



XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

Secagem de Conídios de *Trichoderma harzianum* LCB47 por Atomização: Efeito da Temperatura de Entrada e do Teor de Encapsulante

Virna Luiza de Farias^{1,2}, Natália Lima de Oliveira^{1,3}, Fabiano André Narciso Fernandes², Gustavo Adolfo Saavedra Pinto¹.

¹Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, CEP: 60511-110 Fortaleza, CE, Brasil – e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

²Universidade Federal do Ceará - Departamento de Engenharia Química

³Universidade Federal do Ceará - Departamento de Tecnologia de Alimentos

RESUMO

T. harzianum é uma das espécies mais utilizadas no controle biológico de fungos fitopatogênicos. A desidratação dos conídios permite sua preservação por um longo período de tempo, e um dos métodos utilizados para a secagem é a atomização. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de maltodextrina adicionado à suspensão de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB47 no seu nível de sobrevivência e na umidade e atividade de água do material final em pó. A temperatura de entrada influenciou o nível de sobrevivência dos conídios, umidade e atividade de água do material em pó obtido, enquanto o teor de encapsulante influenciou o nível de sobrevivência e atividade de água do produto em pó, mas não influenciou sua umidade. O maior nível de sobrevivência (96%) foi alcançado utilizando-se temperatura de entrada de 140°C e 8% de maltodextrina.

Palavras-chave: Controle biológico, “spray dryer”, maltodextrina

INTRODUÇÃO

Trichoderma spp. têm ganhado profunda aceitação como efetivos agentes de controle biológico contra vários fitopatógenos comerciais. Estes fungos antagonistas são os mais comuns entre os agentes fúngicos de biocontrole devido a suas múltiplas características de agentes de biocontrole, chamadas antagonismo e estimulação do crescimento de plantas (VERMA *et al.*, 2007). *T. harzianum* vem sendo aceito como um dos agentes de biocontrole mais potentes contra doenças de plantas (TSENG *et al.*, 2008).

Para o controle biológico, é importante guardar a unidade ativa em um estágio infeccioso, contudo dormente, seguro e fácil para aplicação. A chave para prolongar sua sobrevivência é parar a germinação e reduzir o metabolismo ao máximo, o que é possível através da desidratação (HORACZEK; VIERNSTEIN, 2004). O benefício da secagem de conídios é a redução da sua atividade metabólica, o que minimiza a perda das reservas de armazenamento e a produção de metabólitos tóxicos (GUIJARRO *et al.*, 2006).



A secagem por atomização ou “spray drying” tem sido reportada como eficiente para secagem de conídios, uma vez que diminui a perda durante o processo de secagem e melhora a estabilidade do fungo durante seu armazenamento (GAVA, 2006). Nesta técnica, uma suspensão aquosa é atomizada para formar finas gotículas, posteriormente aspergidas em uma corrente de ar quente em paralelo ou contracorrente em uma câmara de secagem (FELLOWS, 2006) para instantaneamente se obter um pó (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

A atomização é a técnica mais comum e barata para a produção de produtos microencapsulados (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007), sendo a maltodextrina um dos encapsulantes mais freqüentemente utilizados nesse processo (BARROS e STRINGHETA, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de maltodextrina adicionado à suspensão de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB47 no seu nível de sobrevivência e na umidade e atividade de água do material em pó, após secagem em “spray dryer”.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: Foi utilizada uma linhagem de *Trichoderma harzianum* LCB47, transferido do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Semi-Árido, Petrolina/PE.

Produção de inóculo: Utilizou-se Erlenmeyers de 125 mL contendo meio de cultura, constituído de 4,6 g de farelo de trigo e 6 mL de solução de peptona 5,6%, previamente autoclavado a 121°C/15min. O inóculo foi removido do meio através de extração com 50 mL de solução 0,3% (v/v) de Tween 80.

Produção dos conídios em maior escala: Utilizou-se meio farelo de trigo, constituído de farelo e água na proporção de 1:2, que segundo Cavalcante *et al.* (2008) é adequado para a produção de conídios de fungo do gênero *Trichoderma*. 40g do meio farelo de trigo foram pesados em Erlenmeyers de 500 mL, autoclavados a 121°C/15 min e após resfriados, foram inoculados $1,0 \times 10^6$ conídios/g de meio. Os meios inoculados foram incubados em estufa biológica a 30°C por 120 a 168 horas.

Obtenção e preparo da suspensão de conídios: A partir do meio farelo de trigo foram realizadas duas extrações sucessivas com 50mL de água destilada estéril, para cada Erlenmeyer, obtendo-se então a suspensão de conídios. Às suspensões recuperadas, adicionou-se maltodextrina dextrose equivalente 10 (DE 10), que foi utilizada como agente encapsulante, e em seguida, a solução foi homogeneizada em homogeneizador de tecidos Ação Científica, modelo AC 620/2, até completa dissolução da maltodextrina.

Condições de secagem no spray dryer: A secagem da suspensão foi conduzida em Mini Spray Dryer Büchi B-290, com fluxo de secagem concorrente, capacidade máxima de secagem de 1,0 L de água por hora e bico atomizador de duplo fluido de 0,7 mm de diâmetro (BÜCHI, 2005).

Para analisar os efeitos da temperatura de entrada do ar de secagem e do teor de encapsulante adicionado à suspensão de conídios, foi montado um delineamento composto central rotacional (Tabela 1).



XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

Tabela 1 - Valores dos parâmetros de cada experimento do planejamento

Temperatura (°C)		Teor de encapsulante (% m/v)	Vazão de alimentação da suspensão (%)	Aspiração (%)	Vazão de ar comprimido (L.h ⁻¹)
Entrada	Saída				
120	55	6,0	37	100	742
120	55	10,0	35	100	742
160	55	6,0	73	100	742
160	55	10,0	75	100	742
112	55	8,0	30	100	742
168	55	8,0	65	100	742
140	55	5,2	47	100	742
140	55	10,8	47	100	742
140	55	8,0	55	100	742
140	55	8,0	54	100	742

Foram fixados os parâmetros fluxo de ar comprimido, que foi de 742 L.h⁻¹, e velocidade do aspirador, que foi de 100%. A vazão de alimentação da suspensão foi ajustada em cada experimento, de forma a estabelecer a temperatura de saída em 55°C para todos os testes realizados.

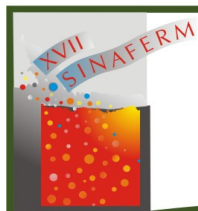
Sólidos solúveis totais: Determinados na suspensão recém-extraída do meio farelo de trigo em refratômetro digital Atago, modelo PR-101. O teor de sólidos solúveis totais da suspensão, antes da adição do encapsulante, foi fixado em 2,0°Brix (2,0%) para todos os experimentos.

Viabilidade: Determinada pela quantidade de conídios germinados e não germinados em placas de Petri contendo meio ágar água (WA) com suspensão comercial concentrada de tiobendazol (485 g.L⁻¹) fornecido por Novartis Biociências S.A (Tecto SC), após 24 horas de incubação a 21°C no escuro. 0,1 mL da suspensão foram semeadas nas placas, e após o tempo de incubação, aproximadamente 1mL de solução lacto-glicérica de azul de anilina foram adicionadas e espalhadas delicadamente por toda a superfície das placas. Foram considerados germinados, os conídios com hifas iguais ou maiores que seu tamanho (HORACZEK e VIERNSTEIN, 2004).

Nível de sobrevivência: Expresso como o quociente dos conídios germinados antes (N₀) e após (N₁) o processo de secagem. Nível de sobrevivência = (N₁/ N₀) x 100 (HORACZEK e VIERNSTEIN, 2004).

Atividade de água (Aw): Determinado no produto em pó por leitura direta em aparelho Aqualab modelo CX-2 – Decagon.

Umidade: Determinado no pó obtido da secagem, segundo metodologia 012/IV (IAL, 2004).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em condições de maior teor de encapsulante, menor foi o efeito da temperatura de entrada do ar no nível de sobrevivência dos conídios (Tabela 2). Quando o teor de maltodextrina adicionado à suspensão de conídios foi de 6%, o aumento da temperatura de entrada de 120°C para 160°C resultou em redução de 13% no nível de sobrevivência, enquanto com 10% de maltodextrina, para a mesma variação de temperatura, o nível de sobrevivência dos conídios se manteve estável. Este fato indica a capacidade do encapsulante de proteger os conídios do calor durante a secagem, reduzindo sua perda de viabilidade. Isso foi observado porque, apesar de não significativo a 5% de significância, o fator linear do teor de encapsulante foi o mais importante na determinação da resposta em estudo, e porque este fator afeta positivamente o nível de sobrevivência dos conídios (Tabela 3).

Tabela 2 - Nível de sobrevivência dos conídios, e umidade e atividade de água do pó resultante das condições de secagem do planejamento experimental.

Temperatura de entrada (°C)	Teor de encapsulante (% m/v)	Viabilidade (%)		Nível de sobrevivência (%)	Umidade (%)*	Aw*
		Antes*	Depois*			
120	6	26,0	20,0	77	7,67	0,410
120	10	26,3	24,3	92	8,12	0,500
160	6	30,3	20,3	67	10,69	0,610
160	10	27,0	25,0	93	11,16	0,620
112	8	63,7	40,7	64	7,16	0,448
168	8	34,7	33,0	95	11,37	0,617
140	5,2	43,3	35,0	81	9,69	0,507
140	10,8	37,7	35,7	95	8,78	0,549
140	8	21,7	20,0	92	9,38	0,543
140	8	24,0	23,7	99	8,70	0,483

* Média dos experimentos conduzidos em triplicata

Com relação à temperatura de entrada do ar, apenas seu fator quadrático se mostrou importante na determinação do nível de sobrevivência, com nível de confiança de 84% (Tabela 3).



Tabela 3 - Dados estatísticos com relação ao nível de sobrevivência dos conídios.

Fator	Efeito			p		
	NS	Umidade	Aw	NS	Umidade	Aw
Média/interação	95,50	9,04	0,51	<0,001	<0,001	<0,001
(1)T entrada (°C)(L)	8,71	3,00	0,14	0,303	<0,001	0,002
T entrada (°C)(Q)	-16,75	0,30	0,02	0,161	0,528	0,432
(2)Encapsulante (%) (L)	15,20	-0,09	0,04	0,108	0,797	0,103
Encapsulante (%) (Q)	-8,25	0,28	0,02	0,445	0,567	0,526
1L × 2L	5,50	0,01	-0,04	0,626	0,984	0,210

(L) Fator linear, (Q) Fator quadrático, NS: Nível de sobrevivência, Aw: atividade de água.

A um nível de confiança de 95%, o efeito linear da temperatura de entrada do ar de secagem foi o único parâmetro significativo na umidade final do pó obtido (Tabela 3). A temperatura de saída do produto é controlada pelo ajuste de parâmetros como o fluxo de ar e a aspiração, que nesse caso foram constantes em todos os experimentos, e a vazão de alimentação da bomba, que foi o parâmetro variável. Dessa forma, foi necessária uma maior vazão de suspensão de conídios (70%) para a temperatura de entrada do ar de 160°C do que para a de 120°C (35%), para a obtenção de produto com temperatura final de 55°C em ambos os experimentos (Tabela 1). Por isso, na condição de maior temperatura de entrada do ar, a remoção de água da suspensão na forma de gotículas foi menor, resultando em maior umidade residual. Isso explica o efeito positivo entre a temperatura de entrada e a umidade do pó (Tabela 3). O teor de encapsulante não foi um parâmetro significativo com relação à umidade do produto final (Tabela 3).

Larena, De Cal e Melgarejo (2007) citam trabalhos onde o conteúdo de umidade elevado do produto pode ter sido a causa de mudanças ocorridas na viabilidade durante a estocagem. Alta umidade leva o microrganismo a quebrar a dormência antecipadamente e propicia o crescimento de contaminantes.

Quanto à atividade de água, o fator linear temperatura de entrada do ar de secagem foi o único significativo, apresentando nível de confiança de 99,8%, e correlação positiva com a resposta analisada (Tabela 3). Apesar de não significativo, o fator linear do teor de encapsulante foi importante na determinação da atividade de água do produto final, com nível de confiança de aproximadamente 90%.

CONCLUSÕES

A temperatura de entrada foi importante na determinação do nível de sobrevivência dos conídios e foi um fator significativo na umidade e atividade de água do material em pó obtido. O teor de encapsulante também foi um parâmetro importante no nível de sobrevivência e na atividade de água do produto em pó, mas não apresentou influência na sua umidade. A condição de temperatura de entrada de 140°C e adição de 8% de maltodextrina à suspensão de conídios foi a que resultou em maior nível de sobrevivência dos conídios (96%).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Büchi (2005), *Manuel d'instructions atomisateur de séchage B-290*.

Cavalcante, R. S.; Lima, H. L. S.; Pinto, G. A. S.; Gava, C. A. T. e Rodrigues, S. (2008), Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technology*, v.1, p.100–104.

Barros, F. A. R. e Stringheta, P. C. (2006), Microencapsulamento de antocianinas: Uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.36, n.36, p.18-24.

Fellows, P. J. (2006), *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática*. 2ª ed, Porto Alegre: Artmed, p. 342.

Gava, C. A. T. (2006), Projeto de pesquisa: Desenvolvimento de formulações de biofungicidas com alta estabilidade para o manejo integrado de doenças de fruteiras tropicais. Petrolina-PE.

Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A. e Saurel, R. (2007), Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, v.40, p. 1107–1121.

Guijarro, B.; Larena, I.; Melgarejo, P. e De Cal, A. (2006), Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach Brown rot disease caused by *Monilinia* spp. *Biocontrol Science and Technology*, v.16, p.257-269.

Horaczek, A. e Viernstein, H. (2004), Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*, *Biological Control*, v.31, p.65-71.

Instituto Adolfo Lutz. (2004), *Normas Analíticas: Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. IAL: São Paulo, 4. ed. 1004 p.

Larena, I.; De Cal, A. e Melgarejo, P. (2007), Effects of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of postharvest brown rot by *Monilinia* of peaches. *Journal of Applied Microbiology*, v.102, p.570–582.

Tseng, S. C.; Liu, S. Y.; Yang, H. H.; Lo, C. T. e Peng, K. C. (2008), Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.6914-6922.

Verma, M.; Brar, S. K.; Tyagi, R. D.; Surampalli R. Y. e Valéro, J. R. (2007), Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, v.37, p.1-20.