



**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOFERTILIZANTE ORGÂNICO A PARTIR DA
BIOMASSA DE ESPIRULINA (*SPIRULINA PLANTESIS*)**

LUCIANA R. **MONTEIRO**¹; NATACHA K. **IVANOV**²; VERA SÔNIA, **NUNES DA
SILVA**³; APARECIDA SÔNIA DE **SOUZA**⁴, MARCELO A. **MORGANO**⁴, GUILHERME
A. CANELLA **GOMES**⁵
Nº 11205

RESUMO

O fornecimento de uma solução fertilizante com elevado teor de aminoácidos livres à planta resulta numa absorção direta, aumentando assim o desenvolvimento da planta. Neste projeto efetuou-se a hidrólise enzimática da biomassa de espirulina, para formulação do biofertilizante e foram testadas as condições: hidrólise com tampão Fosfato em banho convencional e NH_4OH em *pH-stat*. O melhor resultado foi obtido na hidrólise com o *pH-stat*, com grau de hidrólise (GH) de 33,09% e rendimento em proteínas de 96,58%, este método, porém não oferece condições para produção em larga escala e, portanto, escolheu-se a segunda melhor condição de hidrólise, a hidrólise com tampão com G.H. de 16% e rendimento de proteína de 89%. Com o sistema hidrolítico definido, foram estudadas quatro enzimas (Brauzyn® 100, Alcalase®, Protezyn PM, Protex® 51 FP). Nos hidrolisados obtidos foram efetuadas as análises físico-químicas e a avaliação da eficiência agronômica.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, FAJ, Jaguariúna - SP,
lmonteiro@alimentos.eng.br

² Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.

³ Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP, vera.silva@ital.sp.gov.br

⁴ Colaborador: CCQA/ITAL, Campinas-SP.

⁵ Colaborador: IAC, Campinas-SP.



ABSTRACT

The supply of fertilizer solution with a high content of free amino acids to the plant results in direct absorption, thereby increasing plant growth. In this project we performed the enzymatic hydrolysis of biomass from spirulin. For formulation of the biofertilizer were tested conditions: hydrolysis with phosphate buffer bath conventional and NH_4OH at *pH-stat*. The best result was obtained in the hydrolysis with *pH-stat*, with a degree of hydrolysis (GH) of 33.09% and protein yield of 96.58%, this method, but does not provide conditions for large-scale production and therefore was chosen for the second best condition of hydrolysis, hydrolysis buffer with GH 16% yield and 89% protein. With the system set hydrolytic, four enzymes were studied (100 Brauzyn ®, Alcalase ®, Protezyn PM, Protex ® 51 PF). Hydrolysates were performed in the physical-chemical analysis and evaluation of agronomic efficiency.

INTRODUÇÃO

A agricultura orgânica enfatiza o uso de práticas de manejo em oposição ao uso de elementos estranhos ao meio rural, excluindo a adoção de substâncias químicas ou outros materiais sintéticos (Ricci & Neves, 2008). A adição de fertilizantes ricos em aminoácidos proporciona ao vegetal aumento no desenvolvimento do sistema radicular, desbloqueio de nutrientes, maior poder de germinação das sementes, aumento da síntese de clorofila, da atividade de enzimas e coenzimas (Durand et. al., 2003).

Na última década trabalhos científicos foram publicados divulgando os diversos compostos bioativos presentes em extratos de algas (Stadnik, 2003). No Brasil em 2004 foi regulamentado (Decreto nº 4.954) o uso de extrato de algas como fonte de biofertilizantes. O presente trabalho propõe-se a produzir um fertilizante organomineral, a partir da biomassa de espirulina, rico em aminoácidos livres para cultivos orgânicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da matéria-prima e dos hidrolisados

A espirulina (*Spirulina plantesis*) foi doada pela Fazenda Tamanduá. Foram realizadas análises da composição centesimal (AOAC, 2005), triptofano (SPIES, 1967), aminoácidos totais e livres (HAGEN, et. al. 1989; WHITE; HART; FRY, 1986) e minerais (SLAVIN; PETERSEN; LINDHAL, 1975).

Avaliação dos métodos de hidrólises

As condições de hidrólise foram estabelecidas com o uso da Alcalase®. A concentração inicial foi de 5% de substrato para 1% de enzima, pH 8 e temperatura de 60°C, por um período de 6 horas. Uma vez definidas as condições de hidrólise, utilizou-se as enzimas Brauzyn®, Protezyn PM, Protex® 51 FP e Alcalase®, na concentração de 8% de substrato para 2% de enzima por 6 horas de reação.

Avaliação da eficiência agrônômica dos hidrolisados sobre a germinação e o crescimento inicial das raízes de plântulas de milho e de soja

Para finalizar o projeto foi incluso a avaliação da eficiência agrônômica dos hidrolisados no cultivo de milho e soja. O experimento foi conduzido na câmara de germinação do Setor de Fitossanidade do IAC, pelo Dr. Guilherme A. C. Gomes. Foram incubadas 10g. de sementes de milho (DKB 240) e de soja (M6009RR) por 2 horas, em 10 mL dos seguintes extratos: T0=ÁGUA; BRAUZYNN (T1), ALCALASE (T2); PROTEZYNN (T3); PROTEX (T4); e como contraprova o NATURAMIN (T5) um extrato comercial de origem vegetal. Após 2 horas de incubação as sementes foram colocadas em caixa tipo gerbox e mantidas por 10 dias a 20°C e foto período de 12 horas. Passado este período foram avaliados o tamanho da raiz principal e números de raízes adventícias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da matéria-prima

Observa-se na Tabela 1 que a espirulina possui grande quantidade de proteína, além disso, possuem também excelente perfil de aminoácidos (Tabela 5), fatores determinantes para elaboração de hidrolisados enzimáticos de elevado potencial para produção de biofertilizantes foliares.

Tabela 1. Resultados da composição centesimal da espirulina.

DETERMINAÇÕES	RESULTADOS (g/100 g de amostra)*
Proteínas (NX6,25)	56,42 ± 0,06
Umidade	13,05 ± 0,07
Cinzas	9,93 ± 0,03
Lipídeos	0,65 ± 0,03
Fibra Alimentar Total	3,03 ± 0,10
Carboidratos**	16,92

*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em duplicata.**Calculados por diferença: 100 – (proteína + umidade + lipídeos totais + cinzas + Fibra alimentar total).

Os minerais (Tabela 2) como fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) apresentaram valores elevados, principalmente de potássio, a espirulina mostrou-se também rica em micronutrientes como Cobre (Cu), Zinco (Zn), Manganês (Mn), Ferro (Fe), os quais são utilizados na agricultura para suprir a necessidade da planta, e aplicados na forma de adubos foliares.

Tabela 2. Resultados da caracterização de aminoácidos totais e minerais da espirulina.

AMINOÁCIDOS TOTAIS (AAT)	(g/100 g)	MINERAIS (MN)	(mg/100g)*
Ác. Aspártico	5,53 ± 0,09	Enxofre	738,0 ± 18,4
Ác. Glutâmico	8,40 ± 0,11	Alumínio	1,480 ± 0,07
Serina	2,79 ± 0,08	Lítio	ND**
Glicina	3,13 ± 0,26	Cálcio	166,3 ± 1,9
Histidina	0,62 ± 0,03	Cobre	0,35 ± 0,03
Arginina	4,35 ± 0,04	Ferro	35,7 ± 1,2
Treonina	3,10 ± 0,10	Fósforo	777,6 ± 192
Alanina	4,60 ± 0,14	Potássio	2173,0 ± 37,1
Prolina	2,29 ± 0,02	Sódio	1516,6 ± 20,7
Tirosina	2,30 ± 0,01	Magnésio	258,8 ± 3,6
Valina	3,20 ± 0,18	Bário	62,2 ± 0,012
Metionina	0,84 ± 0,05	Cádmio	ND**
Cistina	0,29 ± 0,00	Cobalto	0,037 ± 0,001
Isoleucina	3,44 ± 0,16	Níquel	0,108 ± 0,006
Leucina	4,75 ± 0,14	Chumbo	0,032 ± 0,002
Fenilalanina	2,52 ± 0,05	Manganês	2,6 ± 0,1
Lisina	2,37 ± 0,02	Crômio	0,057 ± 0,001
Triptofano	0,69 ± 0,03	Zinco	0,815 ± 0,027
Total de AAT	54,52 ± 1,13	Total de MN	5733,68

*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em duplicata. **ND: Não Detectado.

Avaliação dos métodos de hidrólise

A Tabela 3, mostra que a hidrólise feita em *pH-stat* (D), apresentou GH de 33,09% superior às hidrólises A, B e C. A hidrólise com o tampão fosfato de potássio, GH 21,96% e rendimento de proteína de 89,21%. No Entanto, o segundo método permitiu a produção de um volume maior de hidrolisado, sendo este o escolhido. O teor de cinzas foi de 3,61 %, na hidrólise com tampão, devido ao aumento dos teores de fósforo e potássio oriundos do tampão.

Tabela 3. Resultados dos diferentes métodos de hidrólise enzimática.

Parâmetros de Hidrólise	G.H. (%)*	Rendimento (%)	Umidade (%)*	Cinzas (%)*
Sem Controle de pH (A)	16,57 ± 1,28 ^c	75,63	92,51 ± 0,16 ^b	0,79 ± 0,02 ^c
Com Controle de pH (B)	17,41 ± 1,34 ^c	70,87	94,65 ± 0,13 ^a	0,61 ± 0,03 ^d
Tampão Fosf. Potássio (C)	21,96 ± 4,52 ^b	89,21	90,22 ± 0,03 ^c	3,61 ± 0,02 ^a
pH – stat (D)	33,09 ± 3,99 ^a	96,58	87,25 ± 0,07 ^d	1,15 ± 0,02 ^b

*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em quadruplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Enzima: Alcalase (60°C / pH 8,0 / 6 horas).

Avaliação das diferentes enzimas

Os teores de proteína dos hidrolisados (Tabela 4), com as enzimas Brauzyn® (36,30%) e Protex® (32,92%), não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), sendo estes mais elevados quando comparados aos hidrolisados com as enzimas Alcalase® (28,04%) e Protezyna PM (23,56%).

Tabela 4. Resultados das análises dos hidrolisados.

PARÂMETROS AVALIADOS	ENZIMAS PROTEOLÍTICAS			
	Brauzyn®	Alcalase®	Protezyna PM	Protex®
Proteína BS (NX5,75)(g/100g)	36,30 ± 0,26 ^a	28,04 ± 0,16 ^b	23,56 ± 0,05 ^c	32,92 ± 0,22 ^a
Cinzas BS (g/100 g)*	43,58 ± 0,97 ^d	54,69 ± 0,19 ^b	59,97 ± 0,13 ^a	49,97 ± 0,19 ^c
Umidade (g/100 g)*	94,60 ± 0,02 ^a	91,37 ± 0,01 ^c	90,59 ± 0,12 ^d	93,53 ± 0,01 ^b
Sólidos Totais (g/100 g)**	5,40	8,63	9,41	6,47
Grau de Hidrólise (%)*	9,31 ± 1,27 ^c	16,14 ± 0,48 ^a	11,30 ± 0,88 ^b	14,96 ± 0,35 ^a

*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em duplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). BS: Base Seca, ** Calculados por diferença: 100 – (proteína + umidade + lipídeos totais + cinzas + Fibra alimentar total).

Na Tabela 5, a hidrólise com a Protex® apresentou maior concentração de aminoácidos livres (433,49 mg/mL). Os resultados estão de acordo aos encontrados para o GH (Tabela 4).

Tabela 5. Resultados de aminoácidos livres das hidrólises com diferentes enzimas.

Aminoácidos Livres	Resultados (mg/100mL)				
	Brauzyn®	Alcalase®	Protezyna PM	Protex®	Naturamin
Ác. Aspártico	4,03	3,41	3,23	8,76	7,80
Ác. Glutâmico	53,97	58,70	42,09	70,99	11,80
Serina	1,10	5,13	4,58	4,00	14,20
Glicina	3,24	5,91	2,90	6,35	9,20
Histidina	ND**	6,42	2,24	12,63	1,90
Arginina	2,93	4,29	2,47	41,51	7,00
Treonina	5,17	15,61	8,96	20,22	5,70
Alanina	23,36	33,01	23,28	39,30	5,70
Prolina	1,58	4,61	1,48	3,68	12,10
Tirosina	3,45	14,37	9,91	25,87	0,60
Valina	3,90	11,38	5,91	9,92	5,90
Metionina	ND**	10,43	5,59	5,37	0,90
Cistina	ND**	25,39	13,94	16,78	0,90
Isoleucina	3,10	11,39	15,88	27,34	3,90
Leucina	4,85	27,88	13,92	70,87	6,70
Fenilalanina	4,31	13,18	10,62	46,07	5,80
Triptofano	0,43	1,54	1,07	6,74	5,90
Lisina	2,20	5,13	1,66	17,08	1,50
Soma de AA	117,62	257,78	169,74	433,49	107,50

**ND: Não Detectado.

Na Tabela 6 observa-se que nas hidrólises onde se adicionou maior quantidade de tampão fosfato, os hidrolisados com Protezyn PM e Alcalase®, apresentaram maior quantidade de fósforo e potássio, o que já era esperado. A solução nutritiva de Sarruge (1975), a maioria dos minerais foram inferiores ao encontrados no hidrolisados obtidos no estudo exceto para Ca, Fe e Mn.

Tabela 6. Resultados de minerais das hidrólises com diferentes enzimas

Minerais	Resultados (mg/L)				Solução de Sarruge (1975)
	Brauzyn®	Alcalase®	Protezyn PM	Protex®	
Cálcio	20,3 (0,3)*	15,4(1,4)*	29(2)*	17(1)*	200,4
Cobre	0,067(0,000)*	0,098(0,002)*	0,074(0,005)*	0,087(0,000)*	0,039
Ferro	1,7(0,03)*	0,572(0,025)*	0,64(0,05)*	1,798(0,003)*	5,0
Fósforo	4916(61)*	11773(68)*	14237(146)*	7396(106)*	31,0
Potássio	10064(135)*	22421(160)*	24623(273)*	14301(358)*	234,6
Sódio	889(13)*	827(48)*	759(35)*	798(27)*	-
Magnésio	92,6(0,5)*	43(4)*	89(6)*	71(3)*	48,6
Bário	0,018(0,005)*	ND	ND	0,021(0,002)*	-
Cádmio	ND	ND	ND	ND	-
Cobalto	ND	0,016(0,001)*	0,014(0,001)*	ND	-
Níquel	ND	0,014(0,000)*	ND	ND	-
Chumbo	ND	ND	ND	ND	-
Manganês	ND	0,158(0,000)*	0,639(0,022)*	0,444(0,006)*	0,502
Crômio	ND	0,015(0,000)*	0,014(0,001)*	0,015(0,001)*	-
Zinco	0,08(0,01)*	0,132(0,005)*	0,243(0,049)*	0,182(0,005)*	0,098

*Resultados expressos como média \pm desvio padrão das análises em duplicata. ND: Não Detectado

Avaliação da eficiência agrônômica dos extratos de espirulina sobre a germinação e o crescimento inicial das raízes de plântulas de milho e de soja.

Os resultados demonstraram que a incubação das sementes de milho na presença do extrato Protex (T4) e do extrato Naturamin (T5), foram os tratamentos que proporcionaram os maiores comprimentos das raízes principais e os maiores números de raízes adventícias. Diferenças estatísticas não foram observadas entre estes tratamentos (Figuras 1 e 2). Os tratamentos Protezyn (T3) e Alcalase (T2) foram superiores aos tratamentos T0 e T1, porém apresentaram-se inferiores aos tratamentos T4 e T5, em todos os parâmetros avaliados.

Na figura 4, observa-se que o número de raízes adventícias foi positivamente afetado quando as sementes de soja foram incubadas com os extratos Naturamin (T5), Protex (T4), Protezyn (T3), uma vez que estes tratamentos foram superiores aos demais tratamentos Alcalase (T2) e Brauzyn (T1) apresentando diferenças estatísticas. É importante observar na Figura 5, que os maiores números de raízes adventícias foram conseguidos com os tratamentos Naturamin, Protex e Protezyn.

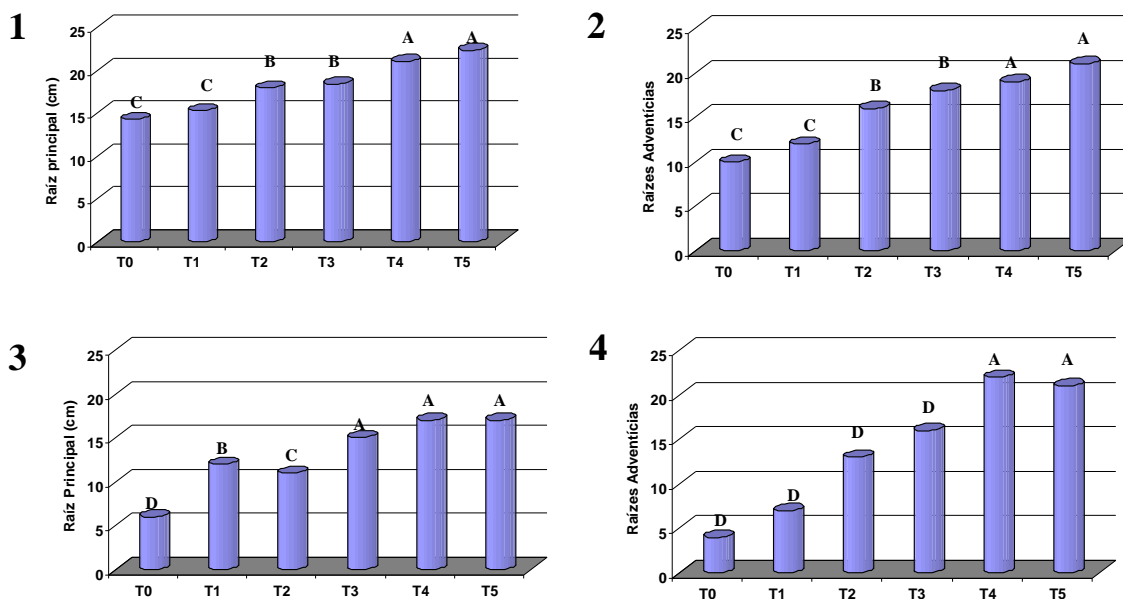


Figura 1: Comprimento médio das raízes principais das plântulas de milho. **Figura 2:** Número médio de raízes adventícias das plântulas de milho. **Figura 3:** Comprimento médio das raízes principais das plântulas de soja. **Figura 4:** Número médio de raízes adventícias das plântulas de soja.

O número de raízes adventícias foi positivamente afetado quando as sementes de soja (Figura 5) foram incubadas com os extratos Naturamin (T5), Protex (T4), Protezyn (T3) e as sementes de milho (Figura 6) a melhor resposta foi para os extratos Naturamin (T5), Protex (T4).

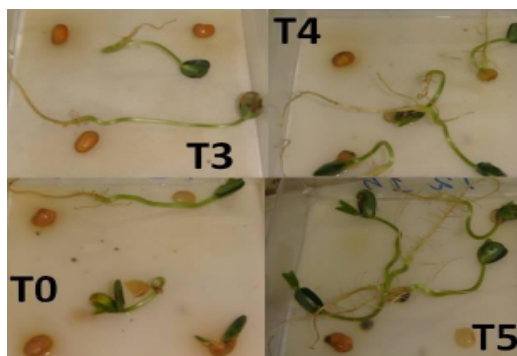


Figura 5. Aspecto visual das plântulas de Soja.

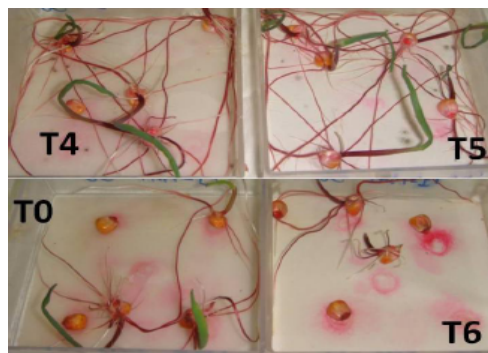


Figura 6. Aspecto visual das plântulas de milho.

CONCLUSÃO

A enzima que apresentou melhor desempenho sobre a espirulina foi a Protex (T4), originado extrato com alto teor de aminoácidos livres, além de níveis de minerais adequados para fertilizantes foliares. No estudo da eficiência agrônômica o extrato obtido com T4 proporcionou os maiores comprimentos das raízes principais e os maiores números de raízes adventícias. Contudo todos os extratos de espirulina



obtidos neste estudo (Protezyn, Protex, Alcalase e Brauzyn) apresentaram excelentes atividades fisiológicas sobre a germinação e o crescimento inicial dos sistemas radiculares das plântulas de milho e soja, evidenciando o ótimo desempenho destas enzimas e o excelente potencial da espirulina na produção de fertilizantes orgânicos foliares.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. **Decreto nº4. 954**, de 14 de janeiro de 2004. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 de janeiro de 2004. Seção 1, p. 2. Disponível em: < [HTTP://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarlegislacao](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarlegislacao).

DURAND, N.; BRIAND, X.; MEYER, C. The effect of marine bioactive substances (N PRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Lund, 119: 489-493, 2003.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, n. 912-916, Nov.-Dec, 1989.

RICCI, M. S. F.; NEVES, M. C. P. Cultivo do Café Orgânico. Sistemas de Produção 2, II Ed. **Embrapa Agrobiologia**, versão eletrônica, Dez., 2008.

SLAVIN, S.; PETERSEN, G.E; LINDHAL, P.C Determination of metals in meats by atomic absorption spectroscopy. **Atomic Absorption Newsletter**, 14(3):57-59, 1975.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

STADNIK, M. J. **Uso potencial de algas no controle de doenças de plantas**. In: VII Reunião de controle biológico de fitopatógenos, Cepec, Ilhéus, p. 70-74. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém... [et. al.]. 3. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY; J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v.8, n.4, p. 170-177, Oct-Dec., 1986.