

**DESENVOLVIMENTO DE ÁREA ALAGADA CONSTRUÍDA (JARDIM FILTRANTE)
PARA TRATAMENTO DE EFLUENTE DA PRODUÇÃO AQUÍCOLA**

M. F. dos S. Brandão^{1,*}, W. T. L. da Silva².

¹ Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís - km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo

² Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, nº 1.452, CEP: 13560-970, São Carlos, São Paulo

* Autor correspondente, e-mail: maynaferraz@live.com

Resumo: O crescente aumento por proteína animal no Brasil, impulsionou o crescimento de práticas como a piscicultura. Esta atividade utiliza-se de uma alta gama de tecnologias para maximizar a produção, sendo que algumas destas tecnologias podem causar impactos ambientais nocivos à biodiversidade aquática. Com o objetivo de minimizar estes impactos, o presente trabalho propôs um sistema piloto para tratamento de efluente da piscicultura e reuso na própria atividade, reduzindo a quantidade de água utilizada. Os primeiros resultados deste sistema piloto, ainda sem a presença das plantas, indicam boa eficiência em filtragem reduzindo a quantidade de turbidez e de algas no efluente, mas ainda baixa remoção de sais dissolvidos na água.

Palavras-chave: Aquicultura em tanque escavado, Área alagada construída, Tratamento de efluente, Reuso da água.

**DEVELOPMENT OF CONSTRUCTED WETLAND (FILTERING GARDEN) FOR THE
EFFLUENT TREATMENT IN AQUICULTURE**

Abstract: The growing increase in animal protein in Brazil has driven the growth of practices such as fish farming. This activity uses a high range of technologies to maximize production, and some of these technologies can cause harmful environmental impacts to aquatic biodiversity. In order to minimize these impacts, the present work proposed a pilot system for the treatment of fish farming effluent and reuse in the activity itself, reducing the amount of water used. The first results of this pilot system, even without the presence of plants, indicate good filtering efficiency reducing the amount of turbidity and algae in the effluent, but still low removal of dissolved salts in the water.

Keywords: Excavated tank aquaculture, Constructed wetland, Effluent treatment, Water reuse

1. Introdução

A demanda por proteína animal vem aumentando expressivamente no Brasil e no mundo, substituindo parte da alimentação de proteínas vegetais (SIDONIO et al., 2012), onde para suprir esta demanda, práticas como aquicultura (produção comercial de pescado) têm-se expandido.

Em decorrência da adição de insumo para a maximização da produção, a aquicultura apresenta impactos ambientais dentre elas a alteração da biodiversidade, introdução de nutrientes na água, introdução de compostos farmacológicos para tratamento de parasitas e infecções (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2008).

Com o intuito de minimizar os problemas elencados será utilizado o sistema do tipo “Wetland”, também conhecidos como “Jardim Filtrante”, onde a água a ser tratada passa através de um leito de areia e brita, onde são plantadas macrófitas aquáticas (ZHI & JI, 2012).

Segundo Trein *et al.* (2015) os “Wetlands” construídos são sistemas concebidos e construídos para utilizar os processos naturais, que envolvem a vegetação, material filtrante e microorganismos, para auxiliar no tratamento de águas residuárias, onde a combinação de processos físicos, químicos e biológicos promovem a depuração de águas residuárias (Vymazal & Kropfelová,

2008). Este trabalho tem o objetivo de avaliar o uso da tecnologia “Jardim Filtrante” na remoção de sólidos suspensos, algas e outros contaminantes, visando tratamento e reuso da água no próprio sistema produtivo.

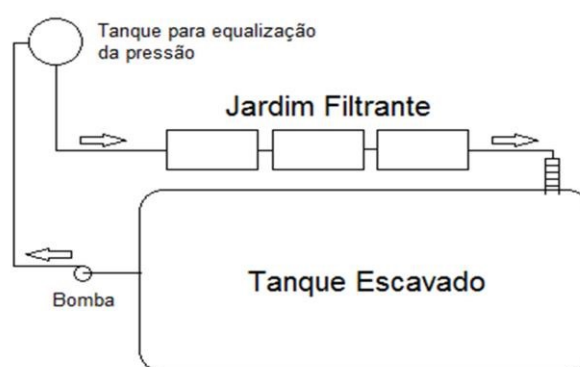
2. Materiais e Métodos

2.1. Descrição do sistema piloto

O sistema piloto, do tipo área alagada construída (“Wetland”) para tratamento de efluente oriundo do tanque de piscicultura foi instalado no Sítio São João, uma pequena propriedade rural familiar, localizada no município de São Carlos/SP (22°09’16.1”S 47°50’49.0”W), o qual possui um tanque escavado de volume aproximado de 600 m³ (Figura 1a). A propriedade faz parte da Bacia do Ribeirão Feijão, que é o principal manancial de abastecimento do município de São Carlos (SAAE, 2019).



(a)



(b)

Figura 1. (a) Imagem de satélite da propriedade Sítio São João: A- Sistema piloto e B- tanque escavado cujo efluente será tratado (fonte: Google Maps). (b) Croqui do sistema piloto.

O sistema piloto foi idealizado com o princípio de possibilitar tratamento do efluente e reuso no próprio tanque de piscicultura, promovendo uma ciclagem da água e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de água utilizada.

A partir da bomba existente no tanque de piscicultura o efluente é transportado para o tanque de equalização da pressão. Por gravidade, o efluente irá para o sistema piloto composto pelas 3 caixas de madeira (2,4 m³ cada, aproximadamente) preenchidas com argila expandida, onde ao final da terceira caixa o efluente passará por uma escada de aeração, retornando ao tanque de piscicultura (Figura 1b). O volume útil de cada caixa é de 0,96 m³. A coleta de amostra será realizada nos 4 pontos indicados, sendo eles: antes da caixa 1 (P1); entre as caixas 1 e 2 (P2); entre as caixas 2 e 3 (P3) e após a caixa 3 (P4), conforme mostrado na Figura 2.

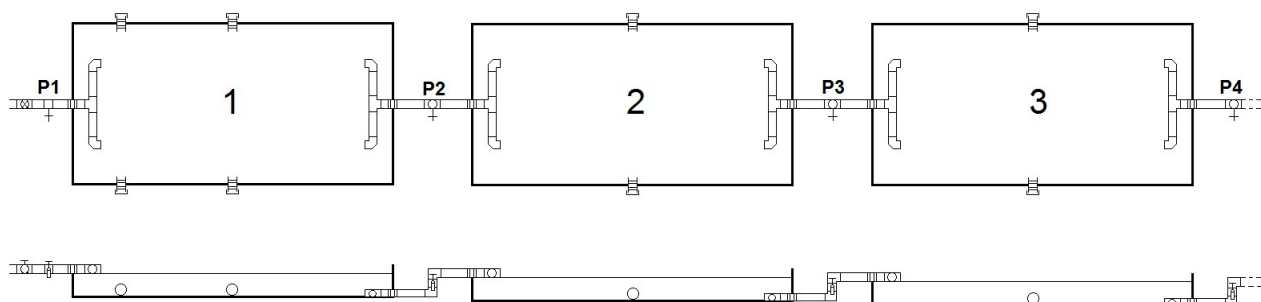


Figura 2. Disposição dos tanques sobre o solo e pontos de coletas. Na imagem, P1, P2, P3 e P4, correspondes aos pontos de amostragem P1 a P4, respectivamente.

2.2 Metodologia de coleta e análises

A coleta das amostras foi realizada em triplicata para cada ponto, em frascos âmbar de 1L revestidos externamente com papel alumínio e refrigerado após a coleta. Antes da coleta, as torneiras relativas a cada ponto, eram abertas por aproximadamente 30 segundos, para assegurar representatividade na coleta.

Nos laboratórios da Embrapa Instrumentação, foram realizadas as análises referentes à turbidez utilizando o Microprocessador portátil Turbidímetro (HI 93703) da marca Hanna Instruments, espectroscopia UV/VIS utilizado o Espectrofotômetro (UV-1601PC) da marca Shimadzu; condutividade elétrica utilizado o condutivímetro digital de bancada (CG2000) da marca Gehaka com constante célula $K=1$ e solução padrão KCl $0,01 \text{ Mol L}^{-1}$ ($1317 \mu\text{S cm}^{-1}$) e pH utilizado o pHmetro de bancada (pHB-500) da marca IonLab. Para a turbidez, os frascos foram agitados antes da análise. Para as demais análises, as amostras foram deixadas em repouso para precipitação dos sólidos sedimentáveis. Todas as análises ocorreram sem a necessidade de diluição das amostras. Para análise de UV/Vis, fez-se varredura de 800 a 400 nm.

3. Resultados e Discussão

As amostras foram retiradas do sistema piloto após 30 dias de funcionamento do mesmo, onde a partir das análises realizadas obtivemos os dados mostrados na Tabela 1 para os parâmetros da condutividade elétrica, pH e turbidez.

Tabela 1. Dados amostrais dos parâmetros de condutividade elétrica, pH e turbidez.

| Pontos amostrais | Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) | pH | Turbidez (FTU) |
|------------------|--|-----|----------------|
| P1 | $35,3 \pm 0,2$ | 6,7 | $47,7 \pm 2,1$ |
| P2 | $41,4 \pm 0,7$ | 6,5 | $38,8 \pm 2,8$ |
| P3 | $41,5 \pm 0,3$ | 6,5 | $22,1 \pm 4,3$ |
| P4 | $40,4 \pm 0,2$ | 6,5 | $13,2 \pm 1,3$ |

No Brasil não há legislação que defina valor limite aceitável para a condutividade elétrica da água, mas de acordo com estudos de Gasparotto (2011) as amostras contaminadas por esgotos apresentam o valor para a condutividade elétrica variando entre 100 a $10.000 \mu\text{S cm}^{-1}$. Seguindo esta afirmação, valores inferiores de condutividade podem indicar uma boa qualidade da água. As análises referentes à condutividade indicam que as amostras apresentam valores médios variando de 35,3 a $41,5 \mu\text{S}$, como mostra a Tabela 1, podendo ser classificadas como efluentes com uma boa qualidade frente a este parâmetro. Para este parâmetro, os resultados mostraram que sem as plantas não foi possível a retirada de sais do efluente.

Segundo a Resolução nº 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 2005 o valor permitido para o pH de águas doces pode variar de 6,0 a 9,0 e esta variação permite a manutenção adequada para a vida aquática (GASPAROTTO, 2011). O valor médio encontrado para o pH, mostrado da Tabela 1, enquadra-se nos valores permitidos pela legislação e indica que o efluente apresenta boa qualidade em relação a este parâmetro.

Os valores de turbidez, apresentados na Tabela 1, apresentaram uma alteração expressiva nos valores variando de $47,7 \pm 2,1$ FTU no P1 até $13,2 \pm 1,3$ FTU no P4 sendo uma redução de 72% da turbidez. Este fato relaciona-se com a presença da argila expandida no sistema piloto, que se infere que tenha realizado o processo de filtragem e sorção das microalgas presentes no efluente da piscicultura. Vale destacar que no momento da coleta das amostras não havia sido plantado as macrófitas.

A análise do UV/Vis seguiu a metodologia utilizada por Couceiro *et. al* (2016) sendo observado o comprimento de onda de absorção da clorofila, Figura 3a. Os valores médios e desvio padrão da intensidade das bandas em cada ponto podem ser visualizados na Figura 3b.

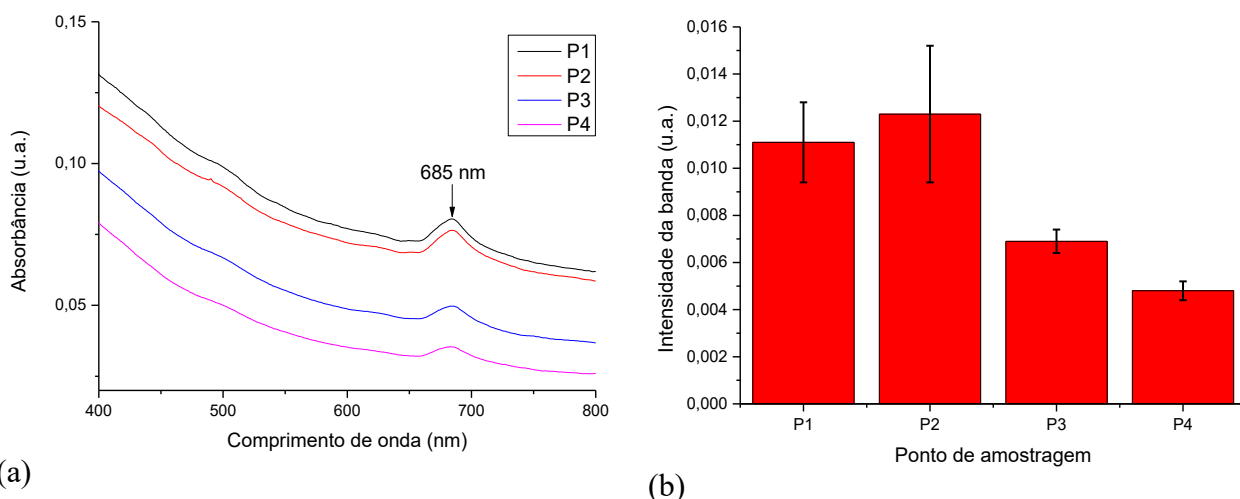


Figura 3. (a) Trecho do comprimento da onda correspondendo a faixa de absorção da clorofila e (b) intensidade da absorbância banda (685 nm) em cada ponto amostrado.

O comprimento de 685 nm corresponde a faixa de absorbância da clorofila, sendo possível visualizar que no P1, P2, P3 e P4 há presença de algas mas ocorre uma redução da absorção nos pontos respectivamente, podendo este fato ser relacionado com a redução expressiva da turbidez no P3 e P4. Os P1 e P2 não apresentam diferença significativa entre eles, fato a ser melhor investigado.

4. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos, as conclusões preliminares do presente trabalho são que há eficiência na redução de algas pela ação de filtragem da argila expandida presente no sistema, sendo esta afirmação sustentada pelos valores obtidos de turbidez em cada ponto amostrado, bem como com aproximadamente 72%, de redução da intensidade de absorbância da clorofila. Observou-se também, por outros parâmetros de qualidade da água (pH e CE) se mantém pelo sistema piloto, haja visto que não apresentaram alterações significativas. O efluente tratado, apresentou qualidade superior em comparação ao efluente bruto, entretanto, ainda se tornam necessárias outras análises de qualidade de água, bem como o efeito da futura adição de macrófitas aquáticas ao sistema.

Agradecimentos

Autores agradecem ao BNDES e EMBRAPA pelo financiamento do projeto (BRS-Aqua / SEG 21.17.02.001.05.02.07).

Referências

- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (CONAMA). (2005) Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de março. p. 58-63.
- COUCEIRO, G. C.; BUSTAMANTE, Y. B.; CARVALHO, J. A.; ¹, TEIXEIRA, D. P.; DOS SANTOS, P. M.; JUNIOR, M. B.; SIMIONI, A. R. Extração e quantificação das clorofilas A e B nas folhas da *Xanthosoma Sagittifolium*. XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência. Vale do Paraíba, 2016.
- GASPAROTTO, F. A. Avaliação Ecotoxicológica e Microbiológica da água de nascentes urbanas no município de Piracicaba-SP. Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 90. 2011.
- HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso. Boletim do Instituto de Pesca, v. 34, n.1, p. 163 - 173, 2008, São Paulo.
- SAAE, Serviço Autônomo de Água e Esgoto. Mananciais. Disponível em: <https://www.saaesaocarlos.com.br/saaesc/index.php/agua/mananciais>. Acesso em: jul. de 2019.

- SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; JÚNIOR, A. J. A.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. BNDES Setorial, n. 35, p 421-463, 2012.
- TREIN, C. M.; PELISSARI, C.; HOFFMANN, H.; PLATZER, C. J.; SEZERINO, P. H. Tratamento descentralizado de esgotos de empreendimentos comercial e residencial empregando a ecotecnologia dos wetlands construídos. Ambiente Construído, Porto Alegre, v. 15, n. 4, p. 351-367, 2015.
- VYMAZAL, J.; KROPFELOVÁ, L. Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow. Republica Tcheca: Springer, 2008.
- ZHI, W.; JI, G. Constructed wetlands, 1991 – 2011: A review of research development, current trends, and future directions. Science of the Total Environment, v. 441, p. 19– 27, 2012.

**USO DA PROTEÍNA DE SOJA NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR NO CONTEXTO DE UMA BIORREFINARIA INTEGRADA: ANÁLISE
TECNO-ECONÔMICA DO PROCESSO**

M. G. Brondi^{1,*}, A. M. Elias¹, F. F. Furlan¹, R. C. Giordano¹, C. S. Farinas²

¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

² Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

* Autor correspondente, e-mail: mariana.brondi@gmail.com

Resumo: A conversão bioquímica de biomassas lignocelulósicas em biocombustíveis e outros bioprodutos ainda apresenta alguns desafios tecnológicos como, por exemplo, o baixo rendimento da etapa de hidrólise enzimática e o alto custo das enzimas celulolíticas. Nesse contexto, o uso de aditivos durante a sacarificação tem apresentado efeitos positivos na redução da adsorção improdutiva de celulasas pela lignina, contribuindo, assim, para o aumento da conversão da celulose em açúcares fermentescíveis. Todavia, para se buscar a viabilidade tecno-econômica do processo, se faz necessário o uso de aditivos de baixo custo. Assim, este estudo avaliou impacto tecno-econômico do uso da proteína de soja como aditivo de baixo custo durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico no contexto de uma biorrefinaria integrada produzindo etanol de primeira e segunda geração (1G-2G), utilizando como ferramenta a Análise Tecno-Econômica Reversa. Tal análise possibilitou a obtenção de metas de desempenho a serem atingidas experimentalmente de modo a viabilizar o uso do aditivo no contexto da biorrefinaria, sendo estas: o aumento da conversão proporcionada pela proteína durante a sacarificação e a redução da carga enzimática utilizada no processo.

Palavras-chave: Proteína de Soja, Bagaço de Cana-de-Açúcar, Hidrólise Enzimática, Análise Tecno-Econômica, Adsorção Improdutiva.

**USE OF SOYBEAN PROTEIN AT SUGARCANE BAGASSE SACCHARIFICATION IN THE
CONTEXT OF AN INTEGRATED BIOREFINERY: PROCESS TECHNO-ECONOMIC
ANALYSIS**

Abstract: The biochemical conversion of lignocellulosic biomass into biofuels and other bioproducts still have some technological bottlenecks, such as the low yield of the hydrolysis step and the high cost of the cellulolytic enzymes. In this context, the use of additives during the saccharification has presented positive effects on reducing the unproductive binding of cellulases onto lignin, increasing, then, the cellulose conversion into fermentable sugars. However, in order to ensure the process techno-economic feasibility, it is necessary to use low-cost additives. Thus, this study evaluated the techno-economic impact of the use of soybean protein as a low-cost additive during the enzymatic hydrolysis of hydrothermally pre-treated sugarcane bagasse in the context of an integrated biorefinery that produces first and second-generation ethanol (1G-2G), using as a tool the Reverse Techno-Economic Analysis. This analysis allowed the definition of some performance targets to be reached experimentally in order to make the use of the additive economically feasible at the biorefinery context. The obtained targets were: increase the conversion provided by the protein during the saccharification and reduce the enzyme dosage used at the process.

Keywords: Soybean Protein, Sugarcane Bagasse, Enzymatic Hydrolysis, Techno-Economic Analysis, Unproductive Binding.

1. Introdução

A bioconversão de biomassas lignocelulósicas em biocombustíveis como, por exemplo, o etanol celulósico (2G) é uma importante alternativa para reduzir a dependência e os impactos ambientais do uso de combustíveis fósseis. No entanto, de modo a viabilizar a produção do etanol 2G, alguns desafios tecnológicos, tais como o baixo rendimento da sacarificação enzimática e o alto custo das enzimas celulolíticas, ainda precisam ser superados (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012; SILVA et al., 2018). Um dos fatores que contribuem para a redução do rendimento da hidrólise é a adsorção improdutiva de celulasas pela lignina (KO et al., 2015, SAINI et al., 2016). De modo a minimizar este efeito negativo, o uso de aditivos que mitigam a adsorção improdutiva tem apresentado resultados interessantes (BRONDI et al., 2019; ROCHA-MARTÍN et al., 2017), no entanto, o uso de aditivos de baixo custo e a análise tecno-econômica da adição destes no processo de produção do etanol 2G se faz necessária de modo a se tentar viabilizar economicamente o processo.

Nesse contexto, o uso da proteína de soja como aditivo se destaca devido ao seu baixo custo (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012) e em razão dos resultados positivos já reportados na literatura, onde, por exemplo, Florencio et al. (2019) aumentaram em 76% a glicose liberada durante a hidrólise do bagaço de cana hidrotérmico utilizando o coquetel enzimático Cellic CTec2[®]. No entanto, é de grande importância que se avalie o impacto tecno-econômico da adição da proteína de soja durante a sacarificação enzimática para a produção do etanol celulósico.

Uma alternativa interessante para se realizar a análise tecno-econômica do processo foi desenvolvida por Furlan et al. (2016) e recentemente aplicada por Longati et al. (2018) no contexto de uma biorrefinaria integrada que produz etanol de primeira e segunda-geração (1G-2G). Denominada Análise Tecno-Econômica Reversa, ela consiste em, ao invés de avaliar a viabilidade econômica de uma condição de processo específica, especifica-se um desempenho econômico mínimo para o processo (por exemplo, Valor Presente Líquido (VPL) = 0) e então janelas de condições de operação viáveis são obtidas e podem ser utilizadas na definição de metas de desempenho a serem buscadas experimentalmente para as principais variáveis de processo (FURLAN et al., 2016; LONGATI et al., 2018).

Assim, utilizando a Análise Tecno-Econômica Reversa, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da adição da proteína de soja durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico no contexto de uma biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G. Com esta análise, foram obtidas metas de desempenho a serem atingidas experimentalmente de modo a viabilizar economicamente o uso da proteína de soja na produção do etanol de segunda geração.

2. Materiais e Métodos

2.1. Análise Tecno-Econômica

A análise tecno-econômica da adição da proteína de soja no processo de produção do etanol de segunda geração foi realizada baseando-se na simulação da biorrefinaria integrada de etanol 1G-2G desenvolvida por Longati et al. (2018) no simulador de processos EMSO (SOARES e SECCHI, 2003). A biomassa utilizada foi o bagaço de cana-de-açúcar submetido a um pré-tratamento hidrotérmico antes da etapa de hidrólise. Informações sobre o desenvolvimento da análise, a implementação da biorrefinaria e as premissas econômicas adotadas podem ser obtidas em Furlan et al. (2016) e Longati et al. (2018). Com base nessa simulação, adicionou-se uma corrente extra de proteína de soja já a 50 °C, a qual foi misturada com a corrente de bagaço pré-tratado e enzimas na entrada do reator de hidrólise. O tempo de sacarificação foi fixado em 24 horas e após o processo, a proteína juntamente com o bagaço não hidrolisado seguiram para as caldeiras da biorrefinaria, onde houve a queima deste material e a subsequente geração de energia elétrica para a indústria.

A Análise Tecno-Econômica Reversa foi utilizada para determinar e avaliar as metas de desempenho necessárias para tornar o uso da proteína de soja no contexto da biorrefinaria economicamente viável. Para tanto, o índice econômico adotado foi o Valor Presente Líquido (VPL) do processo igual a zero, avaliando-se o efeito das variáveis carga de sólidos, carga

enzimática, conversão da celulose e concentração de proteína de soja para manter essa performance econômica adotada.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as curvas isoeconômicas (regiões de performance econômica constante, onde o VPL do processo é zero) onde pode-se avaliar o efeito das variáveis carga enzimática, carga de sólidos e concentração de proteína de soja, na mínima conversão da celulose presente no bagaço necessária para que o processo passe a ser economicamente viável. Assim, para uma carga de bagaço de 15%, 14,4 FPU/g celulose (aproximadamente 7,5 FPU/g bagaço) e 12% de proteína de soja (PS), a sacarificação deve apresentar uma conversão mínima da celulose de 80% para que se tenha a viabilidade econômica do processo (VPL = 0), ou seja, nestas condições, conversões maiores que 80% implicam em viabilidade..

Florencio et al. (2019), realizando a hidrólise com 15% sólidos, 12% PS, durante 24 h com uma carga enzimática de 10 FPU/g bagaço e obtiveram 32% de conversão da celulose presente no material lignocelulósico. Assim, comparando os dados experimentais reportados com o que se obteve na simulação, definem-se algumas metas de desempenho a serem atingidas experimentalmente, de modo a viabilizar a produção do etanol 2G utilizando a proteína de soja como aditivo para mitigar a adsorção improdutivo de celulasas durante a etapa de sacarificação enzimática, sendo estas: o aumento da conversão da celulose em açúcares durante a hidrólise, a redução da carga enzimática e a redução do custo do aditivo para a biorrefinaria.

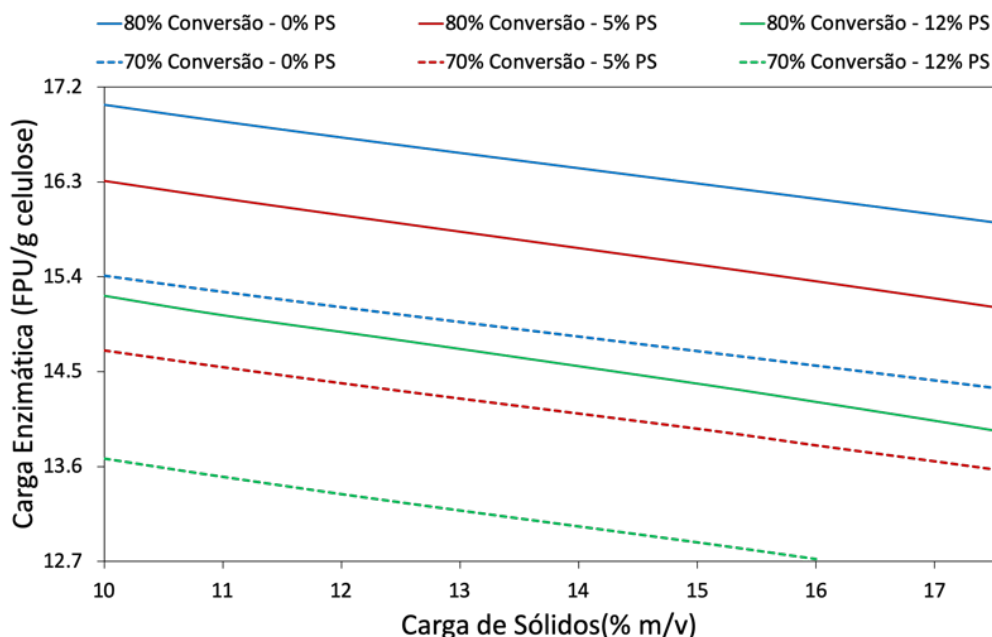


Figura 1. Curvas isoeconômicas avaliando os efeitos das variáveis carga de sólidos, carga enzimática e concentração de proteína de soja na mínima conversão necessária para que a biorrefinaria apresente Valor Presente Líquido (VPL) igual a zero. O tempo de hidrólise foi fixado em 24 horas, as concentrações de aditivo avaliadas foram 0, 5 e 12% (m/m) e as conversões foram de 70 e 80%.

4. Conclusões

A análise tecno-econômica da adição da proteína de soja durante a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico no contexto de uma biorrefinaria integrada mostrou que, em relação aos dados experimentais disponíveis na literatura até o presente momento, algumas metas de desempenho são necessárias de modo a viabilizar o uso do aditivo, sendo estas: aumentar a conversão da celulose e reduzir a carga enzimática utilizada durante a hidrólise. Assim, se esses objetivos forem atingidos experimentalmente, o uso da proteína de soja poderá significar um

importante avanço no sentido de viabilizar economicamente a produção do etanol celulósico, por meio do aumento do rendimento da etapa de hidrólise que consiste em um dos gargalos tecnológicos do processo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGEQ-UFSCar), à Embrapa Instrumentação, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2017/13931-3) e pelo projeto temático no qual este trabalho está inserido (processo temático 2016/10636-8, BIOEN), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, código de financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 141303/2019-0).

Referências

- BRONDI, M.G.; VASCONCELLOS, V.M.; GIORDANO, R.C.; FARINAS, C.S. Alternative Low-Cost Additives to Improve the Saccharification of Lignocellulosic Biomass 461–473, 2019.
- FLORENCIO, C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse, 2019.
- FURLAN, F.F.; COSTA, C.B.B.; SECCHI, A.R.; WOODLEY, J.M.; GIORDANO, R.C. Retro-Techno-Economic Analysis: Using (Bio)Process Systems Engineering Tools to Attain Process Target Values. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 9865–9872, 2016.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257-268, 1987.
- KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B.A., BLANCH, H.W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1083–1087, 2012.
- KO, J.K.; XIMENES, E.; KIM, Y., LADISCH, M.R. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 447–456, 2015.
- LONGATI, A.A.; LINO, A.R.A.; GIORDANO, R.C.; FURLAN, F.F. Defining research & development process targets through retro-techno-economic analysis: The sugarcane biorefinery case. *Bioresour. Technol.* 263, 1–9, 2018.
- ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F.M.; GARCÍA, B.D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 244, 48–56, 2017.
- SAINI, J.K.; PATEL, A.K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R. R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renew. Energy* 98, 29–42, 2016.
- SILVA, C.O.G.; VAZ, R.P.; FILHO, E.X.F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, 2018.
- SOARES, R.P.; SECCHI, A. R. EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimization. *Comp. Aid. Chem. Eng.* 14, 947–952, 2003.

MUDANÇA DA MORFOLOGIA DE *A. NIGER*: APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICASM. M. Buffo^{1,*}, A.L.Z. Ferreira¹, R. M. R. G. Almeida², A. C. Badino¹, C. S. Farinas⁴¹ Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, 13565-905, São Carlos, São Paulo² Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, S/N, 57072-900, Maceió, Alagoas³ Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, nº 1.452, 13560-970, São Carlos, São Paulo

* Autor correspondente, e-mail: marianembuffo@gmail.com

Resumo: Os bioprocessos industriais são realizados principalmente em culturas submersas de microrganismos que normalmente exibem um ciclo de vida morfológico complexo. A engenharia da morfologia é uma ferramenta importante para melhorar o bioprocessos, pois a morfologia influencia as condições de cultivo e está intimamente ligada à produção do produto de interesse. Este trabalho avaliou, através do delineamento experimental 2², como a mudança no pH e na concentração de esporos do inóculo influenciou a morfologia do fungo *A.niger*. Foram obtidos inóculos com morfologias variadas, desde pellets de diferentes tamanhos até morfologia completamente dispersa. Posteriormente, três diferentes morfologias de inóculo foram utilizadas para a produção de enzimas celulolíticas em frascos agitados. As morfologias mostraram diferentes impactos nas enzimas específicas, sendo que a produção de endoglucanase foi maior na morfologia pelletizada e a produção de β-glucosidase apresentou melhores resultados na morfologia dispersa, com produção quatro vezes maior que os pellets.

Palavras-chave: Engenharia morfológica, enzimas, celulases, *A. niger*

A. NIGER MORPHOLOGY CHANGE: APPLICATION IN CELLULOLYTIC ENZYME PRODUCTION

Abstract: Industrial bioprocess are performed mainly in submerged culture of microorganism that normally exhibit a complex morphological life cycle. The morphology engineering is an important tool to improve the bioprocess, because the morphology influence the cultivation conditions and it is closely linked to the production of the interest product. This work evaluated, through of experimental design 2², how the change in the pH and spore concentrate of the inoculum influenced the morphology of the fungus *A.niger*. We obtained inoculums with varied morphologies, since pellets of different sizes to completely dispersed morphology. Subsequently, three different inoculum morphologies were used for the production of cellulolytic enzymes in shaken flasks. Morphologies showed different impacts on specific enzymes, being that endoglucanase production was higher in pelletized morphology and β-glucosidase production had better results in dispersed morphology, with production four times greater than pellets.

Keywords: Morphology engineering, enzymes, cellulases, *A. niger*

1. Introdução

A economia mundial baseada em biomassa surge em resposta aos desafios globais e ambientais e tem sido cada vez mais solicitada. A UE, por exemplo, tem o objetivo ambicioso de produzir 30% de todos os produtos químicos e materiais industriais baseados em materiais renováveis e/ou bioprocessos até o ano 2030 (ZENG, 2019). Os bioprocessos são geralmente realizados por culturas submersas de microrganismos que exibem um ciclo de vida morfológico complexo, sendo classificados em pellets e micélio disperso, que inclui clumps, hifas ramificadas e isoladas (QUINTANILLA et al., 2015). As formas morfológicas influenciam as condições do

cultivo, como reologia do caldo, transferência de oxigênio, cisalhamento e também estão intimamente ligadas à produção do produto de interesse (KRULL et al., 2013). No caso de enzimas, por exemplo, uma morfologia na forma dispersa pode ser vantajosa, pois as proteínas são secretadas principalmente pelas pontas das hifas (EL-ENSHASY, 2007).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi modificar a morfologia do fungo filamentosso *A. niger* e analisar como a morfologia influenciaria na produção de enzimas celulolíticas. Para tanto, diferentes morfologias de *A. niger* foram obtidas através de delineamento experimental 2^2 , onde as variáveis alteradas foram concentração de esporos e pH do inóculo. Utilizando diferentes morfologias de inóculo (pellets, clumps e hifas ramificadas/isoladas), diferentes coquetéis enzimáticos de celulasas foram obtidos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e meio de cultura

Aspergillus niger selvagem, isolado da pimenta preta e obtido da coleção Embrapa Food Technology (Rio de Janeiro, Brasil). Meio de cultura utilizado foi de (MANDELS; STERNBERG, 1976) com modificações de (CUNHA et al., 2015). Lactose (14 gL⁻¹) foi utilizada como indutor (LI et al., 2017).

2.2. Modificando as condições de inóculo para obter diferentes morfologias

As pré-culturas foram realizadas em Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de volume de trabalho. A incubação foi realizada a 32 ° C e 200 rpm por 48 h. Para obter diferentes morfologias do inóculo, foram utilizados diferentes valores de concentração de esporos e pH do meio, de acordo com o planejamento fatorial 2^2 (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de esporos e condições de pH para o crescimento do inóculo.

| Código | Cultivo | C_{sp}^* (esporos.mL ⁻¹) | pH (-) |
|--------|----------------------------------|---|-----------|
| 0 | Controle (CUNHA et al., 2015) | 1×10^7 | 4,5 |
| 1 | C_{sp} (-) and pH (-) | 5×10^3 | 2 |
| 2 | C_{sp} (+) and pH (-) | 5×10^7 | 2 |
| 3 | C_{sp} (-) and pH (+) | 5×10^3 | 6 |
| 4 | C_{sp} (+) and pH (+) | 5×10^7 | 6 |
| 5 | C_{sp} (0) and pH (0) | 5×10^5 | 4 |

* C_{sp} : concentração de esporos nos 100 mL do meio.

Para analisar como as variáveis, pH e concentração de esporos, influenciaram a variável resposta, morfologia, foi proposta uma resposta quantitativa ao delineamento experimental (Y), de acordo com a Equação 1. Foi considerado para tanto o percentual de cada morfologia, o tamanho das estruturas e foi proposto um fator de classe ou peso para cada morfologia. As morfologias dispersas foram classificadas com menor peso e os pellets com maior peso. Assim, valores mais altos de Y representariam morfologias com mais pellets e menores valores de Y morfologia mais dispersa. Portanto, na Equação 1, temos: a porcentagem de cada classe morfológica na imagem do inóculo (%D: disperso, %C: clumps, e %P: pellets), os respectivos fatores de classe ou pesos atribuídos a cada classe morfológica ($f_D = 0,1$, $f_C = 0,5$ e $f_P = 1$) e, quando o pellet está presente, foi considerado o diâmetro normalizado do grânulo (d_P / d_{Pmax}).

$$Y = f_D \cdot \%D + f_C \cdot \%C + f_P \cdot \%P \cdot \frac{d_P}{d_{Pmax}} \quad (1)$$

2.3. Produção de enzimas

A produção de enzimas foi realizada em incubadora agitada a 32 ° C e 200 rpm por 96 h e com 10% (v.v⁻¹) de inóculo. Os ensaios de produção foram realizados em triplicata com três tipos diferentes de inóculo (Tabela 1: códigos 0, 1 e 2). Os dados experimentais foram expressos como o valor médio ± desvio padrão. Foram analisadas produção de endoglucanase e β-glucosidase, usando o protocolo de (GHOSE, 1987), utilizando carboximetilcelulose (CMC) (Sigma, EUA) e β-nitrofenil (Sigma, EUA), respectivamente como substratos para os ensaios.

3. Resultados e Discussão

3.1. Obtendo diferentes morfologias

Os resultados mostram como a alteração concomitante da concentração de esporos e do pH gerou uma variedade de morfologias diferentes (Figura 1), que variou desde grandes pellets (3, 5), passando por clumps (1) até morfologia predominantemente dispersa (2).

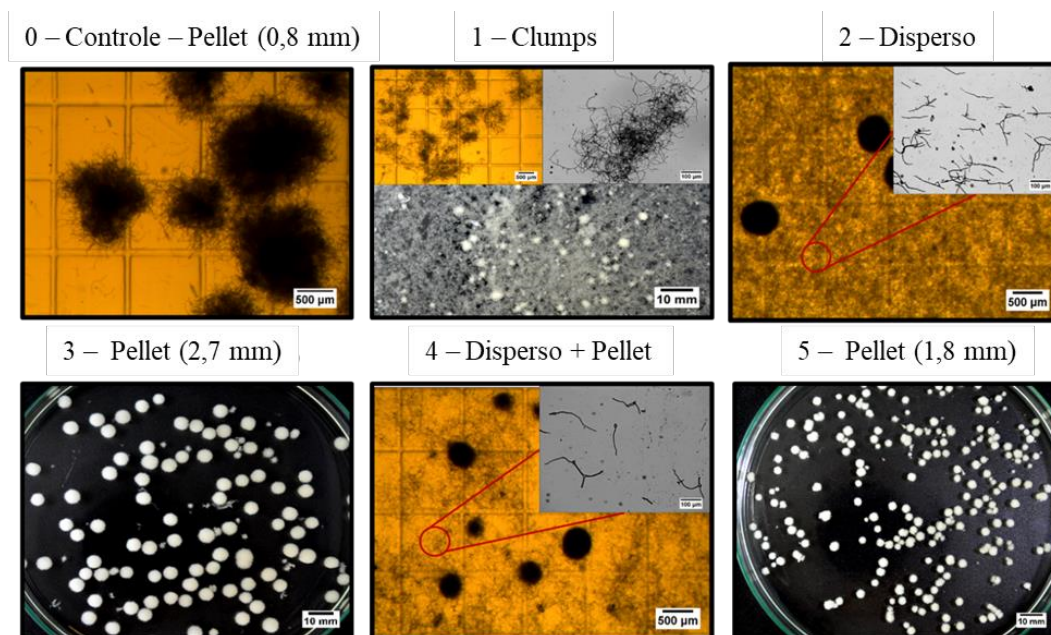


Figura 1. Morfologia do inóculo obtida nas condições de cultivo do planejamento experimental.

Com a medida quantitativa da morfologia, através do desenvolvimento da variável resposta Y foi possível a análise das variáveis, pH e concentração de esporos, através do gráfico de pareto (Figura 2). Todos os efeitos aparecem como significativos, a concentração de esporos aparece com o maior efeito, sendo esse negativo. Ou seja, foi a variável que mais influenciou a morfologia e seu aumento levou a uma diminuição na escala morfológica, o fungo tendeu a ser mais disperso. Em valores absolutos, o efeito do pH foi aproximadamente metade do efeito da concentração de esporos e o efeito foi positivo, o que significa que o aumento do pH favoreceu a morfologia peletizada. As duas variáveis juntas também tiveram um efeito significativo, o que mostra que a estratégia usada para alterar o pH e a concentração de esporos juntos foi boa para obter uma maior gama de morfologias.

Tais resultados concordam com resultados da literatura para o mesmo fungo *A.niger*. Papagianni e Matthey, (2006) avaliaram o efeito da concentração inicial de esporos no inóculo para produção de glucosamina e concluíram que, para os maiores valores de concentração inicial de esporos, houve predominância de morfologia dispersa. Em relação ao pH, GRIMM et al. (2005) estudaram a influência da agitação, aeração e pH na agregação de esporos (conídios) e constatando que a concentração de pellets aumentou e o diâmetro dos pellets diminuiu com a redução do pH, ou seja, a agregação de esporos foi menor em pHs menores.

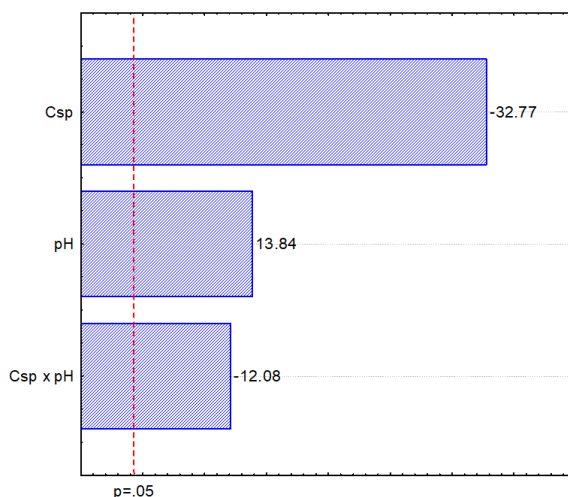


Figura 2. Análise do efeito das variáveis concentração de esporos (C_{sp}) e pH na morfologia fúngica.

3.2. Produção de enzimas celulolíticas

Três diferentes morfologias foram selecionadas para produção de enzimas: Pellets (Condição 0), clumps (Condição 1) e disperso (Condição 2). A Figura 3 mostra os resultados de produção ao longo do tempo de cultivo. A morfologia peletizada teve uma atividade mais alta de endoglucanase (Figura 3A) quando comparada às formas dispersas, a atividade da endoglucanase chegou a ser aproximadamente três vezes maior. Em contraste, para a produção de β -glucosidase, a maior atividade ocorreu em cultura dispersa (Figura 3B), com o valor de β -glucosidase chegando a $2300 \pm 120 \text{ UI.L}^{-1}$, valor aproximadamente quatro vezes maior que a forma peletizada. Além disso, esse é um valor comparável a altos valores na literatura, (ZHAO et al., 2018) alcançaram uma produção de β -glucosidase de $1930 \pm 280 \text{ UI.L}^{-1}$ usando uma cultura mista de *T.reesei* modificado e *A.niger*.

De acordo com a literatura, a morfologia dispersa é normalmente favorável à produção de enzimas devido ao fato dessas serem secretadas pelas pontas das hifas (ROBSON et al., 2008). Tal fato justifica a maior produção de β -glucosidase. Uma possível explicação para a menor produção de endoglucanase na morfologia dispersa é o fato do caldo gerado ter um maior índice de consistência (CERRI; BADINO, 2012), o que prejudica a transferência de oxigênio para a fase líquida, o que pode ter levado a uma menor produção dessa enzima em específico.

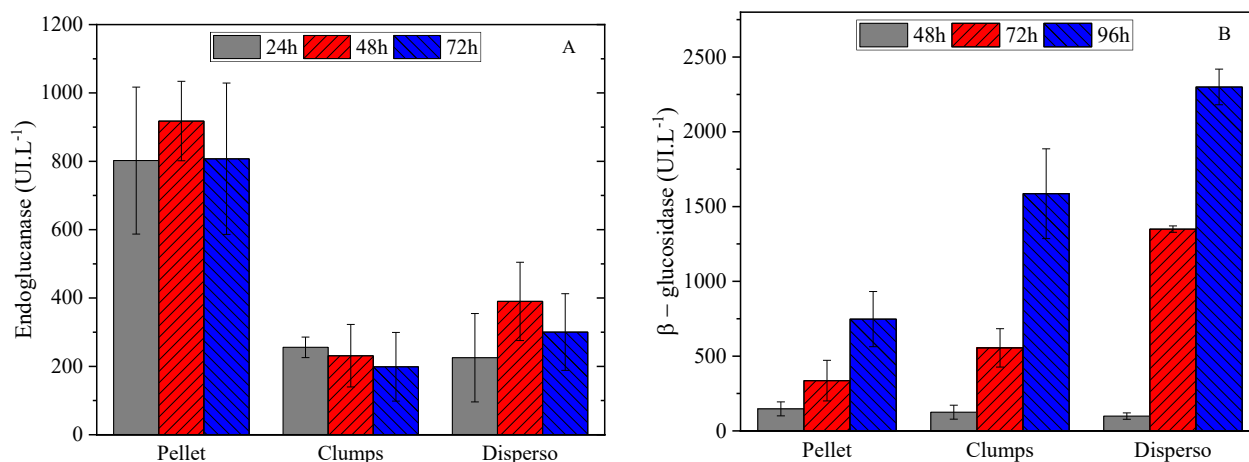


Figure 3. Atividade das enzimas ao longo do tempo. Figura 3A: Atividade de endoglucanase. Figura 3B: atividade de β -glucosidase.

4. Conclusões

Diferentes combinações de pH e concentração de esporos geraram inóculos com morfologias variadas, desde pellets de diferentes tamanhos até inóculo completamente disperso. A produção de endoglucanase foi maior na morfologia peletizada, enquanto que na produção de β -glucosidase a morfologia dispersa, hifas ramificadas e isoladas, foi mais vantajosa com produção quatro vezes maior do que os pellets.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio de: CAPES (Código de Financiamento 001), Fapesp (2018/11405-5) e CNPq (208422/2017-0). Os autores também agradecem a Embrapa Instrumentação - Laboratório de Agroenergia - Brasil e a Purdue University - Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE) - USA.

Referências

- CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, n. 6, p. 977-984, Aug 2012.
- CUNHA, F. M.; ESPERANCA, M. N.; FLORENCIO, C.; VASCONCELLOS, V. M. *et al.* Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method. *Biochemical Engineering Journal*, 97, p. 32-39, May 2015.
- EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *New Technologies and Applications* 2007.
- GHOSE, T. K. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES. *Pure and Applied Chemistry*, 59, n. 2, p. 257-268, Feb 1987.
- GRIMM, L. H.; KELLY, S.; VOLKERDING, II; KRULL, R. *et al.* Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, n. 7, p. 879-888, Dec 2005.
- KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R. *et al.* Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163, n. 2, p. 112-123, Jan 2013.
- LI, C. C.; LIN, F. M.; ZHOU, L.; QIN, L. *et al.* Cellulase hyper-production by *Trichoderma reesei* mutant SEU-7 on lactose. *Biotechnology for Biofuels*, 10, p. 15, Oct 2017.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. RECENT ADVANCES IN CELLULASE TECHNOLOGY. *Journal of Fermentation Technology*, 54, n. 4, p. 267-286, 1976.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microbial Cell Factories*, 5, Jan 25 2006.
- QUINTANILLA, D.; HAGEMANN, T.; HANSEN, K.; GERNAEY, K. V. Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production-Modelling and Monitoring. *In: KRULL, R. e BLEY, T. (Ed.). Filaments in Bioprocesses*. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2015. v. 149, p. 29-54.
- ROBSON, G. D.; PUCI, J.; THRONSET, W.; DUNN-COLEMAN, N. Oxidative stress, fragmentation and cell death during bioreactor growth of filamentous fungi. 27, p. 129-142, 2008 2008.
- ZENG, A. P. New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development. *Biotechnology Advances*, 37, n. 4, p. 508-518, Jul-Aug 2019.
- ZHAO, C.; DENG, L.; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. *Biomass & Bioenergy*, 112, p. 93-98, May 2018.

CENÁRIO ATUAL DOS NOVOS MÉTODOS DE FENOTIPAGEM DE PLANTAS E URGÊNCIA NAS AÇÕES DE IMERSÃO DO BRASIL NA ERA DA BIOECONOMIA.

P. S. P. Herrmann^{1,*}, S. Crestana¹, W. Q. Ribeiro Junior², C. A. F. de Sousa³, T. T Santos⁴, A. C. Lanna⁵

¹ Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, CEP 13560-741, São Carlos, SP

² Embrapa Cerrados, Rodovia BR 020 Km18, CEP 73310-970, Brasília – DF

³ Embrapa Meio-Norte, Avenida Duque de Caxias, n 5650, CEP 64008-780, Teresina, Piauí

⁴ Embrapa Informática Agropecuária, Avenida Andre Tosello 209, Campus da Unicamp, CEP 13083-886, Campinas, SP

⁵ Embrapa Arroz e Feijão, Rodovia GO-462 Km 12, CEP: 75375-000, Santo Antônio de Goiás, Goiás

* Autor correspondente, e-mail: paulo.herrmann@embrapa.br

Resumo: O presente trabalho apresenta um panorama da situação atual dos novos métodos de fenotipagem de plantas no Brasil e no mundo, a partir de 2008 até 2019. Ressalta-se que o crescimento dessa área ocorreu tanto no desenvolvimento de infraestrutura por instituições de ciência e tecnologia quanto na geração do conhecimento. A ciência de plantas e ciências agrárias está no centro dos principais desafios para as sociedades globais. O melhoramento de plantas não tem mantido o ritmo do aumento de produtividade, assim sendo esforços urgentes se fazem necessários para impulsionar o setor. A Embrapa, como instituição de pesquisa na agricultura tropical, vem apresentando várias ações estratégicas nessa direção, mas um novo salto deve ser dado, com a criação de uma política de Estado, que possibilite o estabelecimento de infraestrutura adequada para o treinamento de RH altamente qualificado e a logística para um País de dimensões continentais. A multidisciplinaridade advinda de expertises em planta, geociência, ciência da computação, da agricultura de precisão, e digital e instrumentação são condições *sine qua non* para essa nova abordagem.

Palavras-chave: novos métodos de fenotipagem de plantas, bioeconomia, melhoramento de plantas, política de estado, meio-ambiente.

CURRENT SCENARIO OF NEW PLANT PHENOTYPING AND URGENCY METHODS IN BRAZIL'S IMMERSION ACTIONS IN THE BIOECONOMY AGE.

Abstract: This paper presents an overview of the current situation of the new plant phenotyping methods from 2008 to 2019. It is noteworthy that exponential growth occurs both in the establishment of infrastructure by institutions (ICTs) in several countries, already in 2008 there were 06 (ICTs) and in 2019 the 38 new research and development institutions and 06 from the private sector, as well as the creation of national and international networks, as for the generation of knowledge, in this period, there is the h factor of 81 (publication / citation). Plant science and agricultural sciences are at the center of the main challenges of global societies (environment and genotype interaction). Plant breeding did not keep up with the productivity increase; therefore, urgent efforts are needed to reduce this factor. Embrapa, as a leading institution in tropical agriculture, has been presenting several strategic actions in this direction, but a new leap must be taken, with the creation of a state policy that allows the establishment of adequate infrastructure, as well as for the highly trainee qualified human resources training and logistic. Plant multidisciplinary, geoscience, computer science, precision agriculture, and expertise in digital and instrumentation is a prerequisite for this new approach.

Keywords: new methods of plant phenotyping, bioeconomy, plant breeding, state policy, environment.

1. Introdução

Garantir a segurança alimentar para nove bilhões de pessoas a partir de 2050 exigirá mudanças substanciais na sociedade, especialmente no modo de produzir alimentos. O aumento populacional e o aumento da demanda por produtos biogerados e biocombustíveis exigirão um aumento de 50 a 100% de produção nas principais culturas alimentares e não alimentares. Este é um desafio enorme, considerando o impacto esperado das mudanças climáticas e a crescente escassez de recursos agrícolas (ROY et al., 2017).

Um estudo de 2015 sobre a inserção da bioeconomia na Europa concluiu que as indústrias baseadas na biologia geram 17 milhões de empregos, ou seja, 8,5% da força de trabalho da região, que rende mais de € 2 trilhões (US\$ 2,2 trilhões) anualmente. As indústrias dos EUA que produzem produtos de base biológica geram cerca de 4 milhões de empregos e movimentam US\$ 370 bilhões. A bioeconomia da Índia ultrapassou US\$ 4 bilhões em 2013. Somente a indústria brasileira de cana-de-açúcar representou 2% de seu produto interno bruto e 4,5 milhões de empregos em 2012 (EL-CHICHAKLI, et al., 2016).

O Brasil detém 25% da biodiversidade mundial, sendo uma fonte potencial para a bioeconomia, com a geração de novos materiais genéticos recombinantes, podendo atender à demanda crescente da sociedade por novos produtos na agricultura, na medicina, na indústria e na produção de energia. Segundo um estudo da Keygene, empresa localizada em Wageningen, Holanda, o mercado global de sementes movimentou algo em torno de US\$ 37,5 bilhões em 2012 (VAN TUNEN, 2016). Em 2018 esse valor subiu para algo em torno de US\$ 85,2 bilhões. A América Latina deverá ocupar o segundo lugar na taxa de crescimento anual desse mercado (Seeds Market, 2013). Nesse levantamento a Keygene demonstrou que o intervalo de tempo entre o início da pesquisa e o lançamento de uma cultivar, que no melhoramento clássico leva em torno de 10 anos, pode ser reduzido para 5,5 anos pelo uso de técnicas avançadas de genotipagem e fenotipagem (VAN TUNEN, 2016). O objetivo deste trabalho é proporcionar uma visão panorâmica da fenotipagem de plantas em todo o mundo e como as ferramentas disponíveis podem ser usadas pelo Brasil para alavancar a ciência de plantas, os programas de melhoramento genético e biotecnologia das principais culturas agrícolas.

2. Materiais e Métodos

A Embrapa visualizando a potencialidade de P, D & I nos novos métodos aplicados à fenotipagem de plantas (NMFP) criou o Labex Europa, posto avançado Alemanha, iniciando as atividades em outubro de 2012 até outubro de 2015. Realizou-se inicialmente um levantamento para a identificação de instalações dedicadas à fenotipagens de plantas no Brasil e em diversos países ao redor do mundo. Esses dados foram posteriormente checados por visitas in loco na Alemanha, França, Inglaterra, Holanda, Índia, Austrália, Argentina, Chile e também, por meio dos relatórios gerados pelas próprias instituições, bem como documentos da “International Plant Phenotyping Network (IPPN)”. O foco foi principalmente a evolução no número e na diversidade de “facilities”, além de instituições e países envolvidos com os novos métodos de fenotipagem de plantas. Realizou-se, também, uma extensa pesquisa nas bases de dados nacionais e internacionais para o levantamento de publicações que tenham como palavra-chave “plant phenotyping”.

3. Resultados e Discussão

3.1. Cenário Internacional e Científico da Fenotipagem de Plantas de Alto Desempenho.

Na figura 1 (A) e (B) é apresentada a evolução referente a relação do número de institutos de ciência e tecnologia, bem como a formação de redes nacionais e internacionais de pesquisas com os novos métodos de fenotipagem de plantas (NMFP). A Austrália foi pioneira nos NMFPs, inaugurando em 2007 “Australian Plant Phenomics Facility (APPF)”. A partir daí, vários trabalhos vêm sendo realizados. O exemplo de maior sucesso foi o trigo geneticamente modificado, o qual apresentou ganhos de rendimento entre 20 a 30% (BRADIOTTI, 2019).

De acordo com a Rede Internacional de Fenotipagem de Plantas (IPPN), em 2019 o número

de sócios era de 32 instituições da academia, 06 empresas da Indústria e 06 “clusters” de diversos países (PIERUSCHKA, 2019). A Embrapa se associou ao IPPN em 2018. Em 2013, a Alemanha inaugurou a Rede Alemã de Fenotipagem de Plantas (DPPN), com recursos da ordem de 35 milhões de Euros. A França e o Reino Unido também fizeram o mesmo, isto é, criaram as suas próprias redes. A comunidade Européia, por intermédio da sua agência denominada “European Strategy Forum for Research Infrastructures (ESFRI)”, listou em seu “roadmap” de 2016 o papel estratégico da fenotipagem de plantas na Europa, assegurando para os próximos 20 anos recursos da ordem de 77 milhões de euro (WOMERSLEY, 2016). Em 2016, os Estados Unidos criaram a sua rede de fenotipagem de plantas (NAPPN), juntamente com México e Canadá, que criou o “Plant Phenotyping and Imaging Research Centre (PIRC)”, com investimento da ordem de US\$ 28,5 milhões. Somente nos Estados Unidos, atualmente, a rede possui 15 “facilities”, em 10 universidades, sendo que 03 delas estão instalados sistemas de grande porte e no “Agricultural Research Service (USDA/ARS)” junto ao “U.S. Vegetable Laboratory”. A China já está investindo desde novembro de 2017 em torno de US\$ 15 milhões na organização e na estruturação da sua rede nacional de fenotípica de plantas. A Índia adquiriu em 2013 um sistema a laser de médio – grande porte para realizar a reconstrução de imagem 3D de plantas no campo. Nesse ano, de 2019, foi instalada, naquele país, para experimentos de laboratório, uma plataforma de alto desempenho de fenotipagem de plantas totalmente automatizada para análise 600 plantas, por intermédio de vários sensores.

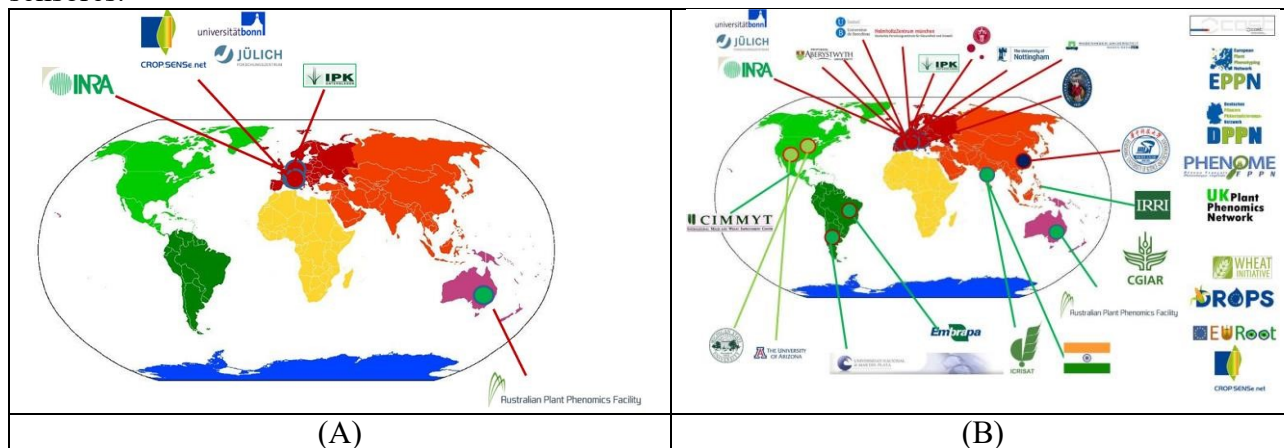


Figura 1. Mapa global da evolução e distribuição das redes nacionais e internacionais de fenotipagem de plantas por países e instituições em 2008 (A) e 2015 (B) (PIERUSCHKA, 2019)

Em 2019, observam-se ações concretas que foram realizadas em Países, como a África do Sul e Taiwan que já adquiriram sistemas de alto desempenho de fenotipagem de plantas no campo. Algumas ações pontuais relacionadas a fenotipagem de plantas de alto desempenho, no nível de laboratório, estão ocorrendo na Coreia do Sul, no “Convergence Research Center for Smart Farm Solution”. O Iran em maio de 2018 realizou uma oficina com especialistas ligados ao IPPN para discutir a aplicação de fenotipagem de alto desempenho naquele País.

O desenvolvimento das plataformas e das novas técnicas e métodos de genotipagem cresceram muito rápidos. Da mesma forma observa-se que os custos da fenotipagem por planta vêm caindo sensivelmente à medida que novos sistemas estão sendo instalados em vários países. Cálculos recentes mostraram que a aplicação dos novos métodos de fenotipagem de alto desempenho custava em torno de US\$ 5.300,00 e em 2015 girava em torno de US\$ 590,00 a US\$ 1.200,00 por planta. Por intermédio de modelos matemáticos, dos avanços em instrumentação e mecatrônica que esse custo pode cair abaixo de US\$ 120,00/planta em 2019. Para se ter uma ideia da importância disso, basta observar que em 2005 havia uma única plataforma de fenotipagem de plantas instalada no mundo. Em 2015, saltou para 31 sistemas instalados e 13 em processo de instalação. (SCWARTZ, 2016).

Do ponto de vista técnico-científico, verifica-se que o número de publicações, dos últimos

26 anos (1991 até 2017), cresceu exponencialmente, saindo de 01 publicação em 1991 alcançando, em 2017, 337 publicações. A figura 2 apresenta graficamente essa evolução temporal, tanto do número de publicações como de citações. Em termos de citações, tem-se que no ano de 1996 ocorreram apenas 02 citações, enquanto em 2017 chegou acumuladamente à marca de 6896 citações, o que confere um fator-h da ordem de 81.

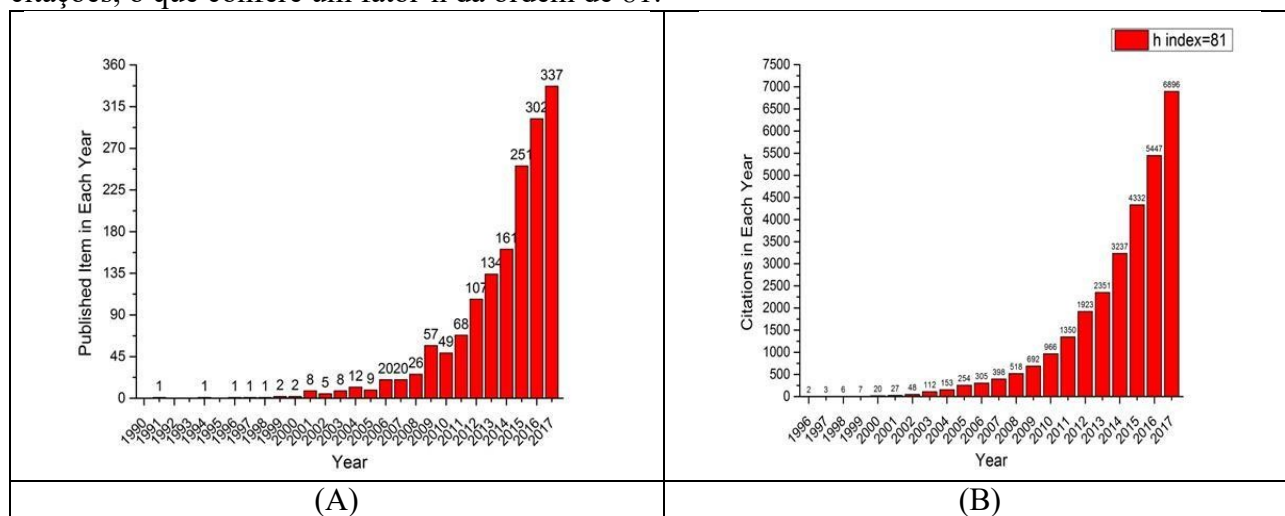


Figura 2. Gráfico com o resultado da busca de número de (A) publicações e (B) citações, no tempo, da palavra-chave “Plant Phenotyping” em tópicos. A ferramenta utilizada para a busca foi o “Web of Science” da Thomas Reuters.

Algumas ações já realizadas desde 2004 pela Embrapa e parceiros são: - Participação no programa do CIMMYT, México, denominado “Drought Phenotyping Network (Generation Challenge Program), 2004 - 2008; - Estabelecimento da plataforma SITIS de fenotipagem da Embrapa Arroz e Feijão; - Entre Outubro de 2012 a Outubro de 2015 a Embrapa criou o Labex Europa, posto avançado Alemanha, com o tema em novos métodos de Fenotipagem de Plantas; - Agropensa (“Think Tank” da Embrapa): Apresentou no documento “O Futuro de Desenvolvimento Tecnológico da Agricultura Brasileira – Visão 2014 – 2034”, onde privilegiou o tema em novos métodos de fenotipagem de plantas; - Programa de Pos-Graduação e Cientista Visitante da Embrapa em 2014. Foram dois pesquisadores (CPAC e UnB) ao Forschungszentrum Jülich, Jülich, na Alemanha; - “Workshop Phenotyping for the Future” Embrapa Sede, Brasília-DF, 17/09/2013; - “Embrapa Plant Phenotyping Workshop (Past, Present and Future)”, Embrapa Sede, Brasília-DF, 02 a 04/09/2014; - Foi criada em dezembro de 2014 o grupo de pesquisa do CNPq “Rede Brasileira de Fenotipagem de Plantas”, (<http://dgp.cnpq.br/dgp/espelhogrupo/7628749066451461>); - Aprovação do Arranjo “Métodos e técnicas modernas visando a fenotipagem de plantas para o avanço da agricultura” (FPAGro)”, em Junho de 2017; - Realização da “II Latin-American Conference on Plant Phenotyping and Phenomics for Plant Breeding” 20 a 23 de Setembro de 2017, na Embrapa Instrumentação - Em 2018, houve a transformação do arranjo em portfólio “Métodos e Técnicas Modernas, visando a Fenotipagem de Plantas para o Avanço da Agricultura (FPAGro)”- Membro associado da “International Plant Phenotyping Network (IPPN)”, com sede na Alemanha. - O tema foi contemplado no capítulo "Tecnologia e Inovação no Agro", do livro “Agro e Paz – Análises e propostas para o Brasil alimentar o mundo”, 2018 (RODRIGUES, 2018); - Em fevereiro de 2019, o FPAGro se associou ao recém-criado CGPort Automação, Agricultura de Precisão e Digital.

4. Conclusões

A área de fenotipagem de plantas tem crescido aceleradamente em todo o mundo, haja vista a quantidade de “facilities” instaladas em vários países ao redor do mundo em curto espaço de tempo e, também, a quantidades de redes nacionais de fenotipagem de plantas, as quais estão associadas à rede internacional. Assim sendo a interação entre pesquisadores e profissionais no uso

de plantas, geociências, ciência da computação e instrumentação, física e a engenharia eletrônica é fundamental.

Devido às condições continentais do País, a diversidade de seus biomas, a pujança da agricultura, o enfoque na sustentabilidade ambiental, a política nacional de bioeconomia, à complexidade inerente aos NMFPS, os problemas e as oportunidades abordados nessa temática façam que se estabeleçam condições adequadas para que os atores envolvidos na área, tanto da pesquisa pública e privada brasileira, invistam na formação de recursos humanos e recursos financeiros para infraestrutura, e desta forma possam manter o País no caminho do avanço científico e tecnológico, em particular em relação aos parceiros europeus, australianos, norte-americanos, chineses, indianos, de um lado, e com as principais empresas de sementes, por outro. Para isso devem-se estabelecer ações de imersão urgente do Brasil, na utilização dos NMFPS, em prol da geração do conhecimento dos “traits” das diversas culturas de importância agrícola, os quais sofrem influência dos fatores bióticos e abióticos do meio-ambiente em complexa mutação, em particular a zona tropical do planeta. Os resultados adquiridos possibilitaram o estabelecimento da aquisição e a formação de um banco de dados, e desta forma criar as condições adequadas para uso do “big-data” e o seu gerenciamento, da inteligência artificial aplicada a fenômica e genômica, do aprendizado de máquina, levando em conta as especificidades e influência dos diversos biomas do País, objetivando condições para o aumento do conhecimento e da produtividade da agricultura, em um curto período de tempo, juntamente com as ferramentas da genotipagem. Assim sendo uma bioeconomia pujante, advindo do agronegócio e com sustentabilidade, é o almejado.

Uma abordagem estratégica viabilizará a elaboração de estudos técnicos, de simulações, bem como as análises de impacto horizontal e vertical. A sua elaboração resultará em metas de curto, médio e longo prazo, contemplando ações regionais e nacionais, estabelecendo orçamentos para um longo período.

Devemos responder operacionalmente as perguntas que já estão sendo feitas e não estacionarmos somente no levantamento de cenários.

Agradecimentos

Projeto "Agricultura de Precisão (AP) para sustentabilidade do sistema produtivo agrícola, pecuário e florestal brasileiro", atividade número 01.14.09.001.04.04.004 e Portfólio Automação e Agricultura de Precisão e Digital.

Referências

- BRAIDOTTI, G. 'Over expression' of three wheat genes linked to yield gains. Fonte: Groundcover (GRDC) de 1/07/2019: <https://groundcover.grdc.com.au/story/6244809/new-genetic-pathways-to-increase-wheat-yield/?cs=13984>. (Acessado em 17 de Setembro de 2019)
- EL-CHICHAKLI, B., VON BRAUN, J., LANG, C., BARBEN, D., & PHILIP, J.. Five cornerstones of a global bioeconomy. *Nature*, v. 535, n. 7611, p. 221-223, 14 de July de 2016.
- FIORANI, F.; SCHURR, U. Future Scenarios for Plant Phenotyping, *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, n. 1, p. 267-291, 2013;
- HERRMANN, P. S. P.; SCHURR, U. In: Humboldt Kolleg 2013 / SCIENCES & TECHNOLOGY IN CONTEMPORARY LIFE: IMPACTS AND HORIZONS, Campos do Jordão-SP. XII Brazilian MRS Meeting, 2013. P. 43-44.
- LI, H.;RASHEED, A.; HICKEY, L. T.; HE, Z.. . Fast-Forwarding Genetic Gain, *Trends in Plant Science*, v. 23, N. 3, pp. 184-186, March 2018
- PIERUSCHKA, R. *Participating Organisations*. Fonte: IPPN 2017: https://www.plant-phenotyping.org/IPPN_Participating_Organisations (acessado em 10 de 09 de 2019).
- RODRIGUES, R. *AGRO E PAZ. ANÁLISES E PROPOSTAS PARA O BRASIL ALIMENTAR O MUNDO*. Piracicaba, SP, Brasil: Universidade de São Paulo – ESALQ, 2018, 416 p..
- ROY, F.; TARDIEU, F.; TIXIER-BOICHARD, M.; SCHURR, U.. European infrastructures for sustainable agriculture, *Nature Plants*, v.3, p. 756–758, 2017

- SCWARTZ, S. (04 de 01 de 2016). *How far are we from the 100\$ Phenome?*, disponível em Phenospex 2016: <https://phenospex.com/blog/how-far-are-we-from-the-100-phenome/> (Acessado em 10 de 09 de 2019).
- Seeds Market by type (Oilseed, Grain, Fruit & Vegetable, Turf, Forage, & Other Seeds), Seed Trait (Herbicide Tolerant, Insecticide Resistant, & Other Stacked Traits), <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/seeds-market-376.html>. (Acessado em 14 de Outubro de 2016).
- VAN TUNEN, A. J.. Revisiting Plant & Seed Improvements in the Digital Phenotyping Era. IN: Pheno days 2013 <http://www.phenodays.com/archive.html> (Arquivo capturado em 13/08/2014);
- VASCONCELOS, Y. (10 de fevereiro de 2018). *Lavoura mais produtiva*. Acesso em 10 de 09 de 2019, disponível em Pesquisa Fapesp: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/02/15/lavoura-mais-produtiva-2/>
- WOMERSLEY, J. (2016). *European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI): Strategy Report on Research Infrastructures*. Brussels: European Commission.

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO EFLUENTE DE ESGOTO TRATADO EM FOSSAS
SÉPTICAS BIODIGESTORAS INOCULADAS COM SUBSTITUTOS AO ESTERCO
BOVINO FRESCO**P. A. Lara^{1,*}, C. R. Marmo², W. T. L. da Silva²¹ Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador São Carlense, 400, 13566-590, São Carlos, SP² Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP

* Autor correspondente, e-mail: paulalara@usp.br

Resumo: A Fossa Séptica Biodigestora é uma tecnologia simples desenvolvida para atender a necessidade de tratamento de esgoto doméstico em comunidades rurais sem acesso a saneamento básico adequado. O processo de digestão microbiana anaeróbia nesta tecnologia é potencializado pela aplicação de esterco bovino fresco, porém existem casos nos quais o acesso a este insumo é limitado. Com isto, faz-se necessário testar o desempenho de inóculos alternativos que possam substituir o uso de esterco bovino. Neste trabalho, foi avaliado o desempenho de dois substitutos: (i) sedimento de brejo e (ii) bioaditivo comercial para limpeza de fossas sépticas convencionais. Os efluentes obtidos nos sistemas inoculados com estes substitutos apresentaram concentrações de fósforo e cálcio similares às obtidas em efluentes de sistemas inoculados com esterco bovino, já as concentrações de nitrogênio, potássio e micronutrientes, foram menores. O efluente do sistema inoculado com sedimento de brejo apresentou valores menores de concentração de DBO, DQO e coliformes totais entre os sistemas avaliados, bem como em comparação com efluentes de sistemas tratados com esterco bovino. O sedimento de brejo foi o inóculo que apresentou o melhor desempenho e mostra-se como um potencial substituto ao esterco bovino utilizado na Fossa Séptica Biodigestora.

Palavras-chave: saneamento básico rural, biodigestão anaeróbia, reator anaeróbio simplificado, tratamento de esgoto, tratamento de efluente.

***QUALITY EVALUATION OF SEWAGE TREATED EFFLUENT FROM BIODIGESTER
SEPTIC TANKS, OPERATING WITH ALTERNATIVE INOCULANTS TO FRESH CATTLE
MANURE***

Abstract: The Biodigester Septic Tank is a simple technology designed to meet the need for sewage treatment in rural communities without access to adequate sanitation. The anaerobic microbial digestion process in this technology is enhanced by the application of fresh cattle manure, nevertheless, in some cases; the access to this resource is limited. Therefore, performance tests of alternative inoculants for fresh cattle manure are necessary. In this work, the performance of two substitutes, (i) bog sediment and (ii) commercial bioadditive for septic tanks cleaning, were evaluated. Phosphorus and Calcium concentrations in the effluent produced by the systems inoculated with these substitutes presented similar values to those obtained in effluents from systems inoculated with cattle manure; otherwise, Nitrogen, Potassium and micronutrients concentrations were smaller. BOD, COD and total coliforms concentrations in the effluent produced by system inoculated with bog sediment, were the lowest among the evaluated systems, and to those obtained in effluents from systems inoculated with cattle manure. Thus, bog sediment was the inoculant that showed better performance among the evaluated systems and is a potential substitute to fresh cattle manure used in the Biodigester Septic Tank.

Keywords: rural basic sanitation, anaerobic biodigestion, simplified anaerobic reactor, sewage water treatment, wastewater treatment.

1. Introdução

A Fossa Séptica Biodigestora é um sistema de biodigestão anaeróbia simples, desenvolvida para atender as necessidades de tratamento de esgoto doméstico em comunidades rurais que não têm acesso a saneamento básico adequado, sendo sua finalidade proteger a saúde da população, promover a conservação dos recursos hídricos por meio da substituição das fossas rudimentares (fossas negras) e auxiliar na produção agrícola mediante o uso do efluente tratado como biofertilizante (NOVAES et al., 2002, 2006; GALINDO et al., 2010). O seu funcionamento consiste na fermentação anaeróbia da matéria orgânica no esgoto pelos microrganismos presentes naturalmente nas fezes. Este processo é potencializado pela adição de esterco bovino fresco, que funciona como inóculo, aportando ao sistema uma seleção de bactérias anaeróbias que aumentam a eficiência do sistema, reduzem os odores e melhoram a qualidade do efluente tratado (SILVA; MARMO; LEONEL, 2017). Contudo, existem propriedades rurais que não possuem criação de gado bovino e/ou não tem fácil acesso a esterco bovino, o que dificulta a operação da tecnologia ou até mesmo inviabiliza sua instalação. Testes com esterco de ovino foram realizados na Fossa Séptica Biodigestora, porém, estes apresentaram uma menor eficiência na remoção de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e coliformes quando comparados com uma fossa inoculada com esterco de bovino (SILVA; FAUSTINO; NOVAES, 2007). De forma a minimizar as limitações do uso exclusivo de esterco bovino, faz-se necessário testar o desempenho de inóculos alternativos que possam ser usados em substituição. Neste trabalho, foram avaliados sistemas inoculados com dois tipos de substitutos: (i) sedimento de brejo (área alagada natural), reconhecidamente ricos em bactérias heterotróficas próprias de ambientes anóxicos (TORRES; INGLET; REDDY, 2011; BODELIER; DEDYSH, 2013), e (ii) um bioaditivo comercial para limpeza de fossas sépticas convencionais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Descrição das fossas sépticas biodigestoras instaladas

- **Família da Silva (SLV) - sem inóculo**

O sistema foi instalado na propriedade do produtor Edinaldo Barros da Sillva, localizada no Sítio São Benedito, Estrada Velha São Carlos – Descalvado, km 16 (22°03'40,3"S, 47°46'55,8"O) no dia 01 de novembro de 2018, e não recebeu nenhum tipo de inóculo.

- **Família Marcatto (MCT) - bioaditivo comercial**

O sistema foi instalado na propriedade do produtor Luiz Donizetti Marcatto, localizada no Sítio Monte Alto, estrada velha São Carlos – Descalvado, km 06 (22°02'00,1"S, 47°50'54,3"O) no dia 26 de julho de 2018. O inóculo utilizado foi um bioaditivo comercial, composto pelas bactérias *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus sp.* e *Escherichia hermanii* (Fossaklin, da empresa Bio-Brasil Limpeza Biológica LTDA). A inoculação começou com um “choque” biológico inicial no sistema, adicionando um sachê do produto (12,5 g) por dia durante 4 dias seguidos. Após o choque, a inoculação foi realizada uma vez por semana pelo proprietário. O produto foi aplicado diretamente na válvula de retenção antes da primeira caixa do sistema e a sua inserção era auxiliada pela adição de água na válvula (Figura 1).

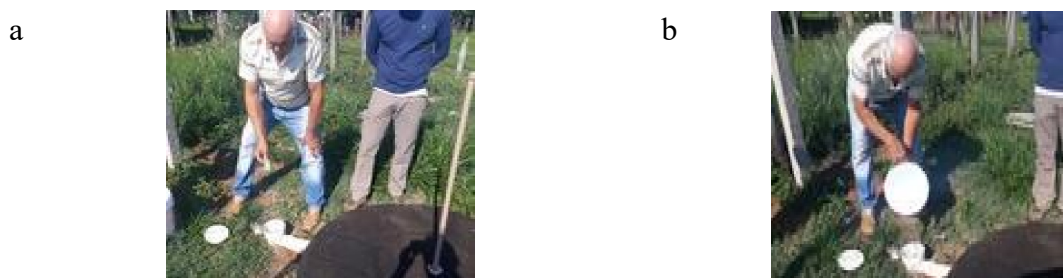


Figura 1. Imagens da inoculação da Fossa Séptica Biodigestora com bioativo comercial. (a) Colocação do sachê com inóculo e (b) adição de água para levar o inóculo ao sistema biodigestor.

- **Família Zago (ZAG) - sedimento de brejo**

O sistema foi instalado na propriedade do produtor José Zago, localizada no Sítio São Benedito, estrada velha São Carlos – Descalvado, km 16 (22°03'38,3"S, 47°46'53,7"O) no dia 02 de agosto de 2018. O inóculo utilizado foi o sedimento de uma área alagada natural (brejo) localizada na mesma propriedade. Na primeira inoculação, foram coletados aproximadamente 8 litros de sedimento e aplicados diretamente na válvula de retenção sem nenhum procedimento além da retirada, por decantação rápida, do material grosseiro e do sedimento mais denso. A partir da segunda inoculação, o sedimento coletado foi filtrado com auxílio de um pano, retirando o material grosseiro e descartando o sedimento mais denso. Em seguida, meio copo (aproximadamente 100g) de sal de cozinha comercial (NaCl) era adicionado ao filtrado para auxiliar no processo de sedimentação dos colóides e facilitar a extração dos micro-organismos por meio do aumento da densidade do líquido, da quebra de micro-agregados e da ruptura de interações iônico-moleculares entre a membrana celular e o sedimento mineral. Após 10-15 minutos de reação, o sobrenadante era aplicado no sistema (Figura 2). Este procedimento foi realizado uma vez por mês, durante todo o período do experimento.



Figura 2. Imagens da inoculação da Fossa Séptica Biodigestora com sedimento de brejo. (a) coleta do material, (b) filtragem, (c) colocação de sal de cozinha e (d) colocação do líquido no sistema.

2.2. Amostragem

As amostras foram coletadas no terceiro (último) tanque dos sistemas, onde o efluente já passou pelo processo de tratamento. As coletas foram realizadas com o auxílio de uma haste modificada e de maneira que a amostra fosse o mais representativo e homogêneo possível. As coletas foram realizadas conforme a tabela 1.

Tabela 1. Datas das coletas, idade e estado dos sistemas na hora da coleta.

| Coleta | Data | Idade do sistema de tratamento (dias) | | | Aplicação de inóculo alternativo | | |
|--------|------------|---------------------------------------|------|------|----------------------------------|------|------|
| | | MCT* | ZAG* | SLV* | MCT* | ZAG* | SLV* |
| 1 | 13/12/2018 | 138 | 131 | - | NÃO | NÃO | - |
| 2 | 24/01/2019 | 182 | 175 | - | SIM | SIM | - |
| 3 | 25/02/2019 | 214 | 207 | 116 | SIM | SIM | NÃO |
| 4 | 29/04/2019 | 277 | 270 | 179 | SIM | SIM | NÃO |
| 5 | 25/06/2019 | 334 | 327 | 236 | SIM | SIM | NÃO |

*MCT = sistema inoculado com bioaditivo comercial; ZAG = sistema inoculado com sedimento de várzea; SLV = sistema sem inoculação.

2.3 Análises

Análises de macro (N, K, P, Ca, Mg) e micronutrientes (Fe, Zn, Mn), sódio (Na), cloretos, Carbono Orgânico Total (COT), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO, Demanda Química de Oxigênio (DQO), série de sólidos, condutividade elétrica, pH, cor aparente e turbidez, foram realizadas na saída do sistema, de forma a avaliar a qualidade do efluente tratado. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento da EESC – USP em São Carlos, seguindo a metodologia do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* e do *Handbook Hach – Water Analysis Handbook* (HACH COMPANY, 1992; APHA; AWWA; WEF, 2017).

3. Resultados e Discussão

Segundo as tabelas 2 a 4, as características do efluente tratado mostraram variações com o tempo, dados os valores de desvio padrão da média de cada parâmetro. Estas variações podem ser causadas por múltiplos fatores tais como: maturação biológica do sistema, mudanças alimentares dos usuários ou aumento temporário da frequência de uso dos banheiros (eventos familiares, datas comemorativas, etc.).

Tabela 2. Valores de DBO, DQO, coliformes e sólidos na saída dos sistemas (tanque 3).

| Fossa | DBO | DQO | Coliformes Totais | <i>E. coli</i> | ST* | SST* | SDT* |
|-------|--------------------|-----------|-----------------------------------|----------------|--------------------|---------|-----------|
| | mg L ⁻¹ | | NPM**/100 mL (x 10 ⁶) | | mg L ⁻¹ | | |
| MCT | 203 ± 76 | 395 ± 153 | 4,37 ± 3,13 | 1,13 ± 1,40 | 882 ± 228 | 60 ± 36 | 822 ± 215 |
| ZAG | 81 ± 18 | 180 ± 43 | 0,49 ± 0,63 | 0,02 ± 0,01 | 657 ± 56 | 44 ± 26 | 613 ± 62 |
| SLV | 182 ± 14 | 333 ± 84 | 2,31 ± 3,98 | 0,02 ± 0,03 | 706 ± 70 | 49 ± 10 | 657 ± 61 |

* ST = Sólidos Totais; SST = Sólidos Suspensos Totais; SDT = Sólidos Dissolvidos Totais. ** Número mais provável.

A tabela 2 mostra os valores de concentração de DBO e DQO e valores de coliformes na saída dos sistemas. O sistema MCT foi aquele que apresentou os maiores valores destes parâmetros e a maior variação dos mesmos, dado o elevado valor do desvio padrão. Já o sistema ZAG foi o que apresentou, de forma geral, os menores valores e a menor variação destes parâmetros. Em comparação com os valores obtidos em efluentes tratados por sistemas inoculados com esterco bovino (FAUSTINO, 2007), o sistema ZAG apresenta valores menores de DBO e DQO, enquanto que os sistemas MCT e SLV apresentam valores maiores.

De maneira geral, as maiores concentrações de macronutrientes, sódio, cloretos e sólidos (Tabela 4) foram encontradas no sistema MCT, assim como os maiores valores de condutividade elétrica, cor e pH (Tabela 3). Com relação aos micronutrientes, os sistemas ZAG e SLV apresentaram maiores valores com exceção do manganês. A maior concentração de sólidos, observado no sistema MCT, pode indicar uma entrada maior de material bruto no sistema em comparação aos outros, explicando assim as maiores concentrações de outros parâmetros. Comparando as concentrações obtidas nos efluentes tratados pelos sistemas inoculados com esterco bovino (FAUSTINO, 2007), as concentrações de fósforo total (P) e cálcio (Ca²⁺) são próximas, mas as concentrações de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), potássio (K⁺) e micronutrientes, em geral, são menores.

Tabela 3. Valores médios condutividade elétrica, cor, turbidez e pH do efluente tratado na saída do sistema.

| Fossa | Condutividade Elétrica | Cor | Turbidez | pH |
|-------|------------------------|------------|--------------|-----------|
| | μS cm ⁻¹ | UC | NTU | |
| MCT | 3021 ± 631 | 1530 ± 794 | 56,6 ± 37,2 | 8,3 ± 0,1 |
| ZAG | 2129 ± 278 | 1063 ± 361 | 71,0 ± 114,0 | 8,2 ± 0,1 |
| SLV | 2597 ± 174 | 1224 ± 195 | 69,8 ± 79,1 | 8,1 ± 0,1 |

Tabela 4. Valores médios de macro e micronutrientes, sódio e cloretos do efluente tratado na saída do sistema.

| Fossa | NTK* | K ⁺ | P | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | COT* |
|-------|--------------------|----------------|-------------|------------------|------------------|--------------|
| | mg L ⁻¹ | | | | | |
| MCT | 407 ± 111 | 73,4 ± 19,2 | 40,4 ± 36,7 | 19,26 ± 5,50 | 8,68 ± 1,14 | 200,2 ± 50,3 |
| ZAG | 264 ± 82 | 44,0 ± 5,9 | 55,0 ± 25,7 | 18,05 ± 5,53 | 8,03 ± 1,01 | 129,4 ± 22,5 |
| SLV | 300 ± 34 | 57,1 ± 11,4 | 35,3 ± 26,7 | 19,90 ± 2,43 | 10,47 ± 0,71 | 167,0 ± 20,0 |

*NTK = Nitrogênio Total Kjeldahl; COT = Carbono Orgânico Total; PT = fósforo total.

Tabela 5. Continuação

| Fossa | Fe total | Zn ²⁺ | Mn ²⁺ | Na ⁺ | Cl ⁻ |
|-------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | mg L ⁻¹ | | | | |
| MCT | 0,17 ± 0,10 | 0,148 ± 0,034 | 0,036 ± 0,041 | 118 ± 29 | 170,8 ± 118,4 |
| ZAG | 0,40 ± 0,40 | 0,165 ± 0,060 | 0,027 ± 0,025 | 95 ± 6 | 112,3 ± 61,6 |
| SLV | 0,23 ± 0,09 | 0,174 ± 0,026 | 0,020 ± 0,008 | 80 ± 13 | 73,2 ± 60,0 |

4. Conclusões

As especificidades do uso da Fossa Séptica Biodigestora em cada propriedade e o tipo de inóculo influenciam a qualidade do efluente tratado. Dada a qualidade do efluente tratado (DBO, DQO, coliformes, sólidos etc.), o sedimento de brejo foi o inóculo que apresentou, até o presente momento, melhor desempenho no tratamento de esgoto no sistema, pelo qual pode ser um possível substituto ao esterco bovino. Pelas características gerais dos efluentes tratados analisados, o seu uso agrícola como fonte de nutrientes e água, deve levar a resultados semelhantes àqueles observados com efluentes de sistemas inoculados com esterco bovino. A confirmação das tendências apresentadas nesse trabalho ocorrerá após o período de 12 meses (dez-2019/jan-2020), para avaliação da eficiência de tratamento nas diferentes condições climáticas do ano e avaliação do comportamento dos parâmetros.

Agradecimentos

À Fundação Banco do Brasil pelo apoio financeiro (Projeto 16977 / SEG-Embrapa 10.18.00.033.00.00) e aos produtores rurais, Luiz Donizetti Marcatto, José Zago e Edinaldo Barros da Silva pela disposição e comprometimento com a tecnologia e o projeto.

Referências

- APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd. ed. Washington, D.C.: APHA, 2017.
- BODELIER, P. L. E.; DEDYSH, S. N. Microbiology of wetlands. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. APR, 2013.
- FAUSTINO, A. S. **Estudos Físico-químicos do Efluente Produzido por Fossa Séptica Biodigestora e o Impacto do seu Uso no Solo**. 2007. Universidade Federal de São Carlos, 2007.
- GALINDO, N.; SILVA, W. T. L.; NOVAES, A. P.; GODOY, L. A.; SOARES, M. T. S.; GALVANI, F. **Perguntas e Respostas: Fossa Séptica Biodigestora**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2010.
- HACH COMPANY. **Water Analysis Handbook**. 2nd. ed. Loveland: Hach Company, 1992.
- NOVAES, A. P.; SIMÕES, M. L.; INAMASU, R. Y.; JESUS, E. A. P.; MARTIN-NETO, L.; SANTIAGO, G.; DA SILVA, W. T. L. Saneamento Básico na Área Rural. In: SPADOTTO, C.; RIBEIRO, W. (Ed.). **Gestão de Resíduos na Agricultura e na Agroindústria**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2006. p. 262 – 275.
- NOVAES, A. P.; SIMÕES, M. L.; MARTIN-NETO, L.; CRUVINEL, P. E.; SANTANA, A.; NOVOTNY, E. H.; SANTIAGO, G.; NOGUEIRA, A. R. A. **Utilização de uma fossa séptica para melhoria do saneamento rural e desenvolvimento da agricultura orgânica**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2002.
- SILVA, W. T. L. da; FAUSTINO, A. S.; NOVAES, A. P. de. **Eficiência do Processo de Biodigestão em Fossa Séptica Biodigestora Inoculada com Esterco de Ovino**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2007.
- SILVA, W. T. L. da; MARMO, C. R.; LEONEL, L. F. **Memorial Descritivo: Montagem e Operação da Fossa Séptica Biodigestora**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017.
- TORRES, I. C.; INGLET, K. S.; REDDY, K. R. Heterotrophic microbial activity in lake sediments: Effects of organic electron donors. **Biogeochemistry**, v. 104, n. 1–3, p. 165–181, 2011.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE FIBRAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR QUIMICAMENTE MODIFICADASR. G. Lazarini^{1,*}, J. M. Marconcini¹¹ *Embrapa Instrumentação, Rua 15 de Novembro, 1452, 13561-206, São Carlos, SP*^{*} *Autor correspondente, e-mail: rafaelglazarini@gmail.com*

Resumo: O bagaço da cana-de-açúcar constitui hoje um resíduo de grande volume na agroindústria nacional, mas com enorme potencial de aplicação em novos materiais como compósitos com matrizes poliméricas. De forma a melhorar a compatibilização com plásticos apolares para estas aplicações, tratamentos químicos podem ser feitos para modificar a estrutura lignocelulósica e a superfície das fibras de bagaço, podendo estes serem alcalinos ou ácidos. Este trabalho buscou analisar o efeito de tratamentos com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico em diferentes concentrações (0,25 a 2,0 mol/L) sobre fibras de bagaço de cana-de-açúcar, por meio de caracterizações por difratometria de raios X (DRX) e espectroscopia no infravermelho (FTIR). Observou-se que tanto os tratamentos alcalinos quanto os ácidos aumentaram a cristalinidade das fibras, uma vez que parece ter havido remoção parcial de lignina e hemicelulose bem como fase amorfa da celulose. O efeito dos tratamentos alcalinos foi mais evidente, sendo que a cristalinidade ultrapassou 62% em baixa concentração, e os grupos químicos superficiais O-H da celulose ficaram mais expostos. De modo geral, tratamentos brandos dos dois tipos geraram resultados satisfatórios.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, fibras naturais, tratamento químico, mercerização, cristalinidade

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CHEMICALLY MODIFIED SUGARCANE BAGASSE FIBERS

Abstract: Sugarcane bagasse nowadays represents a large volume residue in the national agribusiness, but has enormous potential for application in new materials such as polymer matrix composites. In order to improve compatibility with nonpolar plastics for these applications, chemical treatments (alkaline or acidic) may be made to modify the lignocellulosic structure and surface of the bagasse fibers. This study aimed to analyze the effect of treatments with sodium hydroxide and sulfuric acid in different concentrations (0.25 to 2.0 mol/L) on sugarcane bagasse fibers, by characterization by X-ray diffraction (XRD) and infrared spectroscopy (FTIR). Both alkaline and acid treatments increased the crystallinity of the fibers, since there seems to have been partial removal of lignin and hemicellulose as well as the amorphous phase of the cellulose. The effect of alkaline treatments was more evident, with crystallinity exceeding 62% at low concentration, and the surface O-H chemical groups of cellulose were more exposed. Overall, mild treatments of both types yielded satisfactory results.

Keywords: sugarcane bagasse, natural fibers, chemical treatment, mercerization, crystallinity

1. Introdução

Em virtude de sua grande variedade de espécies disponíveis, o Brasil apresenta um grande potencial de fontes de recursos renováveis. Diversas fibras naturais são produzidas em todo país, com diferentes propriedades químicas, físicas e mecânicas. As principais características vantajosas das fibras naturais são a biodegradabilidade baixa densidade e baixo custo quando comparadas com materiais similares nessa mesma área de aplicação (MALKAPURAM et al., 2009). Uma matéria-prima abundante e com potencial de uso para obtenção de compósitos são as fibras de bagaço de cana-de-açúcar. No Brasil, a estimativa de produção de bagaço como subproduto agrícola é de 200 milhões de toneladas compondo grande volume que poderia ser utilizado como matéria-prima na

confeção de novos materiais (CONAB, 2018).

Compósitos poliméricos termoplásticos reforçados com fibras vegetais se tornaram uma alternativa àqueles reforçados com fibra de vidro, por exemplo, há algum tempo, devido ao alto custo das fibras sintéticas e a necessidade de aplicar recursos renováveis e não poluentes (DE PAOLI, 2002; HOLBERRY & HOUSTON, 2006). Além disso, a produção de nanofibras e nanocristais de celulose para incorporação em compósitos vêm ganhando espaço, dado diferentes propriedades podem ser obtida a partir de uma matéria-prima vegetal como o bagaço de cana de acordo com os processos utilizados (SILVA et al., 2009).

No caso de compósitos de matrizes poliolefinicas, a incompatibilidade devido à diferença na polaridade entre as fibras lignocelulósicas e o polímero é um dos desafios na pesquisa desses materiais, que focam em buscar melhor adesão entre as fases de modo a aumentar a eficiência na transferência de tensões e, conseqüentemente, melhorar as propriedades finais do compósito. Diferentes tratamentos superficiais fibras são propostos de modo a melhorar a adesão na interface matriz-fibra, sendo dois destacados: tratamento alcalino (mercerização) e tratamento ácido.

A mercerização provoca uma diminuição do grau de agregação das fibras devido ao rompimento de ligações de hidrogênio entre as cadeias celulósicas vizinhas, o que resulta em um rearranjo dos feixes de fibra, aumentando a superfície de contato. As fibras se tornam mais ásperas, o que favorece seu ancoramento na matriz polimérica (GOMES et al., 2004). Os álcalis exercem grande influência sobre a lignina, removendo-a consideravelmente (MARQUES et al., 2015). Já o tratamento ácido age rompendo a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização dos carboidratos em meio ácido, agindo na digestão das hemiceluloses, mas secundariamente causa despolimerização da celulose majoritariamente em sua fase amorfa (RABELO, 2010).

Com o objetivo de otimizar pré-tratamentos químicos de processos posteriores como a formulação de compósitos e produção de nanocelulose, este trabalho buscou avaliar o efeito de diferentes soluções ácidas e alcalinas em fibras de bagaço de cana-de-açúcar observando as mudanças na estrutura cristalina da celulose e nos grupos químicos presentes em suas moléculas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais utilizados

Neste trabalho, utilizou-se como matéria-prima o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* após moagem de extração do caldo na Usina Ipiranga Agroindustrial, de Descalvado/SP. Foram utilizados como reagentes para os tratamentos químicos ácido sulfúrico (H_2SO_4) da Sigma-Aldrich (pureza de 95-98%) e hidróxido de sódio (NaOH) da Synth (pureza de 98%).

2.2. Metodologia

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi peneirado de modo a se separar a fibra da medula e de outros possíveis resíduos do processo de moagem. Para isso, a fração de fibra utilizada foi aquela que passou por uma peneira de 5 mesh e foi retida em uma peneira de 18 mesh. As fibras foram lavadas com água quente (60-70°C), na proporção 20:1 fibra/água (em massa), e posteriormente secas em estufa de circulação de ar a 60°C por 24 h. Alíquotas de 5 g de fibras foram separadas para cada tratamento químico realizado conforme indica a tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos químicos realizados

| Tipo de tratamento | Nome da amostra | Concentração | |
|-------------------------------------|-----------------|--------------|------------|
| Fibra não tratada | NT | - | |
| Tratamentos ácidos (H_2SO_4) | H1 | 1,33% v/v | 0,25 mol/L |
| | H2 | 2,66% v/v | 0,5 mol/L |
| | H5 | 5,33% v/v | 1,0 mol/L |
| | H11 | 10,66% v/v | 2,0 mol/L |
| Tratamentos alcalinos (NaOH) | Na1 | 1% m/v | 0,25 mol/L |
| | Na2 | 2% m/v | 0,5 mol/L |
| | Na4 | 4% m/v | 1,0 mol/L |
| | Na8 | 8% m/v | 2,0 mol/L |

Cada amostra então foi adicionada à solução correspondente ao tratamento na proporção de 20:1 fibra/solução (em massa), permanecendo em agitação por 1 h a 60°C. Após o tratamento, as fibras foram lavadas até neutralização. Por fim, os materiais foram novamente secos e moídos em moinho de facas até tamanhos de 30 mesh para as posteriores caracterizações.

As fibras tratadas e não tratadas foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), em triplicata, e por difratometria de raios-X (DRX). A análise de FTIR foi feita no modo de Refletância Total Atenuada (ATR) com 64 varreduras por amostra, na região de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 2 cm^{-1} . Os difratogramas de raios-X foram obtidos varrendo ângulos 2θ entre 5 e 40°, com velocidade de varredura de 1° min^{-1} . Os índices de cristalinidades da celulose (I_c) das fibras vegetais foram obtidos utilizando-se o método de Segal (SEGAL et al., 1959), baseado na medida da intensidade da reflexão do plano cristalino 002, normalizada pelo mínimo amorfo de referência, calculado conforme a eq. 1, onde I_1 é o mínimo local de difração (região amorfa) e I_2 é o pico corresponde ao plano cristalino 002 da celulose.

$$I_c = \frac{I_2 - I_1}{I_2} \times 100\% \quad (1)$$

3. Resultados e Discussão

As fibras de bagaço de cana-de-açúcar, como toda fibra lignocelulósica, pode ser representada por uma matriz de lignina, amorfa, ligada a fibrilas de celulose por meio da hemicelulose. A celulose, por sua vez, é semicristalina, sendo possível observar sua estrutura cristalina (tipo I) através de difração de raios X. Os difratogramas das fibras de bagaço de cana estão representados na figura 1. Através destes, é possível detectar duas reflexões mais intensas, correspondentes aos planos 002 e 101 nos ângulos de 22,4° e 15,5°, aproximadamente. Tanto para os tratamentos ácidos quanto para os básicos não há diferença significativa em questões estruturais em relação à fibra não tratada. Não é possível notar, a princípio, deslocamentos, surgimentos e desaparecimento de planos cristalinos. Mesmo para tratamentos alcalinos mais fortes não houve alteração da estrutura da celulose do tipo para o tipo II.

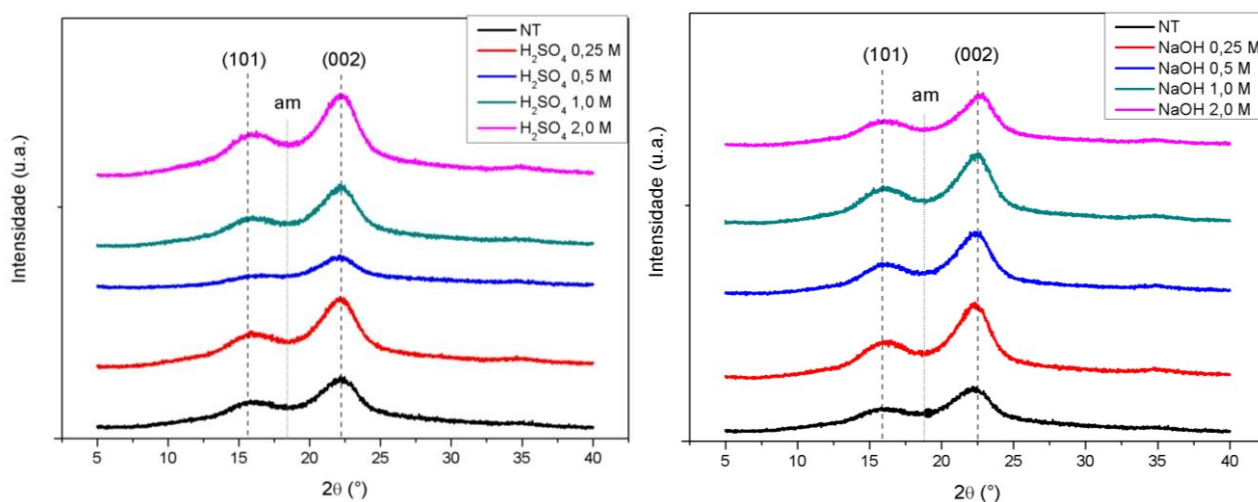


Figura 1. Difratogramas de raios X obtidos para os diferentes tratamentos em meio ácido (esq.) e em meio alcalino (dir.)

Porém, é possível notar um aumento na diferença de altura entre as reflexões cristalinas e a região amorfa, o que indica um aumento na cristalinidade total da fibra. A tabela 2 mostra os índices de cristalinidade calculados.

Tabela 2. Índices de cristalinidade das fibras para os diferentes tratamentos

| Tratamento | Concentração (mol/L) | I _c (%) |
|---|----------------------|--------------------|
| NT | - | 52,6 |
| | 0,25 | 58,6 |
| Ácido (H ₂ SO ₄) | 0,5 | 59,2 |
| | 1,0 | 58,6 |
| | 2,0 | 57,5 |
| | 0,25 | 62,1 |
| Básico (NaOH) | 0,5 | 62,7 |
| | 1,0 | 64,2 |
| | 2,0 | 63,8 |

Conforme esperado, os tratamentos ácidos aumentaram a cristalinidade das fibras, atingindo valor máximo na concentração de 0,5 mol/L, uma vez que sua ação principal é a hidrólise de carboidratos, isto é, hemicelulose e a fração amorfa da celulose. A partir de altas concentrações, a cinética de hidrólise é também capaz de digerir a fase cristalina da celulose. Além disso, os tratamentos alcalinos também elevaram o índice de cristalinidade, mais acentuadamente que os tratamentos ácidos, dado que removem grande parte da lignina, que é amorfa, aumentando a fração de cristais de celulose no total da amostra. Novamente, o índice de cristalinidade aumentou com a concentração de NaOH, atingindo seu máximo em 1,0 mol/L.

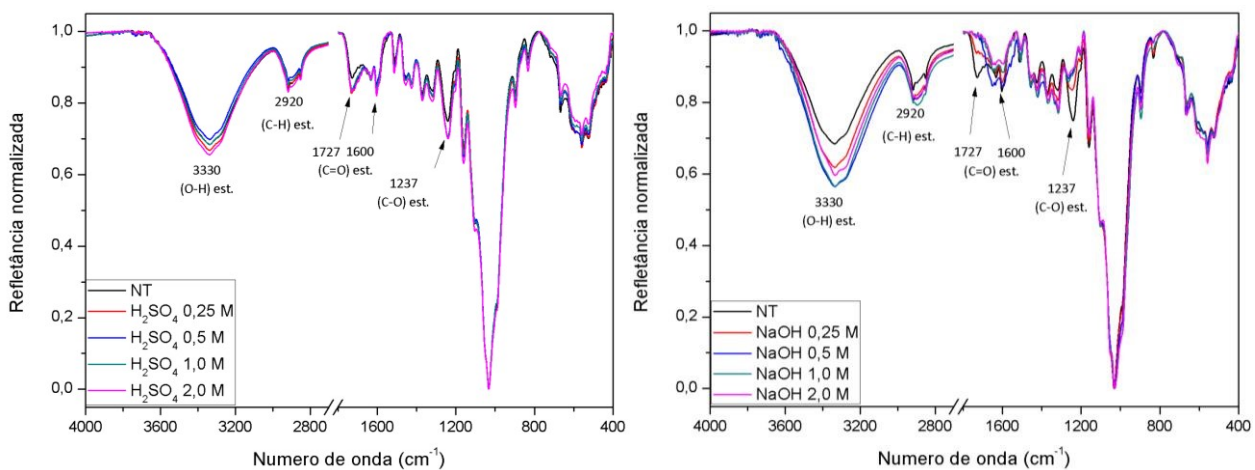


Figura 2. Espectros de infravermelho das fibras tratadas com solução ácida (esq.) e alcalina (dir.).

Do ponto de vista químico, é possível avaliar o efeito dos tratamentos nas ligações químicas presentes nas fibras através dos espectros de infravermelho, mostrados na figura 2. As principais bandas e os modos vibracionais de ligações químicas a que estas se referem estão indicados.

Para os espectros das fibras tratadas com ácido, poucas bandas possuem variações evidentes. As bandas na região de 3330 e de 2920 cm⁻¹ tiveram pequenos aumentos gradativos com o aumento da concentração. Já nos espectros das fibras que sofreram tratamentos alcalinos, mudanças químicas são mais perceptíveis. Há aumento considerável na intensidade da banda a 3330 cm⁻¹ com o aumento da concentração de álcali, o que mostra uma maior exposição de grupos hidroxila da celulose na superfície das fibras promovido pela remoção da lignina e extrativos. Além disso, reduções significativas nas bandas a 1727 e 1600 cm⁻¹, correspondentes a ligações C=O de aldeídos conjugadas e não conjugadas, mostram remoção de hemicelulose e lignina, respectivamente. Por fim, a banda a 1237 cm⁻¹ correspondente a ligações C-O de ésteres alquila-árida é fortemente reduzida com o aumento da concentração de hidróxido, o que evidencia novamente a remoção de lignina da estrutura lignocelulósica das fibras (SIMÃO et al., 2016).

4. Conclusões

Após realizar a varredura de concentrações de tratamentos ácidos e alcalinos, é possível notar que estes não geram mudanças na estrutura cristalina da celulose, porém houve aumento no índice de cristalinidade com o aumento da concentração das soluções, em especial para os tratamentos com hidróxido de sódio. A análise espectroscópica mostrou que alguns grupos químicos ficaram mais expostos e outros foram reduzidos com os tratamentos, porém os efeitos dos tratamentos alcalinos na remoção de lignina ficam mais evidentes, enquanto é possível notar que os tratamentos ácidos agem de forma sutil na fração amorfa da celulose e na hemicelulose nas concentrações testadas. De modo geral, os tratamentos com NaOH e H₂SO₄ em concentrações tão baixas quanto 0,25 mol/L já promovem os efeitos desejados para melhoria de propriedades de compatibilização em compósitos poliméricos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia aplicada ao Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação e à Rede Agronano pela infraestrutura e apoio cedidos.

Referências

- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-açúcar**. v. 5, safra 2018/19, n. 2, p. 1-86. Brasília, 2018.
- DE PAOLI, M. A. Substituição de Fibra de Vidro por Fibras Vegetais, in: **6º Seminário das Comissões Técnicas da ABPol**, 2002.
- GOMES, A.; GODA, K.; OHGI, J. Effects of alkali treatments to reinforcement on tensile properties of curaua fiber green composites. **JSME International Journal**, series A, v.47, n.4, p. 541-546, 2004.
- HOLBERY, J.; HOUSTON, D. Natural Fiber Reinforced Polymer Composites in Automotive Applications. **JOM**. v. 58, n. 11, p. 80-86, 2006.
- MALKAPURAM, R.; KUMAR, V.; YUVRAJ, S.N. Recent development in natural fibre reinforced polypropylene composites. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, v. 28, n.10, p. 1169–1189, 2009.
- MARQUES, M. F. V. et al. Improvement of mechanical properties of natural fiber–polypropylene composites using successive alkaline treatments. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 12, 2015.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.
- SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.
- SIMÃO, José Alexandre et al. Effect of fiber treatment condition and coupling agent on the mechanical and thermal properties in highly filled composites of sugarcane bagasse fiber/PP. **Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 746-751, 2016.