantes em processos de FSS

Fatores ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio, concentrações de nutrientes e de produtos, afetam significativamente o crescimento microbiano e a formação do produto (MORAES, 1999).

3.3.7.1. Temperatura

A taxa de crescimento microbiano é uma função da temperatura. Os microrganismos geralmente crescem em temperaturas na faixa de 25 a 30° C. Existem no meio ambiente, porém, microrganismos capazes de crescer a temperaturas abaixo de 0° C e acima de 93° C, tendo a necessidade fundamental da presença de água em estado líquido. Apesar das diferenças que os microrganismos apresentam em relação à temperatura em que crescem, estes apresentam características comuns, como crescerem apenas dentro de um intervalo de no máximo 30° C e terem suas taxas de crescimento aumentadas lentamente até atingir a taxa de crescimento máxima e, a partir de então, estas serem diminuídas rapidamente (COONEY, 1981).

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da espessura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos e a formação do produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada (DEL BIANCHI et al., 2001).

3.3.7.2. pH

O pH é a medida da atividade do íon hidrogênio (H^+), e é particularmente importante como um parâmetro para o crescimento microbiano. A maioria dos microrganismos cresce dentro de um intervalo de 3 a 4 unidades de pH. As bactérias geralmente têm um pH ótimo entre 6,5 e 7,5. Abaixo de 5,0 e acima de 8,5, elas não se desenvolvem bem. As leveduras, por outro lado, preferem valores de pH entre 4,0 e 5,0, crescendo bem dentro de um intervalo de pH entre 2,5 e 8,5. Já os fungos apresentam pH ótimo entre 5,0 e 7,0, mas, como as leveduras, também apresentam um grande intervalo de crescimento, entre 3,0 e 8,5. A possibilidade de se desenvolver culturas de leveduras ou

fungos a baixos níveis de pH representa uma boa ferramenta para a prevenção de contaminação bacteriológica (COONEY, 1981).

O controle do pH durante a fermentação em estado sólido, embora este seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Para amenizar o efeito de uma variação brusca de potencial hidrogeniônico, utilizam-se, preferencialmente, substratos com boa capacidade tamponante, ou adiciona-se uma solução tampão durante a etapa de umidificação (DEL BIANCHI et al., 2001).

A variação do pH em uma cultura ocorre normalmente como resposta às atividades metabólicas dos microrganismos. A principal razão para essa variação é a secreção de ácidos orgânicos como os ácidos cítrico, acético e lático, o que causa uma diminuição nos níveis de pH, assim como o consumo de sais de amônia. Por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos, que podem estar presentes em certos meios de cultura, bem como a hidrólise de uréia, resultam em uma alcalinização do ambiente. As mudanças de pH também dependem bastante do microrganismo presente. No caso do fungo *Trichoderma* sp., o pH apresenta razoável estabilidade entre os valores de 4,0 e 5,0. A natureza do substrato também influencia a cinética do pH, devido ao efeito tamponante causado por materiais lignocelulósicos (RAIMBAULT, 1997).

O pH de um meio sólido era determinado indiretamente através da medida do pH de um extrato do meio fermentado, permitindo apenas estimativas e comparações. O advento do potenciômetro que mede diretamente do meio sólido facilitou em muito o controle ou, pelo menos, o acompanhamento deste importante parâmetro (PELIZER, 2000).

3.3.7.3. Atividade de água (a_w)

A a_w é o parâmetro que melhor expressa a quantidade de água disponível para o microrganismo crescer em um sólido, sendo definida como a relação entre a pressão parcial

de vapor da água no substrato e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura e pressão (PELIZER et al., 1998).

A redução da a_w tem grande efeito no crescimento microbiano, sendo as bactérias muito mais sensíveis à diminuição dos níveis de a_w do que os fungos (COONEY, 1981). Sendo a FSS mais utilizada em processos com fungos, o controle da a_w mostra-se bastante importante tecnologicamente para a prevenção de contaminações bacteriológicas. As bactérias só crescem com a_w acima de 0,95, enquanto os fungos são capazes de crescer em ambientes com a_w de até 0,7, em seu limite inferior (MORAES, 1999).

3.3.7.4. Nível de oxigênio

O nível de oxigênio no ambiente é um parâmetro de grande importância em sistemas de FSS. A transferência de oxigênio da fração intersticial do substrato sólido para o microrganismo é a transferência de massa entre-partículas. O volume ocupado pelo ar dentro do substrato dá a fração de vazio, que depende das características e da umidade do substrato. A umidade do substrato deve ser otimizada. Se for muito alta, a fração de vazio é ocupada pela água, impedindo a presença de oxigênio e criando condições anaeróbias. Por outro lado, se a umidade é muito baixa, o crescimento microbiano é reduzido. Agitação e aeração são bons métodos para se aumentar a transferência de oxigênio entre-partículas e retirar o dióxido de carbono produzido no processo fermentativo (RAMANA MURTHY et al., 1993).

3.4. Determinação de biomassa

Um dos maiores problemas no desenvolvimento de estudos em FSS é a dificuldade em se estimar a biomassa formada no sistema de produção.

A biomassa é um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano. A determinação direta da biomassa em FSS é bastante difícil devido a problemas na separação do microrganismo do substrato sólido, especialmente quando o processo envolve fungos filamentosos, devido à penetração das hifas no substrato, e à fixação do micélio à parede do sólido.

Os métodos ideais para a estimativa de biomassa em FSS devem ter as seguintes propriedades:

- os resultados devem ser obtidos rapidamente, a fim de permitir a tomada de decisões apropriadas à continuidade do processo;
- deve ser barato, levando-se em conta que as margens de lucro em processos de FSS são pequenas;
- deve ser de simples procedimento para se possibilitar o emprego de trabalhadores não especializados e permitir a análise de um maior número de amostras;
- deve ser reprodutível, preciso e não suscetível a interferências por componentes do substrato.

Métodos empregados para estimativa de biomassa em FSS pertencem a uma de quatro categorias:

- separação direta da biomassa da matriz sólida;
- monitoramento das atividades metabólicas;
- medição de componentes específicos da biomassa;
- observação de outro fenômeno associado ao crescimento (MITCHELL, 1992).

Uma atividade metabólica que pode ser associada ao crescimento microbiano é a produção de enzimas extracelulares. O fungo *Trichoderma* sp. é conhecido por produzir quitinase. As propriedades das quitinases e seu envolvimento nos processos de controle biológico têm despertado grande interesse. Assim como ocorre no sistema celulolítico, os

sistemas quitinolíticos mais estudados são justamente aqueles produzidos por fungos do gênero *Trichoderma*.

A quitinase (nome sistemático: poli[1,4- β -2 acetamido-2 desoxi-D-glucosídio]-glicano hidrolase – EC 3.2.1.14) hidrolisa a quitina em N-acetil-D-glucosamina. A quitina é o principal componente do exoesqueleto dos invertebrados que vivem no mar (lagostas, caranguejos e outros crustáceos), dos insetos e da parede celular de fungos e de algumas algas, sendo um dos aminopolissacarídeos mais abundantes da natureza. É um biopolímero linear e insolúvel em água, consistindo em moléculas formadas por cadeias de N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (LIMA et al., 2000).

Na natureza, a biodegradação dos substratos sólidos como os quitino-protéicos se realiza geralmente por um conjunto de microrganismos. Por sua insolubilidade, tamanho, complexidade molecular e composição heterogênea, estes substratos não são degradados dentro da célula, tendo os microrganismos que recorrer à secreção de enzimas de diferentes especificidades, para transformá-los ou hidrolisá-los ao seu redor. Os compostos solúveis resultantes podem então ser incorporados pelas células e servir, de acordo com sua composição, como fontes de nitrogênio, carbono e energia. A degradação de um polímero como a quitina requer ao menos dois tipos de enzimas hidrolíticas. Uma rompe aleatoriamente as ligações da porção interna, produzindo oligômeros de diversos tamanhos, os quais são posteriormente hidrolisados em monossacarídeos livres por oligossacaridasas específicas. O esquema se complica porque pode haver um terceiro tipo de hidrolases que atacam o polímero por um de seus extremos, normalmente o não redutor, separando uma a uma moléculas de um mono ou dissacarídeo. Constituem-se assim complexos multienzimáticos onde, para cada uma das atividades, podem ser encontradas diversas isoenzimas. Todo o conjunto, porém, funciona de maneira harmônica e sinérgica. As quitinases são enzimas amplamente distribuídas em microrganismos, animais e plantas. Certamente os microrganismos são responsáveis pela maior proporção, geralmente como exoenzimas indutíveis. Entre os melhores produtores têm-se *Serratia marcescens*, *S. liquefasciens*, *Vibrio vulnificus*, *Streptomyces* sp., *Trichoderma harzianum* e *Myrothecium verrucaria* (CAMARILLO e AVELIZAPA, 1999).

Outra estimativa que pode ser feita da biomassa do sistema é a partir do método da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) para dimetilsulfeto (DMS). A redução de DMSO é catalisada por vários tipos de microrganismos. De 144 linhagens de fungos e bactérias estudadas e testadas, somente 5 linhagens (*Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas indigofera*, *P. saccharophila*, *Penicillium nalgiovensis* e *P. roquefortii*) se mostraram incapazes de reduzir DMSO em DMS. Esta técnica tem se mostrado particularmente sensível e boa indicadora da atividade microbiológica e, conseqüentemente, da biomassa. Através de técnica cromatográfica, o DMS é detectado rápida e quantitativamente, mesmo em baixas concentrações. A reação baseia-se na seguinte equação:

Por ser o DMS insolúvel em água (e solúvel em solventes orgânicos), ele se dilui na fase gasosa (headspace), podendo, desta forma, ser analisado quantitativamente através de cromatografia gasosa (LAVORENTI et al., 2000).

3.5. Espectrometria de Massas

A base onde foram fundamentados os alicerces para essa técnica se fixar e crescer foi o descobrimento dos íons positivos por GOLDSTEIN (1886). Esta descoberta foi de grande valia, pois as moléculas dentro de espectrômetros de massas (fase gasosa) são manipuladas na forma de íons. A principal razão que levou os primeiros cientistas a trabalhar com íons positivos se deve à facilidade de geração dos mesmos. As fontes de geração de íons positivos são mais fáceis de serem construídas, pois geram elétrons de alta energia, que colidem com a nuvem eletrônica das moléculas (1 em 1000) e retira outro elétron deixando a mesma positiva (equação 1). No caso de geração de ânions no estado gasoso, o processo deve ocorrer com elétrons de baixa energia (0 a 5 eV), que vão colidir com as moléculas e ficar confinados (equação 2).

O espectrômetro de massas com ionização por Impacto de Elétrons (EI), cujo esquema básico é representado na Figura 11, possui, basicamente, os seguintes componentes:

- Fonte de elétrons: emite um feixe de elétrons que bombardeiam os compostos inseridos na fonte produzindo íons positivos/radicalares;
- Analisador de massas (Quadrupolo): separa os íons de acordo com suas massas específicas;
- Detector (Multiplicador de Elétrons): detecta os íons provenientes do analisador e mede suas massas;
- Computador: realiza o processamento dos dados obtidos a partir do detector.

Figura 11. Esquema básico do espectrômetro de massas monoquadrupolar e seus componentes.

MENDES et al (1996a) utilizaram a técnica de espectrometria de massas (MIMS) para detectar a presença de compostos orgânicos voláteis em águas de rio, mostrando que a técnica oferece grande linearidade, reprodutibilidade, baixos limites de detecção (1 a 10 partes por bilhão) e versatilidade no monitoramento destes compostos em água.

Posteriormente, MENDES et al (1996b) fizeram aperfeiçoamentos na técnica e nos equipamentos e puderam detectar compostos orgânicos voláteis em água aos níveis de 10 a 20 partes por trilhão.

HADDAD et al (2001) mostraram que técnicas de espectrometria de massas poderiam ser utilizadas para a quantificação de aminoácidos (homocisteína), diretamente em sangue e urina, sendo este um marcador para a prevenção de doenças cardiovasculares.

3.6. Otimização dos parâmetros para produção em FSS

O Planejamento de Experimentos é uma ferramenta muito útil para a investigação de processos de FSS. São processos, na maioria das vezes, bastante dispendiosos tanto em relação a tempo quanto a dinheiro. Um processo fermentativo envolve muitas variáveis de relevância, e seu estudo depende de muita organização a fim de que não se chegue a um ponto onde se tem uma infinidade de dados e pouca ou nenhuma conclusão sobre o que estes significam.

Não é incomum se trabalhar bastante tempo sobre um parâmetro do processo que, ao final das contas, revela-se pouco significativo. O Planejamento Fatorial Fracionado permite que se descubra o quão significativo é o efeito provocado por diversas variáveis, necessitando-se de poucos experimentos (BARROS NETO et al., 1996).

Ao se estudar a influência de um parâmetro operacional por vez, muito tempo é despendido e está-se perdendo a possibilidade de visualizar o efeito de interação entre dois ou mais parâmetros. Umidade e temperatura de processo, por exemplo, apresentam clara

possibilidade de interagir. Em um reator sem controle de umidade, esta deverá ser sempre maior conforme maior seja a temperatura empregada, já que haverá mais perda de água por evaporação. Ao se estudar apenas a melhor temperatura para o processo, com um valor de umidade fixo, e vice-versa, nunca se poderá dizer que tal processo foi otimizado. O que se poderá dizer apenas é que tal temperatura é a melhor para determinado valor de umidade. O Planejamento Fatorial Completo permite descobrir os valores ótimos para vários parâmetros, levando-se em consideração a possibilidade de interação entre eles. Além disso, gera representações gráficas que facilitam a visualização do processo, bem como base estatística para a discussão sobre os resultados obtidos (MORAES, 2001).

3.6.1. Planejamento de experimentos

Planejamentos de experimentos, com base em princípios estatísticos que permitam extrair de um sistema o máximo de informação útil, fazendo-se um número mínimo de experimentos, são essencialmente importantes em sistemas trabalhosos e longos como os processos de FSS. Para a triagem das variáveis importantes do processo, usa-se o Planejamento Fatorial Fracionário. Descartadas as variáveis menos significativas, passa-se ao uso de um Planejamento Fatorial Completo, que permite avaliar quantitativamente a influência de cada variável sobre a resposta de interesse, bem como determinar as possíveis interações entre estas variáveis.

3.6.2. Otimização

A otimização das variáveis tem como objetivo maximizar a resposta a ser obtida pelo sistema. Para tanto, utilizam-se dos resultados obtidos através do Planejamento Fatorial Completo para se empregar a técnica da Metodologia de Superfícies de Resposta que se baseia, por sua vez, na Modelagem por Mínimos Quadrados.

3.6.3. Modelagem de misturas

Alguns aspectos que influenciam um sistema de FSS não podem ser caracterizados apenas por suas quantidades totais (temperatura, umidade, pH, por exemplo). No caso da composição do substrato a ser utilizado, para sua otimização é necessário que se estude a proporção entre os nutrientes naturalmente presentes e os que serão adicionados. Para o estudo da proporção que determinará qual o substrato ótimo a ser utilizado, utiliza-se da técnica de Modelagem de Misturas (BARROS NETO et al., 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo escolhido para esse trabalho foi uma linhagem do fungo *Trichoderma stromaticum* (TVC), que vem sendo utilizada no controle biológico de *Crinipellis pernicioso* em cacaueiro nos Estados da Bahia e do Pará.

O fungo foi mantido em discos de meio ágar nutriente e aveia (1,6% de ágar nutriente e 4,0% de aveia, em massa, em água destilada), imersos em água destilada esterilizada (5 mL de água para 5 discos de 7 mm de diâmetro por frasco), no interior de frascos do tipo “penicilina” com tampa de silicone e vedante de alumínio, à temperatura ambiente (Figura 12). Este tipo de manutenção impede a possível mutação do microrganismo provocada pelo método de repicagens sucessivas normalmente utilizado (Figueiredo, 1967).

Este método de manutenção manteve *T. stromaticum* sem perda de viabilidade por um período de dois anos.

Figura 12. Frasco de manutenção do microrganismo.

4.2. Meios de cultura

Trichoderma stromaticum é capaz de crescer em variados meios de cultura. O meio de cultura básico estudado neste trabalho foi o farelo de trigo, produto encontrado em casas agropecuárias para uso como ração animal, ao custo aproximado de R\$ 0,20 o quilograma. O farelo utilizado foi produzido pela Cerealfoods Com. Ind. Ltda, e apresentou os níveis de garantia apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Níveis de garantia do farelo de trigo.

	divulgado	observado
Umidade (máx)	13,50%	17,3%
Proteína bruta (mín)	14,00%	6,4%
Extrato etéreo (mín)	3,00%	não medido
Fibra bruta (máx)	11,00%	11,8%
Matéria mineral (máx)	6,50%	6,7%
Aflatoxina (máx)	50 ppb	não medido

Como indutor para a produção de esporos, utilizou-se aveia em flocos finos distribuída pelo Carrefour, produzida por L. Ferenczi S. A. Ind. e Com, apresentando os níveis nutricionais mostrados no Quadro 2 (em média):

Quadro 2. Níveis nutricionais da aveia.

Proteínas	12%
Glicídios	60%
Lipídios	10%
Fibra alimentar	10%
Cálcio	0,03%
Fósforo	0,13%
Ferro	0,002%
Sódio	0,001%
Niacina	0,001%

Como indutor da produção de quitinase foi usada quitina, na proporção de 0,1% em peso de substrato úmido, produzida pela Sigma (C-9213, "Practical Grade From Crab Shells").

4.3. Biorreator

Um dos reatores utilizados foi bolsa esterilizada de polipropileno de 38 x 33 cm com bocal hermético de 3 cm de diâmetro, com 3 L de volume, produzido pela Embaquim Com. Ind. Ltda.

O tratamento térmico do sistema reator/substrato foi feito em forno de microondas conforme descrito por ARRUDA (1999).

O processo fermentativo foi realizado no interior de câmaras tipo DBO (para testes de Demanda Bioquímica de Oxigênio), com controle de temperatura e fotoperíodo.

Também se estudou a produção de *T. stromaticum* em reatores de bandeja. Consistiu de bandejas de alumínio com dimensões de 17×8×6 cm (c×l×h, respectivamente), cobertas com papel celofane, esterilizadas já com o substrato umedecido, em autoclave a 121°C por 20 minutos, e incubadas em câmaras tipo DBO, com controle de temperatura e fotoperíodo.

4.4. Determinação de atividade de água

Devido à indisponibilidade de equipamento próprio para a determinação de atividade de água (a_w) nos laboratórios onde este trabalho foi realizado, os experimentos foram preparados utilizando-se como parâmetro a umidade.

A umidade em base úmida (U_{bu}) foi determinada colocando-se amostras do substrato em estufa a 105° C até atingirem peso constante, medido em balança analítica após resfriamento das amostras no interior de um dessecador.

O cálculo para U_{bu} é dado por:

$$U_{bu} = \frac{M_1 - M_2}{M_1}$$

onde M_1 = massa da amostra úmida e M_2 = massa da amostra seca.

Os valores encontrados para U_{bu} foram 17,3% e 13,4%, para farelo de trigo e aveia, respectivamente.

4.4.1. Correlação entre umidade em base úmida (U_{bu}) e atividade de água (a_w) para o substrato farelo de trigo

Foram preparadas quatro amostras com 20 g cada do farelo de trigo utilizado neste trabalho com valores de U_{bu} de 20%, 40%, 60% e 80%. As medições foram feitas à temperatura de 25° C. A forma da preparação das amostras e as respostas obtidas são apresentadas no Quadro 3.

As medições de a_w foram realizadas em um analisador de a_w AquaLab, Serie 3 TE, da marca Decagon, gentilmente cedido por Braseq Ltda para a execução exclusiva das medidas deste experimento.

Quadro 3. Amostras de farelo de trigo com diferentes U_{bu} e o valor correspondente em a_w .

ensaio	farelo de trigo como estocado 17,3% U_{bu} (g)	Farelo de trigo seco (g)	água presente no farelo (g)	água adicionada (g)	água total (g)	massa total (g)	U_{bu} (%)	a_w
1	19,347	16	3,347	0,653	4	20	20	0,805
2	14,510	12	2,510	5,490	8	20	40	0,910
3	9,674	8	1,674	10,326	12	20	60	0,972
4	4,837	4	0,837	15,163	16	20	80	0,985

A representação gráfica apresentada na Figura 13 mostra a correlação entre U_{bu} e a_w a 25° C.

Figura 13. Representação gráfica da correlação entre U_{bu} e a_w para farelo de trigo a 25° C.

O modelo que melhor se ajusta à curva encontrada é o de hipérbole, o qual apresentou coeficiente de correlação $R = 0,99704$. A equação que descreve a correlação entre U_{bu} e a_w para farelo de trigo a 25°C é a que segue:

$$a_w = \frac{1,0679115 \times U_{bu}}{6,5766906 + U_{bu}}$$

4.5. Determinação do pH

O pH foi determinado a partir de uma suspensão do substrato, fermentado ou não, em água destilada, em proporção de 2:1 (água:substrato), em volume por massa de substrato.

4.6. Obtenção e padronização do inóculo

O meio de cultura para a propagação do inóculo foi composto de 4,0% (em massa) de aveia em flocos finos, 1,6% (em massa) de ágar nutriente e água destilada, misturados em liquidificador e fervidos com agitação por 10 minutos.

Foram colocados, em frascos de Roux de 1 L Pyrex, 100 mL do meio de cultura, esterilizados por 20 minutos a 121°C , posteriormente resfriados e inoculados com os 5 mL de suspensão de esporos (inclusive os discos de ágar-aveia) presentes nos frascos de manutenção, previamente agitados em agitador tipo vórtex.

A pré-fermentação para obtenção do inóculo durou uma semana à mesma temperatura do processo (25°C), quando o microrganismo tomou toda a superfície do meio de cultura (Figura 14).

Acrescentou-se a cada frasco 100 mL de água destilada esterilizada (Figura 15), mais cerca de duas dúzias de esferas de vidro de 5 mm esterilizadas (Figura 16), agitou-se gentilmente em sentido orbital, raspando-se assim a superfície do meio de cultura, despreendendo o microrganismo e suspendendo-o (Figura 17). Retirou-se a suspensão de esporos de concentração indeterminada (Figura 18) e fizeram-se as diluições necessárias para possibilitar a determinação da quantidade de esporos (Figura 19). Foi feita então a contagem de esporos em Câmara de Neubauer (Figura 20) ao microscópio ótico (Figura 21). Determinada a concentração de esporos, foram feitas as diluições para se obter as concentrações desejadas do inóculo (Figura 22). A inoculação foi feita através de pipeta graduada esterilizada (Figura 23).

4.7. Extração da enzima quitinase

O extrato enzimático foi obtido através da adição de água destilada na proporção 1:1 (volume/massa de substrato fermentado), maceração do meio fermentado, descanso de uma hora e filtração em algodão cirúrgico sob pressão.

4.7.1. Centrifugação

A fim de se diminuir os erros de leitura do extrato enzimático no espectrofotômetro devido à presença de insolúveis suspensos, foi estudada a centrifugação do extrato em uma combinação de cinco níveis de tempo e cinco níveis de força de centrifugação, utilizando centrífuga Sorvall RC 5B Plus. Os tempos estudados foram 4, 5, 7,5, 10 e 11 minutos, e as forças de centrifugação (RCF*) foram de 7225, 7964, 10404, 12844 e 14150. Como os diferentes ensaios não apresentaram diferença significativa em suas respostas (atividade enzimática), optou-se por tomar os valores centrais estudados para tempo e força de centrifugação, 7,5 minutos e 10404 RCF, respectivamente, como padrão para o procedimento.

*RCF: Força Centrífuga Relativa, refere-se à força durante a centrifugação que move o particulado para o exterior em relação ao centro de rotação. Esta força é proporcional à distância radial e ao quadrado da velocidade do reator.

Figura 14. Frasco de Roux com meio de cultura colonizado por *T. stromaticum*.

Figura 15. Adição de 100 mL de água esterilizada em frasco de Roux.

Figura 16. Pérolas de vidro usadas para a raspagem do microrganismo.

Figura 17. Frasco de Roux com o microrganismo já raspado.

Figura 18. Coleta da suspensão de esporos de *T. stromaticum*.

Figura 19. Diluição e homogeneização da amostra para contagem de esporos.

Figura 20. Câmara de Neubauer para contagem de esporos.

Figura 21. Imagem dos esporos de *T. stromaticum* na Câmara de Neubauer, em microscópio ótico.

Figura 22. Diferentes concentrações de esporos de *T. stromaticum*.

Figura 23. Inoculação em reator de bandeja.

4.8. Estabelecimento de uma análise rápida da viabilidade do produto

A atividade de biofungicidas é geralmente avaliada em bioensaios. As respostas a esses ensaios, porém, são muito demoradas, impossibilitando o trabalho de otimização de um processo de produção.

A eficiência do produto, para situação de controle por hiperparasitismo, como é o caso do *T. stromaticum*, apresenta relação direta com a concentração de biomassa, e então a resposta dos experimentos pode ser dada, de forma presuntiva, com relação ao crescimento microbiano. Foram testados alguns métodos para a quantificação da biomassa de *T. stromaticum* em meio sólido para este trabalho.

4.8.1. Plaqueamento

Este método consiste em se preparar placas de Petri esterilizadas com o meio de cultura próprio para cada microrganismo, adicionando ao meio de cultura um agente redutor de colônias (para facilitar a identificação de cada colônia), inoculá-las com uma fração de cada amostra de meio fermentado (ou seu extrato), aguardar o início do crescimento microbiano e então fazer a contagem de cada colônia formada.

Este procedimento foi testado para o estudo, porém quando do uso de uma parcela do próprio meio fermentado (com massa conhecida), os resultados foram inconsistentes (erros muito grandes entre as repetições) devido à heterogeneidade na disposição do fungo no meio de cultura (o crescimento é bem maior na superfície do meio de cultura) e à impossibilidade de homogeneizá-lo, tornando a amostra não representativa.

Quando se fez o plaqueamento tomando os extratos, a dificuldade veio dos processos de obtenção destes extratos. A primeira parte do processo de extração constituiu-se da adição de água destilada na proporção 1:1 (em massa), descanso por uma hora e filtração em algodão cirúrgico. Já nesta etapa a maior parte da população fúngica não é

extraída (acarretando erro), já que o microrganismo se prende firmemente ao substrato, bem como forma agregados de maior tamanho. Esta filtração não é suficiente para que se possa fazer um plaqueamento, já que *T. stromaticum* é um fungo filamentoso e suas hifas são também formadoras de colônias. Assim, se uma amostra contém apenas uma única hifa com 10 µm de comprimento, será formada uma colônia; se no processo de extração esta hifa se quebra em duas hifas de 5 µm de comprimento, duas colônias serão formadas. Portanto, deve haver um outro processo de separação para se reter todas as formas do fungo que não sejam seus conídios.

Sabe-se que os conídios de *T. stromaticum* têm tamanho de cerca de 3 µm. Foi testado então um filtro de vidro sinterizado com tamanho de poro próximo a esta medida. Entretanto, devido à alta concentração de sujidades presentes no extrato, provenientes do uso de um meio de cultura altamente complexo, como o farelo de trigo, no processo de produção, o filtro entupiu e este procedimento não foi possível. O filtro de vidro sinterizado foi substituído por filtro de papel qualitativo (nº 1). Sabe-se que este filtro não é permeável apenas aos conídios, como seria desejado, mas ao menos é passível de reprodução e supostamente permitiria comparar os resultados entre si e entre aqueles obtidos através da análise de atividade enzimática de quitinase. Entretanto, os resultados obtidos no plaqueamento também tiveram erros de grande magnitude entre suas repetições.

4.8.2. Contagem direta do extrato ao microscópio

Foram feitos testes com os extratos passando pelos mesmos tratamentos descritos no item sobre o plaqueamento (4.8.1). Independente dos processos de extração e filtração utilizados, a contagem de conídios ao microscópio não deu resultado com mínima precisão, tanto em relação aos erros dentre as repetições, quanto em relação aos resultados obtidos através da análise de atividade de quitinase feitos posteriormente. O problema foi devido à presença de sujidades no extrato, provenientes do complexo meio de cultura utilizado (farelo de trigo), que se apresentavam de tamanho e forma semelhantes aos conídios do fungo, confundindo a leitura e conseqüentemente a contagem.

4.8.3. Atividade enzimática de quitinase

A ação de um biofungicida em relação à praga alvo pode estar relacionada à presença de alguma enzima extracelular e, neste caso, é interessante quantificar a concentração desta enzima em particular e utilizar esse resultado presuntivo da atividade do pesticida. Estudos prévios mostraram a importância das enzimas hidrolíticas no controle biológico por micoparasitismo (LIMA et al., 2000). *T. stromaticum* produz quitinase, enzima que provavelmente participa da ação de controle do fungo causador da vassoura-de-bruxa, motivo pelo qual foram relacionados testes analíticos através desta enzima.

A quantificação de açúcar redutor, através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), liberado pela hidrólise da quitina, foi adaptada de LIMA et al. (2000).

A mistura da reação continha 0,5 mL de quitina a 0,25% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, e 0,5 mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada em banho-maria, sob vigorosa agitação, a 37°C, por 5 horas. Após este período, adicionou-se 1,0 mL de DNS, fez-se incubação por 5 minutos a 96°C, seguida de banho de gelo, acrescentando 16 mL de tartarato de sódio e potássio e leu-se em espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda (absorvância).

A solução de quitina foi preparada com quitina para análise, produzida pela Sigma (Chitin C-9752: Poli-[1→4]-β-N-acetil-D-glucosamina, EC 215-744-3 – Figura 24), dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, com o uso de ultra-som, por 30 minutos. Devido a sua baixa solubilidade, foi utilizado complementarmente um agitador do tipo vórtex, para homogeneizar a solução a cada retirada de solução de quitina.

O reagente DNS foi preparado através da adição de 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico, 19,8 g de NaOH e 1416 mL de água destilada. A dissolução foi a quente e foram adicionados 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

A solução de tartarato duplo de sódio e potássio foi preparada em água destilada na concentração de 15,1 g/L ($4.H_2O$) ou 12,3 g/L (anidro).

A curva padrão para a quantificação do açúcar redutor liberado pela quitinase foi feita com N-acetil-D-glucosamina (Figura 25), nas concentrações de 0,1 a 1,0 g/L em água destilada.

Os brancos foram preparados para a estimativa de interferências nos resultados de leitura de absorvância, contendo 0,5 mL de solução de tampão acetato e 0,5 mL de cada extrato enzimático.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a capacidade do extrato enzimático em produzir 1 μ mol de açúcar redutor por hora por mililitro, nas condições descritas anteriormente.

Figura 24. Estrutura da Poli-[1→4]-β-N-acetil-D-glucosamina.

Figura 25. Estrutura da N-acetil-D-glucosamina.

4.8.4. Determinação da concentração de *T. stromaticum* através da redução de DMSO

Um método utilizado na Embrapa e que se mostra promissor para a estimativa de biomassa é o da estimativa da atividade microbiana por cromatografia gasosa, através do monitoramento da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) para dimetilsulfeto (DMS) (LAVORENTI e FRIGHETTO, 2000).

O método se baseia no fato de que muitos microrganismos são capazes de reduzir DMSO para DMS, que é insolúvel em água e se apresenta na forma gasosa em temperatura ambiente, podendo ser analisado quantitativamente na fase gasosa.

A metodologia utilizada neste trabalho partiu do método descrito por LAVORENTI e FRIGHETTO (2000) para estimativa da atividade microbiana do solo por cromatografia gasosa. Entretanto, foram utilizados um microrganismo não previamente estudado (*T. stromaticum*) e um equipamento distinto (Espectrômetro de Massas), motivo pelo qual o

método foi desenvolvido especialmente para este trabalho, sendo portanto um resultado dele, apresentado no Capítulo Resultados e Discussão. As etapas feitas para o desenvolvimento desta metodologia foram:

- Teste da capacidade do equipamento em detectar DMS;
- Escolhas dos sinais característicos de DMS por espectrometria de massas;
- Determinação do tempo de reação para a redução de DMSO para DMS por *T. stromaticum*;
- Construção de uma Curva Analítica para relacionar a concentração de DMS com a resposta do espectrômetro de massas;
- Correlação entre a quantidade de esporos de *T. stromaticum* e a concentração de DMS liberado.

4.9. Planejamento Experimental: Triagem de variáveis e otimização do processo

Os métodos para um Planejamento Experimental são descritos em vários livros de estatística (BARROS NETO et al., 1996). A metodologia aplicada neste trabalho será explicada com o uso de um exemplo de produção de enzima por processo fermentativo, para facilitar tanto a explicação quanto a utilização deste método para pesquisadores que não tenham formação aprofundada em estatística. O exemplo, bem como a descrição detalhada da metodologia de análise dos resultados se encontra no Anexo 1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fermentação em reator de bandeja

5.1.1. Estimativa do pH inicial do substrato

A fim de variar o pH como um parâmetro no planejamento de experimentos, se propôs uma metodologia que pudesse ser reproduzida em todos os experimentos, independente da atividade de água (a_w) inicial desejada.

Buscou-se um modelo que relacionasse a estimativa do pH como uma função da a_w do substrato e do pH da fração de água adicionada para este fim. Foi proposto um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central em triplicata para este estudo, apresentado no Quadro 4, juntamente com as respostas em termos de pH do extrato final. Este extrato era obtido através da adição de H_2O destilada (pH 5,52) na proporção 2:1 v/p de substrato úmido, maceração, descanso de uma hora e filtragem sob pressão em algodão cirúrgico.

Quadro 4. Planejamento para criação de um modelo para a estimativa de pH inicial do substrato, e as respostas obtidas.

ensaio	pH H ₂ O	a _w	pH do extrato
1	4,0	0,876	6,40
2	8,0	0,876	6,41
3	4,0	0,976	6,46
4	8,0	0,976	6,41
5	6,0	0,944	6,41
6	6,0	0,944	6,44
7	6,0	0,944	6,41

Uma análise preliminar dos resultados mostrou que o pH do extrato obtido não é influenciado nem pela a_w inicial do substrato nem pelo pH da água adicionada ao nível de confiança de 95%, dentro do intervalo experimentado. Este resultado traz duas consequências interessantes: a primeira, de que não será possível utilizar o pH como um parâmetro a ser estudado (imposto) no processo; a segunda, de que o substrato utilizado apresenta característica tamponante, o que é altamente desejável em fermentação em substrato sólido, devido à dificuldade em se controlar as alterações de pH no sistema produtivo, o que poderia prejudicar o processo.

5.1.2. Estimativa de biomassa através da atividade enzimática de quitinase

Primeiramente, foi feita a curva-padrão para relacionar a absorvância observada a 540 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro, com a concentração de N-acetil-D-glucosamina, o açúcar reduzido da hidrólise da quitina pela quitinase. A concentração de N-acetil-D-glucosamina variou de 0,1 a 1,0 g/L, e os resultados são os que seguem no Quadro 5.

Quadro 5. Absorvância observada a 540 nm para diferentes concentrações de N-acetil-D-glucosamina.

Concentração (g/L)	absorvância
0,1	0,0130
0,2	0,0478
0,3	0,0674
0,4	0,0968
0,5	0,1206
0,6	0,1503
0,7	0,1751
0,8	0,2017
0,9	0,2266
1,0	0,2507

Os dados obtidos formam a curva-padrão representada pela Figura 26.

Figura 26. Curva-padrão de concentração de N-acetil-D-glucosamina por absorvância.

5.1.3. Primeiro planejamento para triagem de variáveis

Um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} foi proposto para este ensaio. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 6. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas no espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 2, 3 e 4, respectivamente.

Quadro 6. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o primeiro ensaio:

Ensaio	a_w	L(h/dia)	t(dias)	X (esp./g)	Aveia (%)	U/g _{subs.seco}
1	0,987	8	8	10^6	5	13,957
2	0,987	8	6	10^6	0	15,877
3	0,987	0	8	5×10^5	5	23,877
4	0,987	0	6	5×10^5	0	26,998
5	0,962	8	8	5×10^5	0	9,588
6	0,962	8	6	5×10^5	5	9,974
7	0,962	0	8	10^6	0	4,832
8	0,962	0	6	10^6	5	11,296

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 7.

Quadro 7. Estimativa dos efeitos de todos os fatores estudados no planejamento.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(2)$
Constante	14,54988	0,774440	18,78760
a_w	11,25475	1,548880	7,26638
L	-4,40175	1,548880	-2,84189
t	-2,97275	1,548880	-1,91929
X	-6,11875	1,548880	-3,95043
Aveia	0,45225	1,548880	0,29199

$$R^2 = 0,97568$$

$$t_{(2, 0,025)} = 4,303$$

Pelo valor de R^2 pode-se observar que a regressão é significativa. O único fator que apresenta efeito significativo é a atividade de água inicial do substrato (a_w), dentro do campo experimentado e do nível de confiança de 95%. Isto pode ser observado através do teste de $t(2)$. Divide-se o valor do efeito pelo erro padrão e se obtém o valor de $t(2)$, que deve ser maior em valor absoluto do que o valor tabelado de t para área de probabilidade de 0,025 e 2 graus de liberdade ($t_{(2, 0,025)} = 4,303$). O valor do efeito de a_w igual a 11,25475 significa que a média das respostas aumenta em 11,25475 quando se aumenta o nível de a_w em uma unidade codificada.

O que também se pode observar através da estimativa dos efeitos é que aquele provocado pela adição de aveia é bem menor do que os dos outros fatores. Por isso, pode-se considerar este efeito como um erro experimental, ignorando-o. Têm-se, agora, três fatores cujos efeitos mostram-se significativos dentro do campo experimentado, ao nível de confiança de 95%. A magnitude das estimativas dos efeitos em relação ao teste t pode ser mais bem visualizada através da representação gráfica apresentada na Figura 27.

Interpretando os resultados e a análise estatística, pode-se dizer que o sistema fermentativo apresenta melhores respostas quando a a_w inicial do substrato é a maior testada e quando tanto a concentração inicial de esporos quanto o fotoperíodo são os menores estudados, dentro do campo experimentado e ao nível de confiança de 95%. Os fatores tempo de fermentação e adição de aveia não foram significativos.

Os níveis dos fatores a_w e iluminação que apresentaram melhores resultados podem ser explicados pelas características fisiológicas próprias do microrganismo estudado. Já o melhor desempenho corresponder à menor concentração de inóculo é de explicação um pouco mais complexa. É possível que a quantidade e/ou a qualidade dos nutrientes presentes no sistema tenha mudado, devido à maior concentração microbiana, a ponto de o microrganismo tomar outra via metabólica e produzir metabólitos outros que não a enzima quitinase.

Figura 27. Estimativa dos efeitos dos parâmetros em comparação ao valor de $t_{(3, 0,025)}$, com três graus de liberdade e área de probabilidade de 0,025 (3,182).

5.1.4. Segundo planejamento para triagem de variáveis

Um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} foi proposto para este ensaio. Desta feita, pretende-se isolar o parâmetro "luz" do parâmetro "aveia" para que se possa acompanhar melhor suas influências. Além disso, os tempos de permanência em cultivo foram aumentados. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 8. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas ao espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 5, 6 e 7, respectivamente.

Quadro 8. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o segundo ensaio.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)	t (dias)	U/g _{subs.seco}
1	0,987	10^8	5	24	11	8,034
2	0,987	10^8	0	0	11	1,263
3	0,987	10^7	5	0	9	3,035
4	0,987	10^7	0	24	9	20,612
5	0,962	10^8	5	0	9	4,607
6	0,962	10^8	0	24	9	1,469
7	0,962	10^7	5	24	11	8,902
8	0,962	10^7	0	0	11	6,844

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 9.

Quadro 9. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(2)$
Constante	6,84581	2,655465	2,57801
a_w	2,78039	5,310931	0,52352
X	-6,00481	5,310931	-1,13065
aveia	-1,40228	5,310931	-,26404
L	5,81682	5,310931	1,09525
t	-1,17041	5,310931	-0,22038

$$R^2 = 0,58935$$

$$t_{(2, 0,025)} = 4,303$$

O valor de R^2 mostra que a regressão não é significativa, já que este número é bastante longe de um. Ainda, nenhum fator apresentou efeito significativo no campo experimentado dentro do nível de confiança de 95%.

Entretanto, pode-se observar que os parâmetros concentração de esporos (X) e fotoperíodo (L) apresentaram efeitos de maiores magnitudes do que os demais parâmetros. Por isso, para fins de orientação quanto ao tipo de influência de variáveis no processo, serão ignorados os parâmetros menos significativos, e os resultados são os que seguem no Quadro 10.

Quadro 10. Estimativa dos efeitos para os fatores de maiores efeitos estudados no planejamento.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(5)$
Constante	6,84581	1,836828	3,72697
X	-6,00481	3,673657	-1,63456
L	5,81682	3,673657	1,58339

$$R^2 = 0,50879$$

$$t_{(5, 0,1)} = 1,476$$

O baixo valor de R^2 continua indicando falta de ajuste à regressão. Porém, obteve-se efeitos significativos ao nível de confiança de 80% tanto para a concentração de inóculo (X) quanto para o fotoperíodo (L).

O resultado que mostra haver melhores respostas para o sistema quando a concentração inicial de inóculo é menor já é recorrente, embora não de fácil explicação, conforme considerações apresentadas no item 5.1.3. Quanto à influência positiva da exposição à luz, este resultado, apesar de discrepante em relação aos anteriormente obtidos, mostra correlação com o que foi visualmente observado, ou seja, maior desenvolvimento dos microrganismos nos ensaios onde havia exposição à luz.

5.1.5. Terceiro planejamento para triagem de variáveis

Um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} foi proposto para este ensaio. O tempo de cultivo foi fixado em sete dias. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 11. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas ao espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 8, 9 e 10, respectivamente.

Quadro 11. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o terceiro ensaio.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)	U/g _{subs.seco}
1	0,987	10^8	5	24	2,2521
2	0,987	10^8	0	0	2,3292
3	0,987	10^7	5	0	2,2887
4	0,987	10^7	0	24	1,9260
5	0,962	10^8	5	0	1,0704
6	0,962	10^8	0	24	1,0588
7	0,962	10^7	5	24	1,0545
8	0,962	10^7	0	0	1,2656

A partir deste planejamento, os extratos enzimáticos obtidos passaram a ser centrifugados para se tentar obter respostas mais confiáveis nas determinações ao espectrofotômetro. A centrifugação para este planejamento foi feita com RCF de 15000 por 15 minutos. Para os ensaios seguintes, os parâmetros de operação da centrífuga são os descritos em Material e Métodos.

A Figura 28 mostra o aspecto visual do substrato no interior dos reatores após o período de fermentação. Pode-se observar através das fotografias que os reatores de 1 a 4, que têm maior a_w inicial, apresentaram maior crescimento microbiano. Fazendo um corte do substrato com o uso de uma colher, não se observou crescimento do microrganismo nas camadas inferiores do substrato nos sistemas de maior a_w inicial, conforme pode ser observado na Figura 29. Os reatores de 5 a 8, de menor a_w inicial, apresentaram grande variação conforme a exposição à luz. Apresentaram maior produção do fungo desejado os reatores 5 e 8, dentre os de menor a_w , que foram os que ficaram sem iluminação. Nos meios com menor a_w , ao se fazer o corte do substrato para a observação da colonização do meio, como pode ser visto na Figura 30, observou-se que há crescimento mesmo nas camadas inferiores do substrato, o que indica que a maior a_w induz a um maior crescimento do fungo na superfície mas limita seu crescimento nas camadas inferiores do leito, provavelmente devido à menor capacidade de transferência de ar ocasionada pela ocupação dos espaços intersticiais do substrato sólido pela água.

Figura 28. Fotografia dos reatores com o substrato fermentado para o terceiro planejamento. Os números em branco referem-se aos ensaios respectivos.

Figura 29. Fotografia de um reator com o substrato fermentado com a_w inicial maior.

Figura 30. Fotografia de um reator com o substrato fermentado com a_w inicial menor.

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 12.

Quadro 12. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no terceiro planejamento.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(3)$
Constante	1,65567	0,05559	29,78356
a_w	1,08668	0,11118	9,77409
X	0,04390	0,11118	0,39485
aveia	0,02156	0,11118	0,19389
L	-0,16561	0,11118	-1,48955

$$R^2 = 0,97028$$

$$t_{(3, 0,025)} = 3,182$$

O valor de R^2 mostra que a regressão é significativa, já que este número é próximo de um. O fator atividade de água inicial do substrato (a_w) apresentou efeito significativo no campo experimentado dentro do nível de confiança de 95%. Os demais fatores não apresentaram efeito significativo no nível de confiança de 95% visto que os valores obtidos no teste $t(3)$ são menores em valores absolutos do que o valor tabelado de t para três graus de liberdade e área de probabilidade de 0,025 ($t_{(3, 0,025)} = 3,182$).

Do mesmo modo como foi feito anteriormente, diminuíram-se as exigências em relação ao ajuste do modelo para que se possa tirar algumas conclusões em relação aos demais fatores.

A partir da análise visual dos reatores após a fermentação, pôde-se observar a influência dos fatores a_w inicial do substrato e exposição à luz como os mais significativos. Excluindo-se portanto os fatores concentração de inóculo (X) e adição de aveia, tem-se uma nova análise e interpretação dos dados, conforme exposto no Quadro 13.

Quadro 13. Estimativa dos efeitos para os fatores de maiores efeitos estudados no planejamento.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(5)$
Constante	1,65567	0,04443	37,26730
a_w	1,08668	0,08885	12,23003
L	-0,16561	0,08885	-1,86383

$$R^2 = 0,96836$$

$$t_{(5, 0,1)} = 1,476$$

O bom valor de R^2 continua indicando ajuste à regressão e obtiveram-se efeitos significativos ao nível de confiança de 80% tanto para a atividade de água (a_w) quanto para o fotoperíodo (L).

A partir da análise feita, pode-se dizer que o microrganismo é favorecido pelos sistemas onde a a_w inicial do substrato foi maior e onde não houve exposição à luz. A Figura 31 traz a representação gráfica dos valores observados nos experimentos para a_w e L, com os outros fatores fixados nos níveis de melhores respostas ($X = +1$, Aveia = +1).

Apesar dos resultados obtidos serem coerentes, inclusive ao se comparar a análise visual dos reatores com os dados analisados estatisticamente, houve uma diferença importante no procedimento adotado que pode explicar os baixos valores de absorvância obtidos ao espectrofotômetro, que foi a inclusão da centrifugação do extrato enzimático para a retirada de materiais em suspensão que dificultavam a leitura da absorvância. Após este planejamento foi feito um estudo em relação aos parâmetros operacionais da centrifugação e estes foram, então, padronizados.

Figura 31. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da atividade de água (a_w) e do fotoperíodo (L), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central).

5.2. Troca dos bioreatores de bandeja pelas bolsas de polipropileno

A mudança de bioreatores não foi uma tarefa fácil. Vários ensaios foram feitos com os reatores de bolsa de polipropileno sem que houvesse crescimento do microrganismo estudado ou de contaminantes. Isto indicava, ao menos, que o tratamento térmico em forno de microondas era efetivo quanto à esterilização do meio de cultura.

Foram enumerados os seguintes fatores que poderiam provocar o problema encontrado:

- falta de oxigênio. Embora os reatores em bandeja fossem cobertos com papel celofane, esta cobertura permitia a troca de gases pelas fendas que se formavam entre as bandejas e o celofane, enquanto a tampa plástica da bolsa de polipropileno

oferece fechamento hermético. Por isso, fizeram-se ensaios com a bolsa de polipropileno fechada tanto com a tampa plástica quanto com tampões de algodão.

- presença de sanitizante na bolsa plástica. Embora não houvesse informação sobre o uso de algum produto químico nas bolsas de polipropileno que pudessem causar o não crescimento do microrganismo, foi feito ensaio lavando-se as bolsas com detergente antes da colocação do substrato nas mesmas.
- material da bolsa impróprio para o crescimento do fungo. Os ensaios foram feitos paralelamente utilizando-se frascos Erlenmeyer de 500 mL para se detectar diferenças de crescimento em vidro ou em plástico. Testes anteriores mostraram que o microrganismo crescia bem em frascos Erlenmeyer.
- pré-tratamento do substrato. É sabido que o pré-tratamento térmico do substrato é uma parte importante da fermentação em estado sólido. Como na fermentação em bandejas o pré-tratamento se dava em autoclave e em bolsas de polipropileno em microondas, estudou-se o pré-tratamento de ambos os tipos para cada um dos bioreatores (frasco e bolsa). Ainda, experimentou-se colocar o substrato em descanso de 24 horas após a adição de água, anteriormente ao tratamento térmico, com o fim de aumentar a disponibilidade de nutrientes do substrato ao microrganismo.

Para se descobrir o porquê do não crescimento do microrganismo nos bioreatores de bolsa, foram feitos os experimentos apresentados no Quadro 14, em duplicata.

Os resultados mostram que o tipo do bioreator não limita o crescimento do microrganismo, mas seu fechamento sim, visto que a resposta só foi positiva quando foi feito uso de tampões de algodão. Ainda, o pré-tratamento do substrato e o tipo da esterilização são importantes. Foi observado crescimento quando o substrato era deixado em repouso por 24 horas antes da esterilização e quando a esterilização se dava em autoclave, sendo necessário pelo menos um destes procedimentos para que o crescimento ocorra. Como a esterilização em autoclave é complicada para o sistema de fermentação com bolsas de polipropileno, já que o bocal da bolsa não é autoclavável e por isso o substrato não poderia ser autoclavado no interior da bolsa, foi resolvido que o processo

seria feito deixando-se o substrato em descanso por 24 horas seguido de esterilização em microondas por 2 minutos e se fechariam as bolsas com tampões de algodão.

Quadro 14. Experimentos para determinação das causas do não crescimento do microrganismo em bolsas de polipropileno.

ensaio	bioreator	pré-tratamento do substrato	fechamento do bioreator	esterilização	resposta
1	Erlenmeyer	nenhum	tampão de algodão com PVC	autoclave por 20 minutos	não cresceu
2	Erlenmeyer	nenhum	tampão de algodão com PVC	microondas por 2 minutos	não cresceu
3	Erlenmeyer	nenhum	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
4	Erlenmeyer	nenhum	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	não cresceu
5	Erlenmeyer	descanso 24 horas	tampão de algodão com PVC	autoclave por 20 minutos	não cresceu
6	Erlenmeyer	descanso 24 horas	tampão de algodão com PVC	microondas por 2 minutos	não cresceu
7	Erlenmeyer	descanso 24 horas	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
8	Erlenmeyer	descanso 24 horas	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	cresceu
9	bolsa de polipropileno	nenhum	tampa plástica	autoclave por 20 minutos	não cresceu
10	bolsa de polipropileno	nenhum	tampa plástica	microondas por 2 minutos	não cresceu
11	bolsa de polipropileno	nenhum	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
12	bolsa de polipropileno	nenhum	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	não cresceu
13	bolsa de polipropileno	descanso 24 horas	tampa plástica	autoclave por 20 minutos	não cresceu
14	bolsa de polipropileno	descanso 24 horas	tampa plástica	microondas por 2 minutos	não cresceu
15	bolsa de polipropileno	descanso 24 horas	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
16	bolsa de polipropileno	descanso 24 horas	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	cresceu
17	bolsa de polipropileno lavada	nenhum	tampa plástica	autoclave por 20 minutos	não cresceu
18	bolsa de polipropileno lavada	nenhum	tampa plástica	microondas por 2 minutos	não cresceu
19	bolsa de polipropileno lavada	nenhum	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
20	bolsa de polipropileno lavada	nenhum	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	não cresceu
21	bolsa de polipropileno lavada	descanso 24 horas	tampa plástica	autoclave por 20 minutos	não cresceu
22	bolsa de polipropileno lavada	descanso 24 horas	tampa plástica	microondas por 2 minutos	não cresceu
23	bolsa de polipropileno lavada	descanso 24 horas	tampão de algodão	autoclave por 20 minutos	cresceu
24	bolsa de polipropileno lavada	descanso 24 horas	tampão de algodão	microondas por 2 minutos	cresceu

5.2.1. Primeiro planejamento para fermentação em reatores de bolsa

Um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} foi proposto para este ensaio. O tempo de cultivo foi fixado em sete dias. Para este planejamento se aumentou a a_w inicial do substrato, a concentração de inóculo e a adição de aveia. Já a exposição à luz foi diminuída, já que já se encontrava em seu nível máximo (24 h/dia). Os extratos enzimáticos foram centrifugados com RCF de 10404 por 7,5 minutos. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 15. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas ao espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 11, 12 e 13, respectivamente.

Quadro 15. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o primeiro ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)	U/g _{subs.seco}
1	0,995	3×10^8	10	9	16,7017
2	0,995	3×10^8	5	0	10,6681
3	0,995	1×10^8	10	0	14,1991
4	0,995	1×10^8	5	9	11,6125
5	0,987	3×10^8	10	0	5,1331
6	0,987	3×10^8	5	9	3,4965
7	0,987	1×10^8	10	9	3,3801
8	0,987	1×10^8	5	0	1,0083

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 16.

Quadro 16. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento:

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(3)$
Constante	8,27492	0,43194	19,15760
a_w	10,04082	0,86388	11,62295
X	1,44987	0,86388	1,67832
aveia	3,15717	0,86388	3,65465
L	1,04558	0,86388	1,21033

$$R^2 = 0,98074$$

$$t_{(3, 0,1)} = 1,638$$

O valor de R^2 mostra que a regressão é significativa, já que este número é próximo de um. O fator atividade de água inicial do substrato (a_w) foi o de maior importância, seguido da adição de aveia e por fim da concentração de inóculo, sendo que estes três apresentaram efeitos significativos no campo experimentado dentro do nível de confiança de 80%. O fator exposição à luz não apresentou efeito significativo no nível de confiança de 80% visto que o valor obtido no teste $t(3)$ é menor em valor absoluto do que o valor tabelado de t para três graus de liberdade e área de probabilidade de 0,1 ($t_{(3, 0,1)} = 1,638$).

Figura 32. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da concentração inicial de esporos (X) e da atividade de água (a_w), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central).

Figura 33. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da adição de aveia e da atividade de água (a_w), em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central).

Figura 34. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da concentração de esporos (X) e da adição de aveia, em valores codificados (demais parâmetros fixados no ponto central).

A partir da análise feita, pode-se dizer que o microrganismo é favorecido pelos sistemas com maior a_w inicial do substrato, maior concentração de inóculo e mais adição de aveia. A Figura 32 traz a representação gráfica dos valores observados nos experimentos para a_w e X, com os outros fatores fixados nos níveis de melhores respostas (Aveia = +1, L = +1). A Figura 33 traz a representação gráfica dos valores observados nos experimentos para a_w e Aveia, com os outros fatores fixados nos níveis de melhores respostas (X = +1, L = +1). A Figura 34 traz a representação gráfica dos valores observados nos experimentos para Aveia e X, com os outros fatores fixados nos níveis de melhores respostas (a_w = +1, L = +1).

Os resultados obtidos foram bons em termos de produtividade do sistema, principalmente por se tratar de um bioreator alternativo, alcançando valores de atividade enzimática próximos aos anteriormente obtidos em reatores convencionais de bandeja. Entretanto, os resultados mostraram que os parâmetros importantes do processo são de difícil otimização, já que os melhores resultados estão se dando nos limites dos parâmetros desejados para este trabalho. A atividade de água do substrato, por exemplo, apresentou melhor efeito quando em seu nível superior, de 90%. Neste nível de a_w , já é possível visualizar água drenada no sistema, o que o descaracteriza como um sistema de fermentação em substrato sólido (FSS). Para a otimização deste parâmetro, teria que se usar uma a_w inicial ainda maior, até que se encontrasse um ponto de decréscimo nos resultados. Entretanto, utilizar-se de maior a_w traria o inconveniente de uma heterogeneização do substrato, já que este não é capaz de absorver toda a água admitida ao sistema. Ainda, se perderia uma das vantagens da FSS que é a facilidade de conservação do meio fermentado através de secagem. Outro ponto que foi contra a proposta foi a obtenção de melhores respostas quando da adição de 10% de aveia. Era possível prever tal comportamento, mas fato é que o objetivo do presente trabalho é produzir *Trichoderma stromaticum* a um baixo custo, utilizando para isto o sistema FSS e um substrato barato, preferencialmente subproduto agroindustrial. Por isso, não faz sentido continuar aumentando a proporção de aveia até se achar o rendimento máximo. Mesmo a concentração de inóculo se encontra próxima dos limites facilmente obtidos através do procedimento usual. Aumentar a concentração de inóculo demandaria um aumento na quantidade mássica de esporos e

conseqüente aumento da vidraria utilizada, podendo inclusive se chegar ao extremo de se ter que centrifugar a suspensão de esporos para se obter uma maior concentração. Por fim, a exposição à luz, que havia se mostrado importante anteriormente, não retornou efeitos significativos no campo estudado. Esta pode ser facilmente aumentada, até o limite óbvio de 24 h/dia, e assim foi estudada posteriormente.

5.2.2. Segundo planejamento para fermentação em reatores de bolsa

Um Planejamento Fatorial Fracionado 2^{4-1} foi proposto para este ensaio. O tempo de cultivo foi fixado em sete dias. Os extratos enzimáticos foram centrifugados com RCF de 10404 por 7,5 minutos. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 17. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas ao espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 14, 15 e 16, respectivamente.

Quadro 17. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o segundo ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)	U/g _{subs.seco}
1	0,995	10^8	10	9	9,6802
2	0,995	10^8	5	0	8,4458
3	0,995	5×10^7	10	0	7,9208
4	0,995	5×10^7	5	9	9,5541
5	0,987	10^8	10	0	3,8154
6	0,987	10^8	5	9	3,0124
7	0,987	5×10^7	10	9	3,4140
8	0,987	5×10^7	5	0	3,7844

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 18.

Quadro 18. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados no planejamento:

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(3)$
Constante	6,20340	0,30674	20,22364
a_w	5,39368	0,61348	8,79194
X	0,07015	0,61348	0,11435
aveia	0,00845	0,61348	0,01377
L	0,42355	0,61348	0,69041

$$R^2 = 0,96287$$

$$t_{(3, 0,1)} = 1,638$$

O valor de R^2 mostra que a regressão é significativa, já que este número é próximo de um. O fator atividade de água inicial do substrato (a_w) apresentou efeito significativo no campo experimentado dentro do nível de confiança de 80%. Os demais fatores não apresentaram efeito significativo no nível de confiança de 80% visto que os valores obtidos no teste $t(3)$ são menores em valores absolutos do que o valor tabelado de t para três graus de liberdade e área de probabilidade de 0,1 ($t_{(3, 0,1)} = 1,638$).

Como feito anteriormente, foram tirados os fatores que apresentaram menor efeito na análise dos dados, neste caso, a concentração do inóculo (X) e a adição de aveia. A nova estimativa dos efeitos, considerando-se apenas os efeitos de maior magnitude, é apresentada no Quadro 19.

Quadro 19. Estimativa dos efeitos para os fatores mais importantes estudados.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(4)$
Constante	6,20340	0,08420	73,67337
a_w	5,39368	0,16841	32,02846
L	0,42358	0,16841	2,51511
$a_w \times L$	1,01028	0,16841	5,99908

$$R^2 = 0,99627$$

$$t_{(4, 0,1)} = 1,533$$

A partir da análise feita, pode-se dizer que o microrganismo é favorecido pelos sistemas onde a a_w inicial do substrato foi maior. Em menor grau, pode-se dizer também que nos sistemas onde o fator fotoperíodo foi maior as respostas serão melhores. Um novo efeito mostrou-se significativo nesta análise, que foi o da interação entre os fatores a_w e L.

dias, 5×10^7 esporos/g de substrato, 5% aveia/trigo e 24 h/dia, respectivamente. Os extratos enzimáticos obtidos foram centrifugados com RCF de 10404 por 7,5 minutos. O planejamento em valores reais e as respostas obtidas são apresentados no Quadro 20. O planejamento em valores codificados, as respostas obtidas ao espectrofotômetro e a transformação das respostas de atividade enzimática, de unidades por volume de extrato para unidades por massa de substrato seco, se encontram nos Anexos 17, 18 e 19, respectivamente.

Quadro 20. Planejamento de experimentos em valores reais e as respostas obtidas para o terceiro ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	m (g)	U/g _{subs.seco}
1	0,991	200	6,2010
2	0,991	200	5,5240
3	0,991	100	5,6086
4	0,991	100	5,7356
5	0,987	200	3,9693
6	0,987	200	3,6896
7	0,987	100	4,7721
8	0,987	100	4,7104

A estimativa dos efeitos produzidos pelos diferentes fatores é apresentada no Quadro 21.

Quadro 21. Estimativa dos efeitos para todos os fatores estudados.

Fator	Efeito	Erro padrão	Teste $t(4)$
Constante	5,02632	0,09325	53,90253
a_w	1,48195	0,18650	7,94625
m	-0,36070	0,18650	-1,93408
$a_w \times m$	0,55110	0,18650	2,95501

$$R^2 = 0,94976$$

$$t_{(4, 0,1)} = 1,533$$

O valor de R^2 mostra que a regressão é significativa, já que este número é próximo de um. Os fatores atividade de água inicial do substrato (a_w), massa de substrato por reator (m) e a interação entre os dois fatores ($a_w \times m$) apresentaram efeito significativo no campo experimentado dentro do nível de confiança de 80%, visto que os valores obtidos no teste

$t(4)$ são maiores em valores absolutos do que o valor tabelado de t para quatro graus de liberdade e área de probabilidade de 0,1 ($t(4, 0,1) = 1,533$).

A partir da análise feita, pode-se dizer que o microrganismo é favorecido pelos sistemas onde a a_w inicial do substrato foi maior. Em menor grau, pode-se dizer também que nos sistemas onde for colocado menos substrato as respostas serão melhores. Outro efeito que se mostrou significativo nesta análise foi o da interação entre os fatores a_w e m . Tendo este efeito um valor positivo, pode-se dizer que melhores respostas são esperadas quando se fizerem ensaios onde ambos os fatores tenham o mesmo sinal, ou seja, maior a_w e maior m , ou menor a_w e menor m . A representação gráfica do modelo obtido, em superfície de resposta, mostra bem este comportamento, conforme pode ser visto na Figura 36.

Figura 36. Representação gráfica de superfície para a resposta de atividade enzimática em função da atividade de água (a_w) e da massa de substrato por reator (m), em valores codificados.

5.3. Estudo da cinética do crescimento de *T. stromaticum* em reator de bolsa

A fim de se observar o crescimento de *T. stromaticum* em função do tempo, foi feito um estudo da fermentação em reatores de bolsa de polipropileno de 3 L de volume, com os parâmetros anteriormente estudados fixados, e colhidos resultados do crescimento microbiano em relação à atividade enzimática de quitinase observada.

Os parâmetros utilizados no processo foram fixados nos seguintes valores:

- Atividade de água: 0,985;
- Fotoperíodo: 24 h/dia;
- Concentração de inóculo: 1×10^6 esporos por grama de substrato total;
- Adição de aveia: 5% em relação à massa de farelo de trigo;
- Adição de quitina: 0,1% em relação à massa de substrato seco;
- Massa de substrato total por reator: 100 g.

Os extratos enzimáticos obtidos foram centrifugados com RCF de 10404 por 7,5 minutos. As respostas obtidas são apresentadas no Quadro 22.

Quadro 22. Respostas obtidas em atividade enzimática para cada um dos ensaios de fermentação de *T. stromaticum* em função do tempo de fermentação.

Tempo de fermentação (dias)	Atividade enzimática de quitinase (U/g _{subs.seco})
5	8,200
6	8,786
7	9,095
8	9,126
9	8,971
10	9,249
11	8,941
12	9,064

A representação gráfica que mostra os resultados obtidos é apresentada na Figura 37.

Figura 37. Cinética do crescimento de *T. stromaticum* observada em relação à atividade enzimática de quitinase.

Os resultados obtidos mostram que há crescimento microbiano acentuado até o sétimo dia de fermentação. A partir deste tempo de fermentação, os resultados se mostram relativamente constantes.

5.4. Determinação da concentração de *T. stromaticum* através da concentração de DMS liberado, por espectrometria de massas

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas monoquadrupolar Extrel (Pittsburg, PA) adaptado com um quadrupolo de $\frac{3}{4}$ " de alta transmissão, utilizando EI com energia de ionização de 70 eV. Os experimentos foram realizados em sala com temperatura controlada (23 ± 1 °C). Para a inserção da amostra de DMS (dimetilsulfeto) na fonte do espectrômetro de massas foi desenvolvido um sistema, demonstrado na Figura 38, que consiste de:

- Frasco da amostra: frasco cromatográfico de vidro com 5 mL de volume útil, com tampa de rosca e septo de silicone;
- Agulha: perfura o septo de silicone, permitindo a entrada da fração volátil da amostra no sistema;
- Linha: de aço inoxidável, para condução da fração volátil da amostra ao espectrômetro de massas.

Figura 38. Esquema do sistema utilizado para análise de DMS em espectrômetro de massas.

5.4.1. Detecção de DMS e escolha dos sinais característicos deste composto por espectrometria de massas

Para a escolha dos sinais característicos do DMS foi feita uma pesquisa na biblioteca internacional de espectros de massas por EI (NIST – National Institute of

Standards Technology; <http://webbook.nist.gov>). O espectro fornecido pela NIST é mostrado na Figura 39.

Figura 39. Espectro de massas do DMS. Fonte: National Institute of Standards Technology.

Foram escolhidos para o monitoramento do DMS os íons de razões massa/carga (m/z) 62, 61 e 47, que são sinais característicos específicos para o composto analisado.

Prepararam-se diversas amostras de DMS (P.A.) em diferentes concentrações e foram feitas as análises, que mostraram bom nível de detecção e linearidade na relação entre a concentração de DMS e a resposta de intensidade apresentada pelo espectrômetro de massas, operando em modo SIM (Selective Ion Monitoring).

5.4.2. Determinação do tempo de reação para a redução de DMSO para DMS por *T. stromaticum*

Como o microrganismo objeto deste trabalho não havia sido previamente estudado em relação a sua capacidade de reduzir DMSO (dimetilsulfóxido) para DMS, decidiu-se realizar um estudo da cinética da reação. O microrganismo foi exposto ao DMSO e a reação foi constantemente monitorada pelo espectrômetro de massas em modo SIM em relação à liberação dos íons de m/z 62, 61 e 47.

Sendo a temperatura de reação diferente da temperatura ambiente do laboratório onde se encontra o espectrômetro de massas, foi construído um reator encamisado de 20 mL de volume útil para o crescimento do microrganismo, sendo a temperatura do reator controlada através da circulação de água de um banho térmico.

O microrganismo cresceu a 25° C, com iluminação, no interior do reator encamisado, utilizando-se como substrato o meio ágar-aveia na mesma concentração previamente utilizada para a obtenção do inóculo.

Após uma semana, a superfície do substrato estava toda colonizada por *T. stromaticum*. Colocou-se o reator à temperatura da reação de DMSO para DMS (30° C) adicionou-se sobre a superfície 2,0 mL de DMSO na concentração de 10% (vol/vol, em água destilada), fechou-se o reator com tampa de rosca e septo de silicone e se iniciou a contagem do tempo de reação. O reator foi então conectado ao espectrômetro de massas, conforme esquematizado na Figura 40, e a cinética da reação começou a ser monitorada. O espectro da cinética da redução de DMSO para DMS é apresentado na Figura 41.

Figura 40. Esquema do sistema para análise da cinética da reação de DMSO para DMS por espectrometria de massas.

Figura 41. Espectro da cinética da redução de DMSO para DMS por *T. stromaticum* obtido através do espectrômetro de massas operando em modo seletivo de íons (SIM).

Através da resposta obtida, foi possível determinar que, após seis horas de reação, *T. stromaticum* liberaria uma boa quantidade de DMS, sendo possível sua detecção.

O espectro obtido através da monitoração do íon de relação m/z 47 foi o que permitiu leitura mais clara, com menos ruído, motivo pelo qual este valor de m/z foi o escolhido para as próximas análises.

5.4.3. Realização da Curva Analítica para relação entre concentração de DMS e resposta do espectrômetro de massas

A Curva Analítica foi obtida através das relações das intensidades dos sinais apresentados pelo espectrômetro de massas com relação às diferentes concentrações de DMS adicionadas em cada frasco analisado.

Foram injetados 10 μL de DMS puro num frasco seco e limpo de 35,5 mL de volume útil, com tampa de rosca e septo de silicone, sendo este frasco identificado como matriz.

Concentração de DMS do frasco matriz:

$$d_{\text{DMS}} = 0,85 \text{ kg/L}$$

$$\begin{array}{rcl} 850 \text{ mg DMS} & - & 1000 \mu\text{L} \\ x & - & 10 \mu\text{L DMS puro} \end{array}$$

$$x = 8,5 \text{ mg DMS}$$

$$[\text{DMS}]_{\text{matriz}} = 8500 \mu\text{g} / 35500 \mu\text{L}$$

$$[\text{DMS}]_{\text{matriz}} = 0,2394 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Os padrões foram feitos injetando diferentes volumes do conteúdo do frasco matriz em frascos de 5 mL de volume útil, com tampa de rosca e septo de silicone, conforme apresentado no Quadro 23.

Quadro 23: Padrões de DMS para elaboração da curva padrão.

Identificação	Volume de matriz injetado (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Pd1	10	0,4789
Pd2	15	0,7183
Pd3	20	0,9577
Pd4	40	1,9155
Pd5	60	2,8732

Após a injeção das alíquotas de matriz nos frascos padrão, estes eram deixados por um minuto em banho térmico a 30°C e então acoplados ao espectrômetro de massas através da agulha que transpassava o septo de silicone. A detecção do íon começava após um minuto e dez segundos do início da análise, e aos dois minutos e quarenta segundos o sinal alcançava seu pico máximo, sendo então retirado o frasco com o padrão e acoplado um frasco similar preenchido por ar, retornando o sinal à linha de base após sete minutos e vinte segundos, completando um tempo total para a análise de cada um dos padrões de dez minutos.

O espectro obtido para os diferentes padrões é apresentado na Figura 42 e a Curva Analítica obtida é mostrada na Figura 43.

Os valores de intensidades máximas obtidas para as diferentes concentrações de DMS são apresentados no Quadro 24.

Quadro 24: Valores de intensidades máximas para cada uma das concentrações padrão de DMS obtidas no espectrômetro de massas (m/z 47).

Identificação	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Intensidade do pico (pA)
Pd1	0,4789	24,23
Pd2	0,7183	32,85
Pd3	0,9577	40,00
Pd4	1,9155	60,27
Pd5	2,8732	82,94

Figura 42: Espectro de massas em modo SIM do íon de m/z 47 para os padrões de diferentes concentrações de DMS.

Figura 43. Curva Analítica do íon de m/z 47 que relaciona a intensidade do sinal do espectrômetro de massas, em modo SIM, com a concentração de DMS dos padrões.

O modelo obtido apresenta coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,9953$ e é representado pela seguinte equação:

$$[\text{DMS}] (\mu\text{g/mL}) = 0,042 \times \text{intensidade (pA)} - 0,6278$$

5.4.4. Correlação entre a quantidade de *T. stromaticum* e a concentração de DMS liberado

T. stromaticum foi produzido em substrato ágar-aveia (semelhante àquele para obtenção de inóculo), a 25° C com iluminação. Após uma semana, observada a colonização da superfície do substrato pelo microrganismo, foram retiradas finas camadas da superfície substrato-microrganismo, e diferentes frações destas camadas foram colocadas no interior de frascos de 5 mL de volume útil, com tampa de rosca e septo de silicone. A prévia quantificação de microrganismos por frasco não é possível sem a inviabilização dos microrganismos, motivo pelo qual a colocação de diferentes quantidades de microrganismo por frasco foi feita através da quantidade de camadas colocadas por frasco. As camadas substrato-microrganismo foram dispostas nos frascos com o cuidado de se colocar a superfície do lado do substrato contra as paredes do frasco, deixando a superfície colonizada pelo microrganismo disponível para contato direto com o DMSO.

Foram preparados dez frascos de 5 mL com quantidades supostamente diferentes de microrganismos. Os frascos foram colocados em banho térmico na temperatura da reação (30° C). A cada dez minutos (tempo total de leitura de cada amostra ao espectrômetro de massas, incluindo o tempo para retorno do sinal à linha de base), a cada um destes frascos foram adicionados 200 µL de DMSO 10% (vol/vol, em água destilada). Cada um dos frascos era fechado, colocado no banho térmico e se iniciava a contagem do tempo de reação. Além dos dez frascos de amostras, foram preparados um frasco apenas com 200 µL de DMSO 10% (identificado como “branco DMSO”) e três frascos com diferentes quantidades de microrganismos, sem a adição de DMSO (identificados como “brancos microrganismo”).

Após seis horas de reação, os frascos com as amostras foram acoplados ao espectrômetro de massa, através de agulha que transpassava o septo em direção ao “headspace” de cada frasco. Os tempos de detecção foram os mesmos observados para a leitura dos padrões anteriormente descrita.

O espectro obtido para as diferentes amostras é apresentado na Figura 44.

Figura 44. Espectro de massas para as amostras de *T. stromaticum* com DMSO após seis horas de reação (os números sob cada uma das curvas referem-se à amostra correspondente).

Nenhum dos brancos apresentou sinal significativo no espectro.

Após a leitura, as amostras tiveram a quantidade de esporos de *T. stromaticum* determinada através de contagem em microscópio óptico com o uso de Câmara de Neubauer. O procedimento de suspensão dos esporos consistiu na colocação de 2,0 mL de água destilada em cada um dos frascos, homogeneização em agitador tipo vórtex por 30

segundos e retirada de 1 mL da suspensão de esporos, diluída em 9 mL de água destilada, nova homogeneização em agitador tipo vórtex e contagem dos esporos desta suspensão em Câmara de Neubauer. A leitura ao microscópio foi bastante clara, tendo os esporos se desprendido facilmente do substrato e dispostos de modo homogêneo na suspensão.

A quantidade de esporos por amostra e o sinal de intensidade máxima obtido junto ao espectrômetro de massas se encontra no Quadro 25.

Quadro 25. Quantidade de esporos de *T. stromaticum* por amostra e o valor de intensidade encontrado ao espectrômetro de massas (m/z 47).

amostra	Quantidade de esporos	Intensidade máxima (pA)
1	$2,417 \times 10^7$	5,73
2	$3,500 \times 10^7$	14,79
3	$6,000 \times 10^7$	20,83
4	$1,192 \times 10^8$	30,43
5	$1,467 \times 10^8$	32,53
6	$1,200 \times 10^8$	34,52
7	$1,625 \times 10^8$	38,35
8	$1,167 \times 10^8$	31,42
9	$1,817 \times 10^8$	34,55
10	$2,317 \times 10^8$	47,56

Passando-se o valor da quantidade de esporos para seu logaritmo na base dez, e transformando-se o valor da intensidade máxima dada pelo espectrômetro de massas em concentração de DMS, através da Curva Analítica previamente obtida, têm-se os resultados apresentados no Quadro 26 e a curva de correlação entre concentração de DMS e $\log(\text{esporos})$ apresentada na Figura 45.

Quadro 26. Valor do logaritmo na base dez da quantidade de esporos e concentração de DMS obtida através da Curva Analítica [DMS] x Intensidade.

amostra	log(esporos)	[DMS] ($\mu\text{g/mL}$)
1	7,3832	-
2	7,5441	-
3	7,7782	0,2471
4	8,0761	0,6503
5	8,1663	0,7385
6	8,0792	0,8220
7	8,2109	0,9829
8	8,0669	0,6918
9	8,2593	0,8233
10	8,3649	1,3697

Figura 45. Correlação entre a concentração de DMS obtida através da Curva Analítica e o valor do logaritmo na base dez da quantidade de esporos presente em cada amostra.

O modelo obtido apresenta coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,9501$ e é representado pela seguinte equação:

$$\log(\text{esporos}) = 0,6139 \times [\text{DMS}] + 7,6288$$

É importante salientar que o modelo acima é válido apenas para amostras com quantidades de esporos acima de $4,254 \times 10^7 = 10^{7,628}$, já que concentrações negativas de compostos não podem ser explicadas fisicamente. A regressão deve ser considerada para a área estudada quando da elaboração da Curva Analítica, sendo que valores obtidos através de extrapolação desta curva devem ser observados com cautela.

Em contrapartida, a ocorrência de um limite inferior para o modelo obtido também apresenta o limite de detecção da técnica empregada seguindo os procedimentos acima descritos, concluindo-se que é possível se determinar a quantidade de esporos de *T. stromaticum* diretamente em meio sólido a partir de um valor aproximado de $4,3 \times 10^7$ com um excelente coeficiente de regressão de 0,95.

5.5. Discussão dos resultados

5.5.1. Fermentação em reatores de bandeja

Os estudos com reatores de bandeja foram os que apresentaram os melhores resultados em relação à atividade enzimática de quitinase encontrada nos extratos. Sendo a atividade enzimática proporcional à concentração microbiana no extrato, conclui-se que os reatores de bandeja apresentam melhor produtividade do que os de bolsa plástica.

Melhores produtividades são esperadas, nos reatores de bandeja, quando se usa como substrato uma mistura de farelo de trigo e água que proporcione uma umidade em base úmida de 80% (a_w do substrato de 0,987).

A adição de aveia no meio de cultura não mostrou ser importante.

Em relação à presença de luz, os resultados não foram conclusivos, pois em dois conjuntos de ensaios foram obtidas melhores respostas sem luz, e em um conjunto de ensaios os melhores resultados foram obtidos com luz. Entretanto, a influência positiva da

luz foi maior do que a negativa, razão pela qual se sugere que próximos estudos sejam levados com o uso de iluminação. Por fim, luzes próprias para câmaras de cultivo de microrganismos (tipo “grow-lux”) aparentemente conduzem a melhores resultados do que iluminação com luzes fluorescentes normais (tipos “branca fria” e “luz do dia”). Este resultado também não é conclusivo pois os diferentes tipos de luz foram usados em aparelhos diferentes, portanto as condições ambientais não eram as mesmas, não permitindo certificar que apenas o tipo de luz era o fator da obtenção de melhores resultados.

Não é necessário que o inóculo tenha alta concentração de esporos. De fato, os melhores resultados foram obtidos quando foi utilizado um inóculo com concentração de $5,0 \times 10^5$ esporos por grama de substrato umedecido.

A maior produtividade obtida nos estudos com este tipo de reator se deve principalmente à maior área de troca de gases que o reator de bandeja proporciona, já que toda a superfície superior do reator é fechada com papel celofane, que permite a passagem de gases.

A desvantagem dos reatores de bandeja é que estes são reutilizáveis, ou seja, o produto fermentado terá que ser transferido para outro recipiente, secado até um nível de atividade de água suficiente para diminuir a atividade microbiológica e então embalado para ser transportado ao local de aplicação. Outra desvantagem do reator de bandeja é que aumentos de escala só são possíveis com o aumento da área da base do reator, dado que o crescimento do fungo ocorre principalmente sobre a superfície do meio de cultura.

5.5.2. Fermentação em reatores de bolsa

A produtividade nos reatores de bolsa foi menor do que aquela obtida nos reatores de bandeja, considerando-se como resposta a atividade enzimática de quitinase nos extratos obtidos.

Melhores resultados foram obtidos quando se usou a mistura de meio de cultura com uma umidade em base úmida de 85% ($a_w = 0,995$). Este nível de umidade está no limite da capacidade de absorção de água do substrato. Aumentando-se a umidade a partir deste ponto, começa a ocorrer água drenada no sistema, descaracterizando-o como um sistema de fermentação em substrato sólido.

Os processos em reatores de bolsa plástica demandaram o uso de inóculo com maior concentração de esporos. Os melhores resultados são obtidos inoculando-se o meio de cultura com $3,0 \times 10^8$ esporos por grama de substrato umedecido.

Em um dos conjuntos de ensaios a presença de luz foi benéfica ao crescimento microbiológico. Nos outros ensaios, a presença de luz não teve influência positiva, mas também não foi prejudicial. Por isso, sugere-se utilizar iluminação para a produção de *T. stromaticum* em reatores de bolsa plástica. Vale também para este sistema de produção a observação de que aparentemente o uso de lâmpadas do tipo “grow-lux” é melhor do que o de lâmpadas fluorescentes comuns.

Melhores resultados foram obtidos nos sistemas em que houve adição de 10% de aveia (porcentagem em relação à massa de farelo de trigo). Entretanto, a diferença de resposta para os sistemas em que havia adição de apenas 5% de aveia não foi grande. Portanto, caso a intenção seja a produção mais econômica do fungo, pode ser usada aveia como aditivo na concentração de 5%, dado que a aveia é bem mais cara do que o farelo de trigo.

Os reatores de bolsa plástica tiveram desempenho inferior aos de bandeja devido ao pequeno bocal que dispõem, sendo este local a única área para troca de gases com o ambiente externo. Caso exista (ou seja construído) um reator com maior bocal de carga (e troca de gases), os resultados tendem a ser melhores. Um artifício pode ser usado ainda para melhorar a produtividade em reatores de bolsa, que é o uso de uma tampa com menor restrição de passagem de gases. Neste estudo, foi utilizado tampão de algodão envolto em tecido tipo gaze, que restringe bastante a passagem de gases. Em trabalhos futuros, podem

ser testados tampões de papel filtro, ou mesmo apenas de gaze, para ver se estes tampões conseguem impedir a contaminação do interior do reator com microrganismos provenientes do ambiente. Como vantagem dos reatores de bolsa, destaca-se a possibilidade de aumento da massa de substrato por reator, e a conseqüente melhoria na produtividade por reator. Outro ponto positivo é o fato da bolsa ser descartável e poder ser usada como a embalagem final do produto fermentado. Como a bolsa conta com tampa de fechamento hermético, o produto fermentado pode ser seco em seu interior (com a tampa aberta), seguido do fechamento da tampa com o produto ainda quente. Com o resfriamento, o produto fermentado estaria confinado no interior da bolsa sob atmosfera de baixa pressão e baixa concentração de oxigênio, restringindo assim a continuidade do processo de crescimento do microrganismo e aumentando a vida de prateleira do produto. O tipo de tampa deste reator permite ainda o uso de um lacre inviolável para que o consumidor final tenha certeza da conservação do produto e sua viabilidade. Por fim, a bolsa de polipropileno é leve e resistente a choques e atrito, constituindo-se, assim, numa excelente embalagem do ponto de vista do transporte do produto desde o local de produção até o consumidor final.

5.5.3. Determinação da concentração fúngica através da redução de DMSO a DMS

Os grandes empecilhos para o desenvolvimento de estudos em sistemas de Fermentação em Substrato Sólido são o monitoramento e a quantificação do desenvolvimento microbiano. Pela dificuldade na separação do microrganismo do meio de cultura, sua quantificação normalmente envolve etapas dispendiosas e que agregam erros, como extração e determinação de metabólitos associados ao crescimento microbiano. Portanto, o desenvolvimento desta nova metodologia, de procedimento simples e com aplicação direta sobre o meio sólido fermentado, é de grande valia e pode facilitar em muito o estudo de outros processos, contanto que nestes se empreguem microrganismos capazes de reduzir DMSO a DMS. Por fim, esta metodologia mostrou bons níveis de detecção e excelente precisão em se tratando de processos biotecnológicos

6. CONCLUSÕES

- *Trichoderma stromaticum* apresentou boa produtividade em sistemas de Fermentação em Substrato Sólido, tanto em biorreatores de bandeja quanto de bolsa plástica, considerando-se como parâmetro a atividade enzimática de quitinase observada nos extratos obtidos a partir dos meios fermentados.
- A produtividade em bioreator de bandeja foi maior do que em bolsa plástica, devido à limitação da área de troca de gases pelo pequeno bocal de carga e descarga deste último.
- O parâmetro atividade de água mostrou ser o de maior importância na produtividade de *T. stromaticum* dentre aqueles estudados neste trabalho.
- Para a produção de *T. stromaticum* em reatores de bandeja, a melhor produtividade, de aproximadamente 27 U/g_{subs.seco} (unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco), é obtida quando a mistura que forma o meio de cultura tem atividade de água de 0,987, não há exposição à luz e a concentração de inóculo é de $5,0 \times 10^5$ esporos por grama de substrato umedecido.
- Quando utilizados reatores de bolsa plástica, a melhor produtividade, de aproximadamente 17 U/g_{subs.seco}, é obtida quando o meio de cultura tem atividade de água de 0,995, a concentração de inóculo é de $3,0 \times 10^8$ esporos por grama de

substrato umedecido e é adicionada aveia ao meio de cultura na proporção de 10% em relação à massa de farelo de trigo.

- O Planejamento Estatístico de Experimentos foi uma ferramenta útil na investigação dos processos fermentativos.
- A determinação da concentração microbiana por métodos clássicos, como plaqueamento e contagem em microscópio, não é adequada ao processo. A medida indireta pela produção da enzima chave no processo biológico de controle da praga (neste caso, quitinase) se mostrou adequada como método presuntivo, evitando o uso de bioensaio.
- A metodologia de determinação da concentração microbiana através da análise da concentração de dimetilsulfeto (DMS) se mostrou simples e de grande precisão. A Curva Analítica feita a partir de padrões de DMS, no espectrômetro de massas, apresentou coeficiente de regressão $R^2 = 0,995$. A correlação entre a concentração de DMS medida no espectrômetro de massas e a concentração de esporos presente em cada amostra apresentou coeficiente de regressão $R^2 = 0,950$, um bom resultado em se tratando de sistema biológico.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Conduzir bioensaios com amostras de meio fermentado com *Trichoderma stromaticum*, controlando *Crinipellis pernicioso*, e comparar os resultados alcançados com a atividade enzimática de quitinase dos extratos obtidos das mesmas amostras.
- Estudar o uso de diferentes tipos de tampões nos reatores de bolsa plástica, observando a melhoria na capacidade de troca de gases com o ambiente externo e a eficiência destes tipos de tampões no que se refere ao impedimento da contaminação do meio de cultura.
- Estudar a influência de diferentes tipos de iluminação (tipos de lâmpadas, frequência, temperatura de cor) e a intensidade da iluminação (luximetria) no crescimento de *T. stromaticum*.
- Adaptar a metodologia de determinação da concentração de *T. stromaticum* através da concentração de DMS liberado, com espectrômetro de massas, para uso com cromatógrafo gasoso, já que este tipo de equipamento tem maior disponibilidade nos centros de pesquisa brasileiros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSIN, E., COTORAS, M., MUÑOZ, G., SAN MARTIN, R., VOLPE, D. Comparative Properties of *Trichoderma harzianum* Spores Produced under Solid State and Submerged Culture Conditions. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 463-473.

ARÉVALO, E., CERNA, G. Fungal Antagonism to *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, the Casual Agent of the Witches' Broom in Cacao. **Biocontrol.**, v.2, n. 1, p. 5-16, 1996.

ARRUDA, R. O. M. **Estudo da Fermentação Semi-Sólida para Produção de *Bacillus thuringiensis***. São Paulo: FCF, USP, 1999. Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

ARRUDA, R. O. M., MORAES, R. O. Substratos para Fermentação Semi-Sólida. In: **FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS**, 2001, Jaguariúna. Apostila do curso. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 2001.

- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1996. 299p.
- BECKER, H. Cacao - Good for Agriculture and the Environment. **Agricultural Research**, v.47, n.11, p. 1, 1999a.
- BECKER, H. Fighting a Fungal Siege on Cacao Farms. **Agricultural Research**, v.47, n.11, p. 4-8, 1999b.
- BENHAMOU, N., CHET, I. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p. 2095-2099, 1997.
- CAMARILLO, R. C., AVELIZAPA, L. I. R. Las Quitinasas Bacterianas y Sus Posibles Aplicaciones Biotecnológicas. In: BARRAGÁN, L. A. P., OCHOA, S. H., SERRANO, G. R., CASTAÑEDA, G. S. **Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología**. México: Universidad Autonoma Metropolitana, 1999. p. 287-314.
- CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Panorama da Economia Mundial de Cacau**. Disponível na Internet. http://www.ceplac.gov.br/Sinopse_Cacau/Panorama/producao_mundial.htm. 02 jul. 2003.

- COONEY, C. L. Growth of Microorganisms. In: REHM, H. -J., REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vol. v.1.** Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie, 1981. p. 73-112.
- DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHIMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial. v.2.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 247-276.
- DURAND, A., RENAUD, J., MARATRAY, J., ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Design and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 71-92.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Unidade Executora: CNPMA. **Caracterização Molecular e Avaliação de Impacto de *Trichoderma* no agroecossistema cacaueiro.** Espelho do Subprojeto nº 11.0.99.238.02. SINSEP 2.0, 1999.
- FIGUEIREDO, M. B. Estudo sobre a Aplicação do Método de Castellani para Conservação de Fungos Fitopatogênicos em Plantas. **O Biológico. v.33, p. 9-13, 1967.**
- GOLDSTEIN, E. Über eine noch nicht untersuchte Strahlungsform na der Kathodeinducirter Entladungen. **Berlin Akd. Monatsber. v.39, 691, 1886.**

- HADAR, Y., CHET, I., HENIS, Y. Biological Control of *Rhizoctonia solani* Damping-Off with Wheat Bran Culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. v.69, n.1, p. 64-67, 1979.
- HADDAD, R., MENDES, M. A., HÖEHR, N. F., EBERLIN, M. N. Amino Acid Quantitation in Aqueous Matrices via Trap and Release Membrane Introduction Mass Spectrometry: Homocysteine in Human Plasma. *The Analyst*. v.126, p. 1212-1215, 2001.
- IESB - Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia. **Cabruca**. Disponível na Internet. <http://www.iesb.org.br/areas/desenvolvimentosa/cabruca.htm>. 10 jun. 2003.
- ICONOMOU, D., ISRAILIDES, C. J., KANDYLIS, K., NIKOKYRIS, P. Protein Enrichment of Sugar Beet Pulp by Solid State Fermentation and its Efficacy in Animal Feeding. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 289-298.
- LAVORENTI, A., FRIGHETTO, N. Estimativa da Atividade Microbiana do Solo por Cromatografia Gasosa. In: FRIGHETTO, R. T. S., VALARINI, P. J. **Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 2000. p. 139-150.
- LIMA, L. H. C., MARCO, J. L., FELIX, C. R. Enzimas Hidrolíticas Envolvidas no Controle Biológico por Micoparasitismo. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**, v.2. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 2000. p. 263-304.

- LONSANE, B. K., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, M., KRISHNALAH, M. M. Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*, v.27, p. 259-273, 1992.
- LYNCH, J. M. In vitro Identification of *Trichoderma harzianum* as a Potential Antagonist of Plant Pathogens. *Current Microbiology*, v.16, p. 49-53, 1987.
- MARTINS, M. P. Potencial Antagônico de Espécies de *Trichoderma* Contra *Verticillium dahliae* Kleb. em Berinjela (*Solanum melongena* L.). Piracicaba: ESALQ, USP, 1988. Tese Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1988.
- MELO, I. S. Potencialidades de Utilização de *Trichoderma* spp. no Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: BETTIOL, W. *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.
- MELO, I. S. *Desenvolvimento de um Biofungicida para o Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1999.
- MENDES, M. A., PIMPIM, R. S., KOTLAHO, T., BARONE, J. S., EBERLIN, M. N. Construção de uma Sonda de Membrana e sua Aplicação na Análise de Compostos Orgânicos Voláteis em Água através da Técnica MIMS e MIMS/MS. *Química Nova*. v.19, n.5, p.480-485, 1996a.

- MENDES, M. A., PIMPIM, R. S., KOTIAHO, T., EBERLIN, M. N. A Cryotrap Membrane Introduction Mass Spectrometry System for Analysis of Volatile Organic Compounds in Water at the Low Parts-per-Trillion Level. **Analytical Chemistry**. v.68, n.19, p.3502-3506, 1996b.
- MITCHELL, D. A. Biomass Determination in Solid-State Cultivation. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier Science Publishers LTD, 1992. p. 53-63.
- MITCHELL, D. A., LONSANE, B. K. Definition, Characteristics and Potencial. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier Science Publishers LTD, 1992. p. 1-16.
- MITCHELL, D. A., TARGONSKI, Z., ROGALSKI, J., LEONOWICZ, A. Substrates for Processes. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier Science Publishers LTD, 1992b. p. 29-52.
- MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F., MORAES, R. O. Multiplicação de Agentes de Controle Biológico. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 253-272.
- MORAES, R. O. **Estudo da Produção de β -Galactosidase por Fermentação em Substrato Sólido em Colunas de Raimbault**. Campinas: FEQ, Unicamp, 1999. Tese Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

- MORAES, R. O., SANTANA, M. H. A. Production of *Scopulariopsis* sp. Beta-Galactosidase by Solid Fermentation in Raimbault Columns Bioreactor System. In: WELTI-CHANES, J., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., AGUILERA, J. M. **Proceedings of the Eighth International Congress on Engineering and Food**. v.2. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc., 2001. p. 2003-2007.
- MORAES, R. O. Noções de Delineamento Experimental. In: FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS, 2001, Jaguariúna. Apostila do curso. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 2001.
- PELIZER, L. H., ANDRADE, A. T., MORAES, I. O. O papel da atividade de água na fermentação em estado sólido – Escolha de um método de determinação em escala laboratorial. **Revista Universidade Guarulhos – Ciências Exatas e Tecnológicas**, Guarulhos, ano III, n.4, p. 33-37, Aug. 1998.
- PELIZER, L. H. **Desenvolvimento de um Processo de Cultivo em Estado Sólido de *Spirulina platensis***. Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2000.
- PEREIRA, R. M. **Dry Mycelium Formulation of Entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, with Inclusion of Ultraviolet-Radiation Protectants**. Tese Mestrado – Faculty of the Graduate School of Cornell University, 1987.

- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE ON SOLID STATE FERMENTATION, 1997, Curitiba. Apostila do curso. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997.
- RAMANA MURTHY, M. V., KARANTH, N. G., RAGHAVA RAO, K. S. M. S. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v.38, p. 99-147, 1993.
- SAMUELS, G. J., PARDO-SCHULTHEISS, R., HEBBAR, P., LUMSDEN, R. D., BASTOS, C. N., COSTA, J. C., BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum*, sp. nov., a Parasite of the Cacao Witches Broom Pathogen. In: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Disponível na Internet. <http://www.nalusda.gov/ttic/tektran/data/000009/88/0000098823.html>. 20 oct. 1999.
- SARHY-BAGNON, V., LOZANO, P., PIOCH, D., ROUSSOS, S. Coconut-Like Aroma Production by *Trichoderma harzianum* in Solid State Fermentation. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 379-391.
- SIVAN, A., UCKO, O., CHET, I. Biological Control of Fusarium Crown Rot of Tomato by *Trichoderma harzianum* Under Field Conditions. **Plant Disease**, v.71, n. 7, p. 587-592, 1987.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT,

M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation.**
Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 5-22.

Anexo 1. Planejamento Experimental: Triagem de variáveis e otimização do processo

Os métodos para um Planejamento Experimental são descritos por vários livros de estatística. A metodologia aplicada neste trabalho será explicada com o uso de um exemplo de produção de enzima por processo fermentativo, para facilitar tanto a explicação quanto a utilização deste método para pesquisadores que não tenham formação aprofundada em estatística. Os programas computacionais utilizados neste exemplo/explicativo foram Statistica, Maple e Excel.

1.1. Exemplo de Planejamento de Experimentos

Partir-se-á de um exemplo de produção de enzima através de FSS em reatores do tipo bandeja. Serão estudados inicialmente os parâmetros:

- U - Umidade inicial do substrato
- X - concentração do inóculo
- T - temperatura do processo
- pH - pH inicial do substrato
- L - exposição à luz

1.2. Triagem de Variáveis

O estudo será feito em dois níveis para cada variável, conforme descrito no Quadro 1.1.

Quadro 1.1. Valores dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados.

	variáveis	U (%)	X (esp/mL)	T (°C)	pH	L (h/dia)
níveis	código					
menor	-	50	10^6	25	4,0	10
maior	+	70	10^8	30	7,0	14

O Planejamento para este tipo de ensaio é o do tipo Fracionado 2^{5-2} , com 8 ensaios, que pode ser visto no Quadro 1.2 em valores codificados e no Quadro 1.3 em valores reais.

Quadro 1.2. Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} , em valores codificados.

variáveis ensaios	U	X	T	pH (U x X)	L (U x X x T)
1	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-
3	+	-	+	-	-
4	+	-	-	-	+
5	-	+	+	-	-
6	-	+	-	-	+
7	-	-	+	+	+
8	-	-	-	+	-

Quadro 1.3. Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} , em valores reais.

variáveis ensaios	U	X	T	pH (U x X)	L (U x X x T)
1	70	10^8	30	7,0	14
2	70	10^8	25	7,0	10
3	70	10^6	30	4,0	10
4	70	10^6	25	4,0	14
5	50	10^8	30	4,0	10
6	50	10^8	25	4,0	14
7	50	10^6	30	7,0	14
8	50	10^6	25	7,0	10

O Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} é composto de um Planejamento Completo 2^3 (U, X e T) com os dois últimos fatores, pH e L, sendo formados pelo produto entre os fatores anteriores, U x X e U x X x T, respectivamente.

Para este exemplo foram obtidas as respostas para o planejamento apresentadas no Quadro 1.4.

Quadro 1.4. Respostas dos ensaios do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-2} .

variáveis ensaios	U	X	T	pH	L	resposta (UI)
1	+	+	+	+	+	2,35
2	+	+	-	+	-	2,53
3	+	-	+	-	-	2,01
4	+	-	-	-	+	2,22
5	-	+	+	-	-	1,23
6	-	+	-	-	+	1,35
7	-	-	+	+	+	1,01
8	-	-	-	+	-	1,12

Com o uso do programa Statistica, se obtém a representação gráfica dos valores previstos para um modelo linear contra os valores observados nas respostas, que pode ser vista na Figura 1.1.

Figura 1.1. Valores previstos para o modelo contra valores observados nas respostas.

Para que se possa afirmar que os resultados obtidos se ajustam a um modelo linear, os pontos devem apresentar distribuição aleatória no gráfico, bem como estar próximos da reta.

O programa Statistica também fornece os coeficientes da regressão, como pode ser observado na Figura 1.2.

EXPERIM. DESIGN		R ² =0.99876; MQresidual=0.001625 DV: UI				
Fator	Coef. Regres.	Erros Padrão	t(2)	p	-95.% Lim.Cnf.	+95.% Lim.Cnf.
Constante	1,727500	,014252	121,2094	,000068	1,666178	1,788822
(1)U	,550000	,014252	38,5906	,000671	,488678	,611322
(2)X	,137500	,014252	9,6476	,010574	,076178	,198822
(3)T	-,077500	,014252	-5,4378	,032195	-,138822	-,016178
(4)PH	,025000	,014252	1,7541	,221501	-,036322	,086322
(5)L	,005000	,014252	,3508	,759228	-,056322	,066322

Figura 1.2. Coeficientes da Regressão retornados pelo programa Statistica, onde $t(v)$: o valor para análise da distribuição t com v graus de liberdade; p : valor de α para cada fator. α máximo foi definido para esta análise como sendo 0,05, ou seja, o valor previsto ter 95% de probabilidade de estar no limite de confiança; 95%, Lim.Cnf.: valores mínimos e máximos esperados para cada fator ao Nível de Confiança de 95%.

O programa calcula os coeficientes da regressão utilizando a seguinte fórmula matricial, cuja resolução pode ser visualizada na Figura 1.3:

$$\text{Coef. Regress.} = (X'X)^{-1} X'y$$

onde

X: matriz do Planejamento acrescida da primeira coluna identidade;

X': matriz acima, transposta;

(X'X)⁻¹: matriz inversa do produto entre a matriz transposta e a matriz planejamento;

X'y: produto da matriz transposta pela matriz das respostas.

$$\begin{array}{l}
 X' = \begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \end{vmatrix} \quad X = \begin{array}{c|cccccc} \text{id.} & U & X & T & \text{pH} & L \\ \hline 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & -1 & 1 & -1 \end{array} \\
 \\
 X'X = \begin{vmatrix} 8 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 8 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 8 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 8 \end{vmatrix} \quad (X'X)^{-1} = \begin{vmatrix} 0,125 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,125 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,125 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,125 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0,125 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,125 \end{vmatrix} \\
 \\
 Y = \begin{vmatrix} 2,35 \\ 2,53 \\ 2,01 \\ 2,22 \\ 1,23 \\ 1,35 \\ 1,01 \\ 1,12 \end{vmatrix} \quad X'y = \begin{vmatrix} 13,82 \\ 4,4 \\ 1,1 \\ -0,62 \\ 0,2 \\ 0,04 \end{vmatrix} \quad (X'X)^{-1}X'y = \begin{vmatrix} 1,728 \\ 0,55 \\ 0,138 \\ -0,08 \\ 0,025 \\ 0,005 \end{vmatrix} \begin{array}{l} \text{const} \\ U \\ X \\ T \\ \text{pH} \\ L \end{array}
 \end{array}$$

Figura 1.3. Cálculo matricial dos coeficientes da regressão.

O programa calcula os erros padrão utilizando a seguinte fórmula matricial, cuja resolução pode ser visualizada na Figura 1.4:

$$\text{Erro Padrão} = \sqrt{(X'X)^{-1} s^2}$$

onde

(X'X)⁻¹: matriz inversa do produto entre a matriz transposta e a matriz planejamento;

s²: estimativa da variância que, neste caso, em que não há repetições, pode ser representada pela Média Quadrática Residual (MQresidual)

$$\begin{aligned}
 (X^t X)^{-1} &= \begin{vmatrix} 0,125 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,125 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,125 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,125 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0,125 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,125 \end{vmatrix} \\
 S^2 &= \begin{vmatrix} 0,001625 \\ 0,001625 \\ 0,001625 \\ 0,001625 \\ 0,001625 \\ 0,001625 \end{vmatrix} \quad (X^t X)^{-1} s^2 = \begin{vmatrix} 0,000203 \\ 0,000203 \\ 0,000203 \\ 0,000203 \\ 0,000203 \\ 0,000203 \end{vmatrix} \quad ((X^t X)^{-1} s^2)^{1/2} = \begin{vmatrix} 0,014252 \\ 0,014252 \\ 0,014252 \\ 0,014252 \\ 0,014252 \\ 0,014252 \end{vmatrix}
 \end{aligned}$$

Figura 1.4. Cálculo matricial dos erros padrão.

Para o cálculo dos valores de $t(v)$, multiplica-se o valor do Coeficiente de Regressão de um fator por seu respectivo Erro Padrão. O valor de $t(v)$ (v são os graus de liberdade do resíduo, neste caso, 2) deve ser maior (em valor absoluto) do que o valor tabelado para os graus de liberdade do resíduo e a área de probabilidade desejada (neste exemplo, 0,025, já que se deseja 95% de probabilidade de os resultados se encontrarem no intervalo de confiança). Logo, os valores de $t(2)$ devem ser maiores (absoluto) do que $t_{2,0,025}=4,303$ para que um fator possa ser considerado significativo ao nível de confiança de 95%. A tabela com os valores de t tabelados, para vários graus de liberdade v e áreas de probabilidade é apresentada na Figura 1.5.

A partir da análise efetuada, pode-se concluir que os fatores Umidade, Concentração do Inóculo e Temperatura têm efeito significativo no processo no campo estudado, dentro do nível de confiança de 95%; e que os resultados são melhores quando Umidade e Concentração do Inóculo estão em seus maiores níveis e quando a Temperatura está em seu menor nível, como pode ser observado na Figura 1.6.

v	Área de probabilidade									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	0.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	127.32	318.31	636.62
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.598
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.213	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.363	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.449	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.353	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587

Figura 1.5. Valores de t tabelados, para vários graus de liberdade v e áreas de probabilidade.

(95, % intervalo de confiança entre parênteses)

Figura 1.6. Previsão dos resultados variando-se T , X e U entre seus maiores e menores níveis.

1.3. Otimização de Variáveis

Para a otimização de variáveis, serão estudadas apenas as variáveis consideradas as mais importantes na fase de Triagem. Portanto, o exemplo estudará:

- U - Umidade inicial do substrato
- X - concentração do inóculo
- T - temperatura do processo

Para este tipo de estudo, é utilizado um Planejamento Fatorial Completo 2^3 (três fatores em dois níveis), mais um Planejamento Estrela (para a obtenção de um modelo quadrático) e um Ponto Central em triplicata, para a estimativa de erro.

Os níveis para cada um dos fatores são apresentados no Quadro 1.5.

Quadro 1.5. Valores dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados.

	variáveis	U (%)	X (esp/mL)	T (°C)
níveis	código			
estrela (-)	-1,6818	53,182	$1,59 \times 10^7$	21,636
menor	-	60	$5,0 \times 10^7$	23
central	0	70	$1,0 \times 10^8$	25
maior	+	80	$1,5 \times 10^8$	27
estrela (+)	+1,6818	86,818	$1,84 \times 10^8$	28,364

O valor codificado para o Planejamento Estrela é dado por:

$$\text{valor codificado} = \sqrt[k]{2^k}$$

onde k é o número de fatores.

Para se facilitar os experimentos, pode-se arredondar alguns valores alterando-se seu valor codificado, conforme apresentado no Quadro 1.6.

Quadro 1.6. Valores arredondados dos diferentes níveis para cada um dos fatores estudados.

	variáveis	U (%)	X (esp/mL)	T (°C)
níveis	código			
estrela (-)	-1,6818	53 (-1,7)	$1,59 \times 10^7$	22 (-1,5)
menor	-	60	$5,0 \times 10^7$	23
central	0	70	$1,0 \times 10^8$	25
maior	+	80	$1,5 \times 10^8$	27
estrela (+)	+1,6818	87 (+1,7)	$1,84 \times 10^8$	28 (+1,5)

O Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Ponto Central e Planejamento estrela, em valores codificados, fica como apresentado no Quadro 1.7, e em valores reais, no Quadro 1.8.

Quadro 1.7. Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Ponto Central e Planejamento estrela, em valores codificados.

	fator ensaio	U	X	T
Planejamento Fatorial Completo 2^3	1	+	+	+
	2	+	+	-
	3	+	-	+
	4	+	-	-
	5	-	+	+
	6	-	+	-
	7	-	-	+
	8	-	-	-
Ponto Central	9	0	0	0
	10	0	0	0
	11	0	0	0
Planejamento Estrela	12	-1,7	0	0
	13	+1,7	0	0
	14	0	-1,6818	0
	15	0	+1,6818	0
	16	0	0	-1,5
	17	0	0	+1,5

Quadro 1.8. Planejamento Fatorial Completo 2^3 com Ponto Central e Planejamento estrela, em valores reais.

	fator ensaio	U	X	T
Planejamento Fatorial Completo 2^3	1	80	$1,5 \times 10^8$	27
	2	80	$1,5 \times 10^8$	23
	3	80	$5,0 \times 10^7$	27
	4	80	$5,0 \times 10^7$	23
	5	60	$1,5 \times 10^8$	27
	6	60	$1,5 \times 10^8$	23
	7	60	$5,0 \times 10^7$	27
	8	60	$5,0 \times 10^7$	23
Ponto Central	9	70	$1,0 \times 10^8$	25
	10	70	$1,0 \times 10^8$	25
	11	70	$1,0 \times 10^8$	25
Planejamento Estrela	12	53	$1,0 \times 10^8$	25
	13	87	$1,0 \times 10^8$	25
	14	70	$1,59 \times 10^7$	25
	15	70	$1,84 \times 10^8$	25
	16	70	$1,0 \times 10^8$	22
	17	70	$1,0 \times 10^8$	28

As respostas obtidas para o exemplo são vistas no Quadro 1.9.

Quadro 1.9. Respostas do Planejamento Fatorial Completo 2^3 com ponto central e Planejamento Estrela.

fator ensaio	U	X	T	Respostas (UI)
1	+	+	+	2,50
2	+	+	-	2,42
3	+	-	+	2,38
4	+	-	-	2,30
5	-	+	+	2,40
6	-	+	-	2,35
7	-	-	+	2,25
8	-	-	-	2,18
9	0	0	0	2,54
10	0	0	0	2,48
11	0	0	0	2,52
12	-1,7	0	0	2,29
13	+1,7	0	0	2,45
14	0	-1,6818	0	2,25
15	0	+1,6818	0	2,50
16	0	0	-1,5	2,35
17	0	0	+1,5	2,42

Com o uso do programa Statistica, se obtém a representação gráfica dos valores previstos para um modelo linear contra os valores observados nas respostas, que pode ser vista na Figura 1.7.

Figura 1.7. Valores previstos para o modelo contra valores observados nas respostas.

Para que se possa afirmar que os resultados obtidos se ajustam a um modelo quadrático, os pontos devem apresentar distribuição aleatória no gráfico, bem como estar próximos da reta.

O programa Statistica também fornece os coeficientes da regressão, como pode ser observado na Figura 1.8.

Continue...		R2=0,98476; MQerro puro=0,000933 DV: UI				
Fator		Coef. Regres	Err. Pd Err. Puro	t(2)	p	-95,% Lim. Cnf. +95,% Lim. Cnf.
constante		2,514733	,017465	143,9888	,000048	2,439588 2,589878
(1)U	(L)	,050218	,008230	6,1019	,025822	,014807 ,085628
U	(Q)	-,051826	,008813	-5,8809	,027718	-,089743 -,013908
(2)X	(L)	,071792	,008267	8,6842	,013002	,036222 ,107361
X	(Q)	-,051225	,008974	-5,7084	,029344	-,089835 -,012615
(3)T	(L)	,030800	,008641	3,5644	,070488	-,006379 ,067979
T	(Q)	-,060538	,010747	-5,6329	,030100	-,106780 -,014297
interação U x X		-,010000	,010801	-,9258	,452277	-,056474 ,036474
interação U x T		,005000	,010801	,4629	,688915	-,041474 ,051474
interação X x T		-,002500	,010801	-,2315	,838485	-,048974 ,043974

Figura 1.8. Coeficientes da Regressão retornados pelo programa Statistica, onde $t(v)$: o valor para análise da distribuição t com v graus de liberdade; p : valor de α para cada fator. α máximo foi definido para esta análise como sendo 0,05, ou seja, o valor previsto ter 95% de probabilidade de estar no limite de confiança; 95%, Lim.Cnf.: valores mínimos e máximos esperados para cada fator ao Nível de Confiança de 95%.

O cálculo dos coeficientes da regressão é feito do mesmo modo anteriormente descrito no capítulo Triagem de Variáveis. O cálculo dos erros padrão é feito agora com o uso da variância estimada através das replicatas do ponto central, seguindo a seguinte fórmula:

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{v}$$

onde

s^2 é a variância;

y_i é cada valor do ponto central observado;

$\bar{y}$ é a média entre os valores dos pontos centrais;

v é o número de graus de liberdade.

Os erros embutidos no modelo para o intervalo de confiança de 95% são calculados multiplicando-se os erros padrão de cada coeficiente pelo valor apresentado na tabela dos pontos de probabilidade da distribuição t para 2 graus de liberdade, que é igual a 4,303 (Figura 1.5).

O modelo obtido através deste planejamento é feito tomando-se os coeficientes dos fatores considerados significativos (grifados em vermelho na Figura 1.8) e acrescentando os erros embutidos:

$$UI = 2.5147 + 0.0502U - 0.0518U^2 + 0.0718X - 0.0512X^2 - 0.0605T^2$$

± 0.0752 ± 0.0354 ± 0.0379 ± 0.0356 ± 0.0386 ± 0.0462

Este modelo, bem como o comportamento previsto para os experimentos efetuados dentro do campo estudado são representados pelas representações gráficas de superfícies de resposta expostas nas Figuras 1.9, 1.10 e 1.11.

Figura 1.9. Superfície de Resposta para concentração de inóculo (X) contra umidade (U), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI).

Figura 1.10. Superfície de Resposta para temperatura (T) contra umidade (U), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI).

Figura 1.11. Superfície de Resposta para concentração de inóculo (X) contra temperatura (T), em valores codificados, com resposta em unidade de atividade enzimática (UI).

Para se encontrar os pontos ótimos para os parâmetros, dentro do campo estudado, deve-se derivar a equação modelo encontrada em relação a cada um dos parâmetros e igualá-la a zero. Este cálculo foi feito usando o programa computacional Maple.

Para o parâmetro umidade (U), tem-se:

$$UI = 2.5147 + 0.0502U - 0.0518U^2 + 0.0718X - 0.0512X^2 - 0.0605T^2$$

$\pm 0.0752 \quad \pm 0.0354 \quad \pm 0.0379 \quad \pm 0.0356 \quad \pm 0.0386 \quad \pm 0.0462$

$$dU = 0.0502 - 0.1036U = 0$$

$$U = 0.4846$$

Este valor obtido está codificado. Para transformá-lo no valor ótimo real, segue-se a fórmula:

valor codificado = (valor real - valor central) / passo

$$U = (u - 70) / 10$$

$$u = 74.85\%$$

Para o parâmetro concentração do inóculo (X), tem-se:

$$UI = 2.5147 + 0.0502U - 0.0518U^2 + 0.0718X - 0.0512X^2 - 0.0605T^2$$

$\pm 0.0752 \quad \pm 0.0354 \quad \pm 0.0379 \quad \pm 0.0356 \quad \pm 0.0386 \quad \pm 0.0462$

$$dX = 0.0718 - 0.1024X = 0$$

$$X = 0.7012$$

Transformando de valor codificado para real:

$$X = (x - 1.0 \times 10^8) / 5.0 \times 10^7$$

$$x = 1.35 \times 10^8 \text{ esp} / \text{mL}$$

Para o parâmetro temperatura (T), tem-se:

$$UI = 2.5147 + 0.0502U - 0.0518U^2 + 0.0718X - 0.0512X^2 - 0.0605T^2$$

$\pm 0.0752 \quad \pm 0.0354 \quad \pm 0.0379 \quad \pm 0.0356 \quad \pm 0.0386 \quad \pm 0.0462$

$$dT = -0.1210T = 0$$

$$T = 0$$

Passando de valor codificado para real:

$$T = (t - 25) / 2$$

$$t = 25^\circ \text{C}$$

Para se calcular a máxima resposta esperada dentro do campo estudado, substituem-se os parâmetros por seus valores ótimos codificados:

$$UI = 2.5147 \pm 0.0752 + 0.0502 \pm 0.0354 U - 0.0518 \pm 0.0379 U^2 + 0.0718 \pm 0.0356 X - 0.0512 \pm 0.0386 X^2 - 0.0605 \pm 0.0462 T^2$$

$$UI_{\text{máximo}} = 2.5147 + 0.0502 \times 0.4846 - 0.0518 \times 0.4846^2 + 0.0718 \times 0.7012 - 0.0512 \times 0.7012^2 - 0.0605 \times 0^2$$

$$UI_{\text{máximo}} = 2.5520$$

A partir do planejamento proposto conclui-se que para se obter o máximo rendimento do processo, dentro do campo experimentado, deve-se utilizar os seguintes níveis para os parâmetros estudados:

- Umidade inicial do substrato: 74,85%
- Concentração do Inóculo: $1,35 \times 10^8$ esporos/mL
- Temperatura do processo: 25°C

A atividade enzimática prevista para estas condições é de 2,5520 UI.

Anexo 2. Planejamento de experimentos em valores codificados para o primeiro ensaio.

Ensaio	a_w	L(h/dia)	t(dias)	X (esp./g)	Aveia (%)
1	1	1	1	1	1
2	1	1	-1	1	-1
3	1	-1	1	-1	1
4	1	-1	-1	-1	-1
5	-1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	-1	1
7	-1	-1	1	1	-1
8	-1	-1	-1	1	1

Anexo 3. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o primeiro ensaio.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	Médias abs. subtraídas	Conc. (g/L)	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	1,0822	0,9547	0,1736	0,6977	1,262	13,957
	1,1963	0,9766				
2	1,1021	0,9104	0,1984	0,7917	1,432	15,877
	1,0716	0,8666				
3	1,1795	0,8779	0,3044	1,1939	2,159	23,877
	1,2010	0,8939				
4	1,5184	1,1127	0,3446	1,3466	2,435	26,998
	1,3369	1,0534				
5	1,4721	1,2097	0,2667	1,0510	1,901	9,588
	1,4460	1,1750				
6	1,2574	0,9924	0,2787	1,0966	1,983	9,974
	1,3147	1,0223				
7	1,0834	0,9531	0,1304	0,5300	0,958	4,832
	1,0853	0,9549				
8	1,8061	1,5621	0,3171	1,2421	2,246	11,296
	1,8064	1,4163				

Anexo 4. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o primeiro planeamento de experimentos.

ensaio	água adicionada ao substrato, mL	trigo, g	aveia, g	água usada na extração, mL	água presente no trigo, mL	água presente na aveia, mL	trigo seco, g	aveia seca, g	substrato seco, g	soma água, mL	U/mL	U/g subs.sec
1	80	19	1	100	3,2813	0,1338	15,7187	0,8662	16,5849	183,4151	1,262	13,957
2	80	20	0	100	3,454	0	16,546	0	16,546	183,454	1,432	15,877
3	80	19	1	100	3,2813	0,1338	15,7187	0,8662	16,5849	183,4151	2,159	23,877
4	80	20	0	100	3,454	0	16,546	0	16,546	183,454	2,435	26,998
5	60	40	0	100	6,908	0	33,092	0	33,092	166,908	1,901	9,588
6	60	38	2	100	6,5626	0,2676	31,4374	1,7324	33,1698	166,8302	1,983	9,974
7	60	40	0	100	6,908	0	33,092	0	33,092	166,908	0,958	4,832
8	60	38	2	100	6,5626	0,2676	31,4374	1,7324	33,1698	166,8302	2,246	11,296

Anexo 5. Planejamento de experimentos em valores codificados para o segundo ensaio.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)	t (dias)
1	1	1	1	1	1
2	1	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	-1	1	-1
5	-1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1	-1
7	-1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	1

Anexo 6. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o segundo ensaio.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	médias abs. subtraídas	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	1,6242	1,4119	0,0995	0,7533	8,033912
	1,4420	1,4553			
2	1,4648	1,3804	0,00695	0,1182	1,262882
	1,3561	1,4266			
3	1,5740	1,4827	0,0312	0,2846	3,035485
	1,5497	1,5786			
4	1,7161	1,4581	0,2709	1,9294	20,61175
	1,6496	1,3658			
5	1,4218	1,3941	0,1351	0,9976	4,607453
	1,4975	1,2550			
6	1,4879	1,4149	0,0359	0,3169	1,469380
	1,4459	1,4471			
7	1,6045	1,1761	0,2706	1,9273	8,901849
	1,4494	1,3366			
8	1,4062	1,0012	0,2048	1,4758	6,843791
	1,3265	1,3219			

Anexo 7. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o segundo planejamento de experimentos.

ensaio	água adicionada ao substrato (mL)	massa de trigo (g)	massa de aveia (g)	água presente no trigo (mL)	água presente na aveia (mL)	água do inóculo (mL)	água total (mL)	massa de trigo seco (g)	massa de aveia seca (g)	substrato seco (g)	U/mL	U/g _{subst.seco}
1	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,8551	16,2919	0,85301	17,14491	0,7533	8,033912
2	69,300	20,7	0	3,5811	0	10	182,8811	17,1189	0	17,1189	0,1182	1,262882
3	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,8551	16,2919	0,85301	17,14491	0,2846	3,035485
4	69,300	20,7	0	3,5811	0	10	182,8811	17,1189	0	17,1189	1,9294	20,61175
5	47,055	40,9	2,045	7,0757	0,27403	10	164,4047	33,8243	1,77097	35,59527	0,9976	4,607453
6	47,100	42,9	0	7,4217	0	10	164,5217	35,4783	0	35,4783	0,3169	1,46938
7	47,055	40,9	2,045	7,0757	0,27403	10	164,4047	33,8243	1,77097	35,59527	1,9273	8,901849
8	47,100	42,9	0	7,4217	0	10	164,5217	35,4783	0	35,4783	1,4758	6,843791

Anexo 8. Planejamento de experimentos em valores codificados para o terceiro ensaio.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)
1	1	1	1	1
2	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1
4	1	-1	-1	1
5	-1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1

Anexo 9. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o terceiro ensaio.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	médias abs. subtraídas	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	0,056 0,062	0,034 0,043	0,021	0,2112	2,2521
2	0,064 0,064	0,044 0,041	0,022	0,2180	2,3292
3	0,060 0,067	0,043 0,042	0,021	0,2146	2,2887
4	0,062 0,054	0,029 0,055	0,016	0,1803	1,9260
5	0,052 0,052	0,030 0,027	0,024	0,2318	1,0704
6	0,068 0,060	0,042 0,040	0,023	0,2283	1,0588
7	0,085 0,077	0,058 0,058	0,023	0,2283	1,0545
8	0,088 0,082	0,055 0,056	0,023	0,2729	1,2656

Anexo 10. Transformação da unidade de atividade de extrato por grama de substrato seco para o terceiro planejamento de experimentos.

ensaio	água adicionada ao substrato (mL)	massa de trigo (g)	massa de aveia (g)	água presente no trigo (mL)	água presente na aveia (mL)	água do inóculo (mL)	água total (mL)	massa de trigo seco (g)	massa de aveia seca (g)	substrato seco (g)	U/mL	U/g _{substrato seco}
1	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,8551	16,2919	0,85301	17,14491	0,2112	2,252130
2	69,300	20,7	0	3,5811	0	10	182,8811	17,1189	0	17,1189	0,2180	2,329176
3	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,8551	16,2919	0,85301	17,14491	0,2146	2,288721
4	69,300	20,7	0	3,5811	0	10	182,8811	17,1189	0	17,1189	0,1803	1,926007
5	47,055	40,9	2,045	7,0757	0,27403	10	164,4047	33,8243	1,77097	35,59527	0,2317	1,070389
6	47,100	42,9	0	7,4217	0	10	164,5217	35,4783	0	35,4783	0,2283	1,058772
7	47,055	40,9	2,045	7,0757	0,27403	10	164,4047	33,8243	1,77097	35,59527	0,2283	1,054543
8	47,100	42,9	0	7,4217	0	10	164,5217	35,4783	0	35,4783	0,2729	1,265599

Anexo 11. Planejamento de experimentos em valores codificados para o primeiro ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)
1	1	1	1	1
2	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1
4	1	-1	-1	1
5	-1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1

Anexo 12. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o primeiro ensaio em bolsa.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	médias abs. subtraídas	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	0,499	0,405	0,097	0,7327	16,7017
	0,495	0,396			
2	0,617	0,564	0,058	0,4651	10,6681
	0,647	0,585			
3	0,585	0,51	0,081	0,6229	14,1991
	0,595	0,509			
4	0,665	0,603	0,064	0,5063	11,6125
	0,661	0,596			
5	1,074	1,022	0,060	0,4822	5,1331
	1,087	1,019			
6	1,055	1,047	0,038	0,3278	3,4965
	1,066	0,999			
7	1,227	1,209	0,036	0,3176	3,3801
	1,237	1,183			
8	1,197	1,22	0,004	0,0945	1,0083
	1,172	1,142			

Anexo 13. Transformação da unidade de atividade de enzima de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o primeiro planejamento de experimentos em bolsa.

ensaio	água adicionada ao substrato (mL)	massa de trigo (g)	massa de aveia (g)	água presente no trigo (mL)	água presente na aveia (mL)	água do inóculo (mL)	água total (mL)	massa de trigo seco (g)	massa de aveia seca (g)	substrato seco (g)	U/mL	U/g _{substrato seco}
1	79,880	9,2	0,920	1,5916	0,12328	10	191,59488	7,6084	0,79672	8,40512	0,7327	16,701738
2	79,920	9,6	0,480	1,6608	0,06432	10	191,64512	7,9392	0,41568	8,35488	0,4651	10,668065
3	79,880	9,2	0,920	1,5916	0,12328	10	191,59488	7,6084	0,79672	8,40512	0,6229	14,199084
4	79,920	9,6	0,480	1,6608	0,06432	10	191,64512	7,9392	0,41568	8,35488	0,5063	11,612451
5	69,320	18,8	1,880	3,2524	0,25192	10	182,82432	15,5476	1,62808	17,17568	0,4822	5,133089
6	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,85509	16,2919	0,85301	17,14491	0,3278	3,496540
7	69,320	18,8	1,880	3,2524	0,25192	10	182,82432	15,5476	1,62808	17,17568	0,3176	3,380129
8	69,315	19,7	0,985	3,4081	0,13199	10	182,85509	16,2919	0,85301	17,14491	0,0945	1,008304

Anexo 14. Planejamento de experimentos em valores codificados para o segundo ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	X(esp/g)	Aveia (%)	L(h/dia)
1	1	1	1	1
2	1	1	-1	-1
3	1	-1	1	-1
4	1	-1	-1	1
5	-1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1

Anexo 15. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o segundo ensaio em bolsa.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	médias abs. subtraídas	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	0,164 0,160	0,096 0,100	0,064	0,5097	9,6802
2	0,109 0,111	0,054 0,057	0,055	0,4445	8,4458
3	0,325 0,325	0,271 0,278	0,051	0,4170	7,9208
4	0,203 0,204	0,140 0,141	0,063	0,5028	9,5541
5	0,191 0,189	0,137 0,140	0,052	0,4239	3,8154
6	0,339 0,337	0,298 0,301	0,039	0,3347	3,0124
7	0,457 0,466	0,419 0,414	0,045	0,3793	3,4140
8	0,517 0,520	0,470 0,465	0,051	0,4205	3,7844

Anexo 16. Transformação da unidade de atividade de mililitro de extrato por grama de substrato seco para o segundo planejamento de experimentos em bolsa.

ensaio	água adicionada ao substrato (mL)	massa de massa de trigo (g)	aveia (g)	água presente no trigo (mL)	água presente na aveia (mL)	água do inóculo (mL)	água total (mL)	massa de trigo seco (g)	massa de aveia seca (g)	substrato seco (g)	U/mL	U/g _{substrato seco}
1	77,960	11,0	1,095	1,8944	0,1467	10	190,0011	9,0557	0,9483	10,0039	0,5097	9,680227
2	77,940	11,5	0,575	1,9878	0,0770	10	190,0048	9,5022	0,4975	9,9997	0,4445	8,445829
3	77,960	11,0	1,095	1,8944	0,1467	10	190,0011	9,0557	0,9483	10,0039	0,4170	7,920844
4	77,940	11,5	0,575	1,9878	0,0770	10	190,0048	9,5022	0,4975	9,9997	0,5028	9,554072
5	65,920	21,9	2,189	3,7870	0,2933	10	180,0003	18,1030	1,8957	19,9987	0,4239	3,815438
6	65,870	23,0	1,149	3,9755	0,1540	10	179,9995	19,0045	0,9950	19,9995	0,3347	3,012417
7	65,920	21,9	2,189	3,7870	0,2933	10	180,0003	18,1030	1,8957	19,9987	0,3793	3,413994
8	65,870	23,0	1,149	3,9755	0,1540	10	179,9995	19,0045	0,9950	19,9995	0,4205	3,784392

Anexo 17. Planejamento de experimentos em valores codificados para o terceiro ensaio em bolsa.

Ensaio	a_w	m (g)
1	1	1
2	1	1
3	1	-1
4	1	-1
5	-1	1
6	-1	1
7	-1	-1
8	-1	-1

Anexo 18. Respostas obtidas a partir do Planejamento proposto para o terceiro ensaio em bolsa.

Ensaio	Abs. reação (duplicata)	Abs. brancos (duplicata)	médias abs. subtraídas	U/mL	U/g _{subs.seco}
1	0,164	0,096	0,064	0,5097	9,6802
	0,160	0,100			
2	0,109	0,054	0,055	0,4445	8,4458
	0,111	0,057			
3	0,325	0,271	0,051	0,4170	7,9208
	0,325	0,278			
4	0,203	0,140	0,063	0,5028	9,5541
	0,204	0,141			
5	0,191	0,137	0,052	0,4239	3,8154
	0,189	0,140			
6	0,339	0,298	0,039	0,3347	3,0124
	0,337	0,301			
7	0,457	0,419	0,045	0,3793	3,4140
	0,466	0,414			
8	0,517	0,470	0,051	0,4205	3,7844
	0,520	0,465			

Anexo 19. Transformação da unidade de atividade de extrato por grama de substrato seco para o terceiro planejamento de experimentos em bolsa.

ensaio	água adicionada ao substrato (mL)	massa de trigo (g)	massa de aveia (g)	água presente no trigo (mL)	água presente na aveia (mL)	água do inóculo (mL)	água total (mL)	massa de trigo seco (g)	massa de aveia seca (g)	substrato seco (g)	U/mL	U/g _{subst.seco}
1	143,81	34,47	1,724	5,9635	0,2310	20	370,00	28,5074	1,4926	30,00	0,5028	6,201040
2	143,81	34,47	1,724	5,9635	0,2310	20	370,00	28,5074	1,4926	30,00	0,4479	5,524019
3	71,90	17,24	0,862	2,9817	0,1155	10	185,00	14,2537	0,7463	15,00	0,4548	5,608648
4	71,90	17,24	0,862	2,9817	0,1155	10	185,00	14,2537	0,7463	15,00	0,4650	5,735589
5	131,74	45,96	2,298	7,9513	0,3079	20	360,00	38,0099	1,9901	40,00	0,4410	3,969286
6	131,74	45,96	2,298	7,9513	0,3079	20	360,00	38,0099	1,9901	40,00	0,4033	3,629632
7	65,87	22,98	1,149	3,9756	0,1540	10	180,00	19,0049	0,9951	20,00	0,5302	4,772105
8	65,87	22,98	1,149	3,9756	0,1540	10	180,00	19,0049	0,9951	20,00	0,5234	4,710350