



V Seminário de Iniciação Científica

Talentos da Ciência e Tecnologia em ação

📅 Dias 26 e 27 de setembro de 2019

📍 Auditório e Pátio - Unidade II



PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E FIXOS DE *Colletotrichum* SP.

Alciene Lima dos Santos¹ - Unifesspa

e-mail: alcienelimas21@gmail.com

Marilene Nunes Oliveira² - Unifesspa

e-mail: mno@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Química de microrganismo/Ciências Exatas e da Terra

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos do mundo (DEAN et al., 2012). Esses fungos estão distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais e afetam especialmente a produção de frutas (CANNON et al., 2012; CAI et al., 2009; PERES et al., 2002).

Tradicionalmente, a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* tem se baseado em suas características morfológicas (PERES et al., 2002). Contudo, Cannon e colaboradores (2000) descrevem a morfologia deste gênero como sendo difícil de definir. Para Tozze Júnior e colaboradores (2015), a alta variabilidade cultural e presença de características comuns a mais de uma espécie ou complexo de espécies como cita Menezes (2006), impossibilita a identificação de determinadas espécie dentro do gênero inclusive utilizando análise molecular.

Em função das dificuldades encontradas na identificação de fungos classificados como complexos, muitos pesquisadores vêm utilizando metodologias alternativas. Dentre as metodologias que vêm sendo desenvolvidas, destaca-se o emprego do perfil de compostos orgânicos como marcador químico.

Na perspectiva de propor marcadores químicos para os fungos do gênero *Colletotrichum* este trabalho faz uso de uma abordagem chamada planejamento experimental com o objetivo de maximizar a produção dos compostos orgânicos a partir de fungos do referido gênero.

O planejamento experimental é uma metodologia de análise de dados experimentais fundamentada em análise estatística que pode ser utilizada para otimizar produtos e processos por meio da maximização da eficiência. A partir desta metodologia, utilizando análise multivariada, é possível não só identificar as variáveis que influenciam positivamente ou negativamente as respostas desejadas, mas também a influência exercida pela interação entre elas, permitindo a otimização do sistema ou processo sob análise (RODRIGUES e LEMMA, 2015; BARROS NETO et al, 2010).

Apesar da importância da prospecção de compostos orgânicos como ferramenta quimiotaxonômica, do grande número de espécies de *Colletotrichum* relatadas e das dificuldades encontradas no processo de identificação de fungos caracterizados como complexo, não há registro na literatura referente ao uso desta metodologia voltada a identificação de espécies do referido gênero, o que ressalta o ineditismo do presente trabalho.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Reativação dos fungos

¹Graduanda em Química - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

²Doutora em Química - Professora Titular Associada da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FAQUIM/ICE/Unifesspa). Membro do Programa de Pós - Graduação em Química da Unifesspa.

Os 10 isolados de *colletotrichum* preservados na micoteca do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Castanhal/PA, foram reativados em placas de Petri por meio de inóculo em meio de cultura batata dextrose agar (BDA).

Otimização das condições de HS-SPME para extração dos COVs.

Para a otimização das condições de extração dos compostos orgânicos voláteis (COVs) dos isolados de *Colletotrichum* realizou-se um planejamento experimental 2^4 , ou seja, com quatro variáveis (tipos de fibra, tempo de extração, temperatura e meio de cultura), em dois níveis: fibra (PDMS-Polidimetilsiloxano e PDMS/DVB-Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), 15 e 30 min, 30° e 50°C, BDA e fibra de açaí. Após sete dias de cultivo, um disco de 6 mm de diâmetro do micélio de um dos isolados fúngicos (C7) foi transferido para vials de vidro, específicos para análises via Cromatografia Gasosa (CG), de 20 mL, contendo 5 mL de meio BDA, e imediatamente selados com septos de silicone. Depois de serem lacrados com tampas rosqueadas, os frascos foram incubados por 7 dias a 25 °C em condições estáticas em incubadora do tipo BOD. O mesmo procedimento foi desenvolvido substituindo o meio de cultura BDA por fibra de açaí (Figura 1).

Para a extração dos voláteis as fibras de PDMS e PDMS/DVB foram inseridas nos vials a uma distância de aproximadamente 1 cm acima da massa micelial. Para caracterização dos compostos orgânicos produzidos, as fibras foram removidas e inseridas no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG/EM) a 250°C por 5 minutos, nesta etapa ocorre a dessorção dos compostos voláteis. A separação dos COVs foi realizada com as seguintes condições cromatográficas: coluna DB-5, gás de arraste hélio com fluxo 1,0 mL. min⁻¹ com a seguinte programação de temperatura: 30°C por cinco min., e em seguida de 30 °C a 190°C, sendo 5°C. min⁻¹. Esta operação foi realizada por um sistema automatizado. Realizou-se inicialmente 16 experimentos, todos em duplicata, além de 16 brancos, um para cada combinação. A partir da análise dos dados adquiridos dois outros planejamentos foram realizados, planejamento com ponto central e planejamento composto central também chamado planejamento estrela. Os dois últimos planejamentos foram realizados a partir de análises de efeitos, resíduos e análise de variância das respostas que iam sendo obtidas a cada planejamento realizado.

As análises do perfil de compostos orgânicos voláteis foram desenvolvidas no CG/EM, Shimadzu, modelo QP-2010.

➤ Otimização das condições para extração dos compostos fixos.

Para a otimização das condições de produção dos compostos orgânicos fixos produzidos por *Colletotrichum* foi desenvolvido um planejamento experimental 2^4 , ou seja, com quatro variáveis (pH, tempo de cultivo, cultivo estático ou dinâmico, tipo de solventes utilizado para extração), em dois níveis: pH (4 e 7,5), 7 e 14 dias, Estático e Dinâmico, Acetato de Etila e Diclorometano. Foram, portanto desenvolvido 32 experimentos, sendo 16 referente aos controles. Para a produção de compostos fixos, o isolado fúngico (C7) foi cultivado em meio líquido (BD), filtrado e submetido ao processo de partição líquido-líquido, por 3 vezes, utilizou-se 100 mL de solvente em cada etapa. Em seguida, a fase orgânica foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para obtenção da biomassa fúngica. As amostras foram pesadas, solubilizadas, filtradas e transferidas para vials na concentração de 1mg. L⁻¹. A partir das soluções de cada extrato obtido foram utilizados para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para verificação do perfil dos compostos produzidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 isolados fúngicos foram adequadamente reativados. A partir do isolado de *Colletotrichum* C7, foi desenvolvido um planejamento fatorial 2^4 para otimizar as condições de produção dos compostos orgânicos voláteis e fixos. No estudo com compostos voláteis, os primeiros 16 experimentos realizados apresentaram falta de reprodutibilidade expressada tanto na análise de efeitos das variáveis, bem como na análise dos resíduos, conduzindo o estudo à realização de novos experimentos a partir de novos planejamentos, experimentos incluindo ponto central e experimentos referente ao planejamento estrela. O tratamento dos dados adquiridos a partir do conjunto de experimentos realizados levou às seguintes condições ótimas: tempo de extração de 30 minutos, fibra de adsorção PDMS/DVB e meio de cultura BDA. No conjunto de análises

foi possível concluir que a temperatura é uma variável não significativa para a produção de respostas, levando à utilização àquela de menor energia, ou seja, 30 °C.

O conjunto de experimentos levou a construção de um modelo que é capaz de representar adequadamente o estudo em desenvolvimento, conclusões obtidas a partir do estudo análise de variância, a partir desta observa-se que o modelo não possui falta de ajuste, margem de erro pequena e variabilidade explicada elevada. As figuras a seguir (Figuras 1, 2 e 3) mostram os resultados referentes aos efeitos das variáveis em estudo e resíduo do modelo.

Figura 1: Análise dos efeitos das variáveis fibra de adsorção, meio de cultura e a interação entre elas.

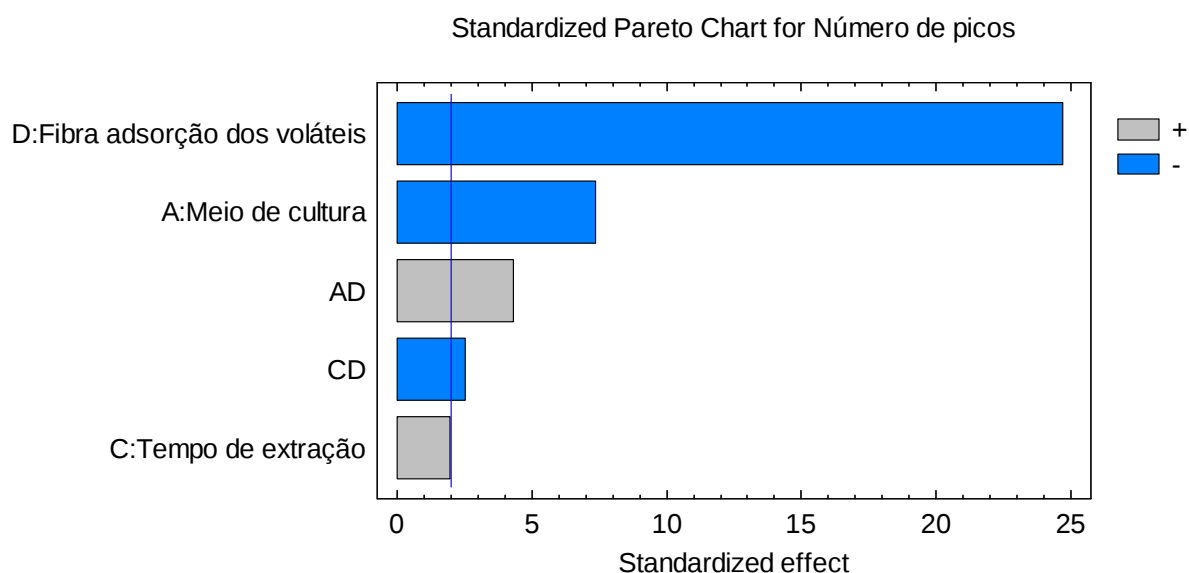


Figura 2: Comportamento das respostas nos diferentes níveis das variáveis significativas.

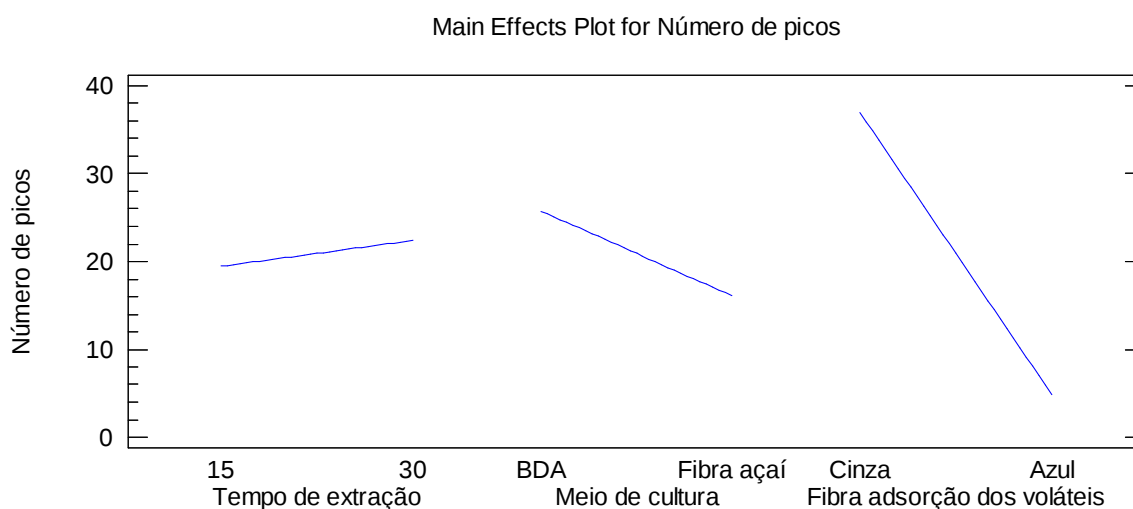
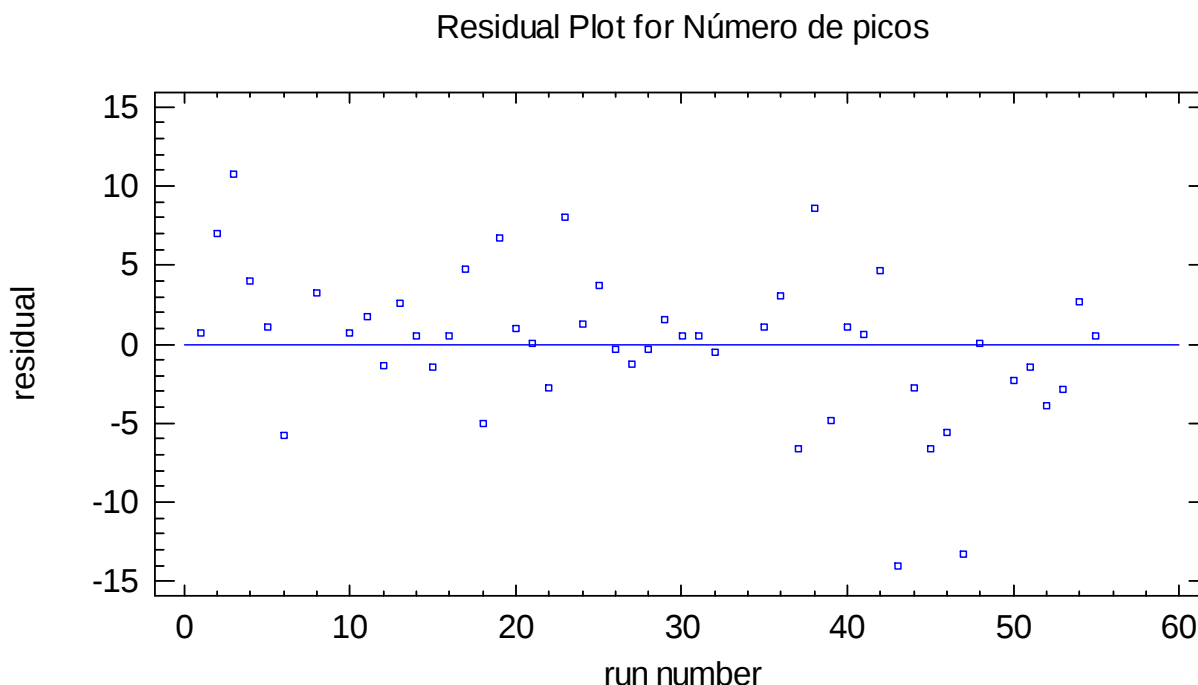


Figura 3: Análise de resíduo do modelo.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de otimização da produção de compostos orgânicos fixos foi desenvolvido até a etapa de obtenção dos extratos da fase acetato de etila. A análise via CLAE foi realizada e os dados adquiridos estão sendo tratados de acordo com a metodologia aplicada ao estudo dos voláteis.

A partir da otimização realizada os demais isolados serão explorados para a proposição de um marcador químico.

REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, CCARMÍNIO, J. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: aplicações na Ciência e na Indústria. Porto Alegre: Bookman, 2010. 407 p.
- CAI, L., HYDE, K. D., TAYLOR, P. W. J., WEIAR, B. S., WALLER, J., ABANG, M. M., ZHANG, J. Z., YANG, Y. L., PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y., PRIHASTUTI, H., SHIVAS, R. G., MCKENZIE, E. H. C. and JOHNSTON, P. R. A. Polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*. v. 39: 183-204, 2009.
- CANNON, P. F.; DAMM, U; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* status and future directions. *Studies in Mycology*, Utrecht, v.73, p.181-213, 2012.
- DEAN R, KAN J. A. L. V.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. Sep;13(7):804, 2012.
- MENEZES, E. M. S.; TORRES, A. T.; SRUR, A. U. S.; Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amazônica*. v. 38 (2), 311 ã 316, 2008.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUSA, N. L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp affecting fruit after harvest in Brazil. J. Phytopathol, v. 150, 128ñ134, 2002.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. Experimental desing and process optimization. Boca Raton: CRC Press, 2015. 336 p.