

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO RAMOS DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE DIGESTÃO E DE PELETIZAÇÃO DE
CAMA DE AVIÁRIO PARA A PRODUÇÃO DE FERTILIZANTE
ORGANOMINERAL**

Curitiba

2014

GUSTAVO RAMOS DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO DE PROCESSO DO DIGESTÃO E PELETIZAÇÃO DE CAMA DE
AVIÁRIO PARA A PRODUÇÃO DE FERTILIZANTE ORGANOMINERAL**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sa
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Curitiba
2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela paz e saúde para que eu trilhasse os caminhos da ciência;

A Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sa pela orientação, por compartilhar seus conhecimentos e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação e oportunidades;

Aos Professores(as) Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Dr^a. Adenise Lorenci Woiciechowski, Dr^a. Adriane PB Medeiros, Dr^a. Michele Rigon Spier e Dr. Júlio Cezar de Carvalho pelos conhecimentos compartilhados;

Aos colegas Eduardo Bittencourt, Gerson Mello, Carlos Sanchuki e Alessandra pela amizade e momentos memoráveis em Curitiba;

Aos meus pais e irmã por todos os esforços reunidos na minha formação, amizade e conselhos compartilhados;

A minha querida avó Elza Negreiros Ramos;

Aos meus avós Pedro Ramos, Nelson e Antonieta Quaresma, que hoje me guiam espiritualmente;

Aos colegas do Osmundo Brilhante, Simoni Dias, Isabela Lourenço, Janaína de Paula, Patrícia Pelegrine, Leonardo Pepino, Leonardo Fonseca e Fernando Fonseca.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram neste projeto;

Em especial a Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia;

E à CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

PREFÁCIO

Quando me propus a fazer o Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná - UFPR, vários fatores exerceram influência na minha decisão e entende-los fará o leitor capturar a essência deste trabalho.

Inicialmente, durante a minha graduação enxergava o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas como sendo a minha ferramenta de trabalho e o diploma me proporcionaria acesso ao mercado.

Não foi bem assim que aconteceu, pois ao final da graduação eu não sabia como alcançar meus objetivos. Na minha busca surgiu a oportunidade de conhecer a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, bem como a Dra. Maria Fátima Grossi de Sa, minha grande “Mestra” e orientadora Acadêmica.

Os dez anos de convivência na Embrapa, com inúmeros profissionais renomados e colegas de bancada tiveram grande influência e moldaram o meu Mestrado em Biologia Celular e Molecular realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Porém, ao final desta etapa os meus objetivos de vida, ainda pareciam nebulosos. O que eu desejava, não era a Ciência simplesmente por fazer pesquisa, eu precisava aplicar todos aqueles anos de estudo.

E em 2008, através de uma parceria com a Dra. Maria Fátima Grossi de Sa foi que começamos a trabalhar sob uma nova perspectiva, o resíduo como parte intrínseca de uma cadeia produtiva importante, a agroindústria.

Foi com este olhar, que escolhi o curso de Doutorado, o qual estou concluindo com este documento, redigido com muito esforço e carinho, e que reflete o meu amadurecimento profissional.

Quero apresentar, nas páginas que se seguem, uma história científica, narrada por um dos criadores de uma Tecnologia de futuro ainda incerto, mas promissor: A Tecnologia de Digestão e Peletização de Cama de Aviário.

Nesta Tese serão apresentados os dados resultantes da referida tecnologia, bem como sua aplicação em um importante setor econômico brasileiro, o Agronegócio, através de um premiado Plano de Negócios.

E assim, preparado por ilustríssimos Pesquisadores (Dra. Maria Fátima Grossi de Sa e Dr. Carlos Ricardo Soccol) penso estar pronto para assumir um importante “papel” na Sociedade – de ser um Cientista.

GUSTAVO RAMOS DE OLIVEIRA

RESUMO

No atual cenário bioenergético e agropecuário, o desenvolvimento de tecnologias que minimizem a exploração de recursos naturais não renováveis e impactos ambientais é estratégico e de interesse público. Sendo também relevante, a aptidão agrícola do Brasil, e o fato do país ser altamente dependente de importações de fertilizantes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo colaborar na validação de uma nova técnica de compostagem acelerada e de peletização de co-produtos agroindustriais, especificamente da cama de aviário para a produção de fertilizantes do tipo composto orgânico e organomineral. Análises físico-químicas foram conduzidas para determinar os componentes dos produtos obtidos pela referida tecnologia. A capacidade do processo em absorver resíduos agroindustriais foi avaliada através de análise de parâmetros agrônômicos, em experimentos realizados a campo experimental e comercial. Também foi analisada a viabilidade para implantação de unidades fabris na região de Formosa – GO e de Toledo – PR em diferentes cenários econômicos, desenhados em Plano de Negócios oportunamente analisado pela Federação das Indústrias do Estado do Paraná – FIEP. Os resultados demonstraram boa humificação dos resíduos agroindustriais utilizados no processo de compostagem, e os fertilizantes produzidos, a partir do composto orgânico obtido, apresentaram qualidade e resposta positiva na produtividade das culturas desafiadas a campo, como apresentado no milho (+33%), no feijão (+9%) e na soja (+25%). Ademais concluímos que a utilização da tecnologia, foco deste estudo, é eficiente na transformação de cama de aviário em composto orgânico e em fertilizante organomineral peletizados de alto valor agregado e possui capacidade de implantação em diferentes regiões brasileiras, conforme análise técnica da FIEP.

Palavras chave: Biofertilizantes, composto orgânico, fertilizante organomineral, digestão.

ABSTRACT

In the present bioenergy and agriculture scenario, the development of technologies that minimize the exploitation of non-renewable natural resources and environmental impacts is strategic and of public interest. Also, it is relevant the Brazil's agricultural potential and the fact that the country is highly dependent on fertilizer imports. In this context, this work aims to collaborate in the validation of a new technique for accelerated composting and pelletization of agro-industrial bio-products, specifically poultry litter to production of organic compost and organomineral fertilizers. Physical and chemical analyzes were conducted to determine the components of the products obtained by this technology. The process capacity to absorb organic residues was evaluated using analysis of agronomic parameters in experimental and commercial field. It was also analyzed the availability for deployment of manufacturing in the region of Fomosa - GO and Toledo – PR, in different economic scenarios, exposed in Business Plan duly analyzed by the Paraná State Industry Federation - FIEP. The results showed humification of organic residues used in the composting process. The fertilizer produced from organic compound had a positive response in the quality and productivity of crops evaluated in the field, as shown in corn (+ 33%) beans (+ 9%) and soybean (+ 25%). Furthermore we conclude that the technology, focus of this study, is efficient in processing of poultry litter in pelletized composted fertilizer with high value added, beyond the capacity for implantation in different Brazilian regions, as shown in technical analysis of FIEP.

Keywords: Biofertilizers, organic compost, organo-mineral fertilizer, digestion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Desafios, solução e benefícios dos resíduos agropecuários. **7**
- Figura 2 -** Elementos químicos requeridos pelas plantas em suas diferentes fases de desenvolvimento. Fonte: (LAPIDO-LOUREIRO *et al.*, 2009). **35**
- Figura 3 -** Comercialização de fertilizantes organominerais no Brasil entre os anos de 2001 e 2009. Fonte: (BENITES, *et al.*, 2010). **37**
- Figura 4 -** Região de coletas de cama de aviário na região de Formosa-GO (distante 70 km de Brasília – DF). **42**
- Figura 5 -** Fluxograma do processo de digestão e de peletização de cama de aviário para a produção de composto orgânico e de fertilizantes organominerais. **43**
- Figura 6 -** Cozinhador de cinco estágios e de fluxo contínuo utilizado no aquecimento da cama de aviário. **44**
- Figura 7 -** Prensa extrusora utilizada para homogeneização da cama de aviário aquecida à borra de óleo de algodão. **44**
- Figura 8 -** Detalhe do interior da peletizadora. **46**
- Figura 9 -** Figura esquemática de uma leira (monte) de composto orgânico pronto, e os pontos de amostragem do composto orgânico produzido pelo novo processo de digestão e de peletização de cama de aviário. **46**
- Figura 10 -** Aparelho Hidrofarm HFM 2010, utilizado para aferir a umidade dos lotes de cama de aviário e do composto produzido. Imagem retirada do website: www.falker.com.br **47**

Figura 11 -	Desenho esquemático da disponibilização da fonte de nutrientes em relação à semente de milho.	51
Figura 12 -	Desenho esquemático do campo experimental de milho com área total de 50 m ² .	52
Figura 13 -	Desenho esquemático do Pivot Central de 100 ha de área, utilizado para desenvolvimento do plantio comercial de feijão (variedade Carioca).	54
Figura 14 -	Gráfico da temperatura do composto orgânico em diferentes tempos.	63
Figura 15 -	Experimento de visualização da germinação de sementes de milho em diferentes fontes de nutrientes a cinco centímetros de distância da semente.	64
Figura 16 -	Gráfico do desenvolvimento radicular <i>in vitro</i> de plantas de milho.	65
Figura 17 -	Foto de raízes de milho em resposta a diferentes tratamentos.	66
Figura 18 -	Campo experimental de milho.	67
Figura 19 -	Milho produzido em campo experimental.	69
Figura 20 -	Resultado comparativo entre dois diferentes tratamentos, na produtividade de milho, em campo experimental.	70
Figura 21-	Plantio comercial de milho realizado na região de Buritis – MG, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.	71
Figura 22-	Plantio comercial de feijão realizado na região de Cristalina – GO, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.	72
Figura 23-	Plantio comercial de soja realizado na região de Buritis – MG, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.	74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Dados de toneladas de cama de aviário coletadas e processadas na região de Formosa – GO. **55**
- Tabela 2 -** Parâmetros de indicação de compostagem, de diferentes lotes de composto orgânico produzidos pelo processo de digestão e de peletização de cama de aviário. **57**
- Tabela 3 -** Resultados de umidade presente em diferentes fertilizantes formulados a partir do composto orgânico (2-2-2) produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização. **60**
- Tabela 4 -** Resultado de potencial Hidrogeniônico do composto orgânico e de diferentes fertilizantes, obtidos pelo processo de digestão e de peletização. **61**
- Tabela 5 -** Composição de N, P, K, C e CTC do composto orgânico e dos diferentes fertilizantes organominerais obtidos pelo processo de digestão e de peletização. **61**
- Tabela 6 -** Tabela comparativa entre a composição elementar de folhas de plantas de milho adubadas com fertilizante organomineral 4-14-8 e a testemunha com fertilizante mineral 4-14-8. **67**

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES

B – Boro

C - Carbono

°C – Graus Celsius

cm - centímetros

COT – Carbono orgânico total

CO₂ – Dióxido de carbono

C/N – Relação entre a quantidade de carbono e nitrogênio presente no material

CTC – Capacidade de troca catiônica

HCl – Ácido clorídrico

K - Potássio

M – Molar (mol/l)

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mg – Miligramas

ml – Mililitro

mmolc.kg-1 – Milimol de cátions por quilograma

m - metro

m² – metro quadrado

N – Nitrogênio

NPK - É uma sigla utilizada em estudos de agricultura, que designa a relação dos três nutrientes principais para as plantas (nitrogênio, fósforo e potássio), também chamados de macronutrientes, na composição de um fertilizante.

P – Fósforo

pH – Potencial hidrogeniônico

RPM – Rotações por minuto

S – Enxofre

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A demanda crescente por alimentos e fertilizantes e os impactos nos sistemas produtivos	21
2.2 Resíduos da cadeia agropecuária, compostagem e potencial de aplicação na produção de fertilizantes orgânicos e/ou organominerais	24
2.2.1 Resíduos: cama de frango e/ou de aviário	24
2.2.2 Compostagem	26
2.2.3 Utilização do composto	33
2.3 Fertilizantes organominerais no Brasil	36
2.3.1 Vantagens dos fertilizantes organominerais em relação aos fertilizantes minerais	38
2.3.2 Perspectivas para o setor de fertilizantes organominerais e impactos esperados com a expansão do uso dessa tecnologia no Brasil	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. METODOLOGIA	42
4.1 Obtenção do composto orgânico e organomineral	42
4.1.1 Coletas e acondicionamento da cama de aviário	42

4.1.2	Processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário	43
4.1.3	Determinação dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do composto orgânico e dos fertilizantes organominerais	47
4.1.3.1	Determinação da temperatura	47
4.1.3.2	Determinação da umidade	47
4.1.3.3	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	48
4.1.3.4	Determinação do nitrogênio (N)	48
4.1.3.5	Determinação da concentração do fósforo (H_2PO_4^-) solúvel em água	48
4.1.3.6	Determinação da concentração do potássio (K^+) solúvel em água	48
4.1.3.7	Determinação da Capacidade De Troca Catiônica – CTC	49
4.1.3.8	Determinação do Carbono Orgânico Total – COT	49
4.1.3.9	Avaliação da relação CTC/C	49
4.1.3.10	Avaliação da relação C/N	49
4.1.3.11	Determinação de presença de nematoides fitopatogênicos	50
4.2	Avaliação agrônômica do fertilizante organomineral	50
4.2.1	Teste <i>in vitro</i>	50
4.2.1.1	Avaliação de raízes de milho em tubos de ensaio	50
4.2.2	Testes agrônômicos em campo experimental	51
4.2.2.1	Avaliação de produtividade de milho	51
4.2.3	Testes agrônômicos em campo comercial	
4.2.3.1	Avaliação de produtividade de milho	53

4.2.3.2	Avaliação de produtividade de feijão	53
4.2.3.3	Avaliação de produtividade de soja	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Obtenção do composto orgânico e fertilizante organomineral	55
5.1.1	Coletas e acondicionamento da cama de aviário	55
5.1.2	Processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário	56
5.1.3	Determinação de parâmetros físicos, químicos e biológicos	58
5.1.3.1	Determinação da temperatura	58
5.1.3.2	Determinação da umidade	59
5.1.3.3	Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)	60
5.1.3.4	Determinação da concentração de N, P, K, C e da Capacidade de Troca Catiônica - CTC de fertilizantes	61
5.1.3.5	Determinação de patógenos	63
5.2	Avaliação agrônômica do fertilizante organomineral obtido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização	64
5.2.1	Observação de raízes de milho em tubos de ensaio	64
5.2.2	Avaliação de produtividade de milho em campo experimental	67
5.2.3	Avaliação de produtividade de milho em campo comercial	71
5.2.4	Avaliação de produtividade de feijão em campo comercial	72
5.2.5	Avaliação de produtividade de soja em campo comercial	73

6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	78
8. ANEXOS	88

1. INTRODUÇÃO

A produção agrícola envolve diferentes variáveis, tais como ambientais, geológicas, ecológicas, socioeconômicas, político-institucionais, culturais e tecnológicas, e a importância relativa de cada uma delas se modifica com o tempo (ROMEIRO, 1998).

Na idade antiga, predominava o sistema de associação das culturas de cereais e criação de gado, com baixa produtividade. Na idade média, permaneceu o sistema de consórcio, mas o uso de novas tecnologias gerou aumento de produção e excedentes. Na idade moderna, criaram-se sistemas de culturas de cereais e forrageiras, com aumento considerável da produção e de excedentes comercializáveis, bem como houve o fortalecimento da integração da cultura com a criação de gado (SANTILLI, 2009).

No final da década de 1950 e início da década de 1960, o modelo agrícola passou a se caracterizar pela associação de insumos químicos, mecânicos e biológicos, promovendo uma intensa padronização das práticas agrícolas e artificialização do ambiente natural. Esse sistema ficou conhecido como “Revolução Verde” (CAPORAL e COSTABEBER, 2001). Nos anos 1990, houve a integração da biotecnologia no sistema de cultivo e as mudanças tecnológicas operadas ocorreram pela evolução do conhecimento científico e pela estratégia de valorização de ativos (SANTILLI, 2009).

Este modelo de agricultura científica e globalizada exige demanda de bens científicos e de assistência técnica, em que os produtos são escolhidos segundo uma base mercantil, o que implica uma estrita obediência aos mandamentos técnicos e científicos e são essas condições que regem os processos de plantio, colheita, armazenamento, empacotamento, transporte e comercialização (SANTOS, 2006).

Em relação a estes fatores, na segunda mesa redonda da Sociedade Civil Brasil-União Europeia, realizada em Belém - PA, nos dias 25 e 26 de janeiro de 2010, para discussão sobre clima, matriz energética mundial e desenvolvimento sustentável, pôde-se constatar o entendimento quanto à urgência de se chegar ao acordo de controlar e reduzir as emissões de gases de efeito estufa (HENRIQUE, 2010).

Este evento, mostrou perceber que a agropecuária é um dos principais setores emissores de dióxido de carbono (CO₂), em torno de 23%, e que as ações voluntárias de mitigação de emissões brasileiras, apresentadas pelo país na 15^a Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças do Clima (COP 15), prescrevem a recuperação de pastos, o plantio direto, a integração lavoura-pecuária e a fixação biológica de nitrogênio e carbono (ROUSSEFF, 2009).

De fato, o consórcio agricultura-pecuária pode converter áreas degradadas em espaços produtivos, sem necessidade de desmatar e sem prejuízo da criação de gado, suínos e aves. Neste cenário, o plantio direto tem contribuído para a melhoria do solo e dos lençóis freáticos e a fixação biológica de nitrogênio e carbono tem possibilitado a redução da aplicação de fertilizantes químicos.

No entanto, há de se registrar que a pressão que a agricultura tem sobre o meio ambiente indica a necessidade de se buscar um novo patamar de conhecimento, em que o sistema produtivo utilize a agropecuária como produtora de alimentos e de matérias-primas essenciais e observe o progresso em outras dimensões e valores (LOPES *et al.*, 2008).

Segundo Lopes e colaboradores (2008), há três dimensões da agrobiodiversidade e estas podem ser utilizadas na estruturação de programas e planos, quais sejam: a) a sustentabilidade dos sistemas produtivos, em todos os níveis, com foco na diversidade; b) a ênfase na conservação e na melhoria de recursos biológicos que apoiam os sistemas de produção; c) e o reconhecimento, a recuperação e incorporação de tecnologias verdes, ou seja, práticas eficientes na produção, ao mesmo tempo que promovem a manutenção e o equilíbrio ambiental, social e econômico.

Com este entendimento, o modelo agrícola atual necessita de mudanças de paradigmas, que sejam transformadores da política, dos planos, dos programas e dos instrumentos aplicados na agricultura, de maneira a contribuir com a conservação da agrobiodiversidade e com o reconhecimento explícito dos direitos dos produtores (OLIVEIRA NETO, 2008).

Da mesma forma, os sistemas produtivos agroindustriais precisam utilizar melhor os recursos naturais, ao mesmo tempo que promovem ações de caracterização dos seus subprodutos e incentiva o desenvolvimento de novas tecnologias, que sejam

mais eficientes. E é neste cenário inovador que se insere o processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário no intuito de gerar um produto eficiente e que possa contribuir com a sustentabilidade do sistema agropecuário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A DEMANDA CRESCENTE POR ALIMENTOS E FERTILIZANTES E OS IMPACTOS NOS SISTEMAS PRODUTIVOS

O aumento da população mundial e a demanda por melhoria da qualidade de vida têm pressionado a produção crescente de alimentos e de fontes alternativas de energia de origem vegetal, a fim de substituir a matriz energética atual baseada no petróleo. Entretanto, estes fatores têm contribuído consideravelmente com o uso indiscriminado de importantes recursos naturais não renováveis, incluindo principalmente a água, o petróleo e os fertilizantes (AARON, 2005).

Incorporado à cadeia produtiva de alimentos, há ainda uma relação direta entre a espécie humana e os animais dependentes dos organismos vegetais. Por outro lado, as plantas para se desenvolverem dependem de elementos químicos, orgânicos e biológicos presentes no solo, sendo que, nos modelos atuais de produção, esses elementos são retirados e inseridos nos solos de forma inadequada. Surge, assim, a necessidade de estudos e ações que viabilizem a continuidade e sustentabilidade dos sistemas produtivos, principalmente pelo desenvolvimento e uso de tecnologias economicamente e ecologicamente corretas, para a produção de fertilizantes mais eficientes e o equilíbrio desta relação (LAPIDO-LOUREIRO *et al*, 2009).

Tanto para o aumento da produtividade das culturas como para a expansão da fronteira agrícola no Brasil, o papel positivo dos fertilizantes tem sido comprovado pela ciência e pelos agricultores, sendo que, até o presente momento, a sustentabilidade da cadeia produtiva é proposta pelo simples fato dos fertilizantes promoverem o aumento da produtividade agrícola, protegendo e preservando milhares de hectares de florestas e matas nativas, assim como a fauna e a flora. (LAPIDO-LOUREIRO *et al*, 2009). Em geral, os fertilizantes são responsáveis por cerca de um terço da produção agrícola, mas em alguns países chegam a ser responsáveis por até cinquenta por cento das respectivas produções nacionais. E esta visão equivocada está levando à excessiva utilização dos recursos naturais não renováveis e à poluição ambiental (AARON, 2005).

Estudos apontam que as reservas de fosfatos para se produzir fertilizantes no mundo, exploradas a baixo custo, são suficientes para 40 a 100 anos, e as de potássio

para 50 a 200 anos, dependendo da intensidade de exploração. A situação é ainda mais preocupante para os micronutrientes, já que as reservas de cobre e zinco são suficientes para 60 anos, manganês para 35 anos e selênio para 55 anos (HERRING E FANTEL, 1993; ROBERTS E STEWART, 2002; AARON, 2005). Além da depleção das reservas naturais, o uso excessivo de fertilizantes pode contribuir para a contaminação com nitrato do solo e dos cursos d'água (ANGUS, 1995; BUMB, 1995; LANA, 2009), acidificação do solo (HELYAR E POTER, 1989) e emissões de dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O) e amônia para a atmosfera (LANA, 2009).

A poluição com nitrato e fósforo ou eutrofização dos mananciais de água se tornou uma preocupação nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália. Na maioria dos casos, a eutrofização de mananciais de água é acelerada pelo aumento na quantidade de nitrogênio e fósforo adicionada (SHIGAKI *et al.*, 2006), o que tem estreita relação com o escoamento superficial deste elemento, em função da intensificação dos sistemas de produção de culturas e animais a partir do início da década de 1990. A fertilização com fósforo e nitrogênio causa decréscimo na oxigenação da água pelo excessivo aumento na população de algas e liberação de grandes teores de metais pesados (KEBREAD *et al.*, 2002).

A agricultura participa com aproximadamente 20% do aumento anual de emissão antropogênica de gases do efeito estufa, principalmente o metano (CH_4) e o óxido nitroso (N_2O). Aproximadamente 70% de todas as emissões antropogênicas de N_2O são atribuídas à agricultura. A metodologia corrente utilizada no Canadá para estimar o fluxo de N_2O se baseia na relação direta entre a emissão de N_2O e a aplicação de fertilizantes nitrogenados (LEMKE *et al.*, 1998; LANA, 2009). Os possíveis efeitos deletérios das emissões de N_2O ocorrem no aquecimento global e na distribuição catalítica da camada de ozônio da estratosfera, onde o N_2O retém 13 vezes mais calor que o metano (CH_4) e 270 vezes mais que o CO_2 (GRANLI E BOCKMAN, 1994; LANA, 2009). O nível atmosférico de N_2O tem aumentado de forma crescente desde 1960, associado com o aumento na utilização da fertilização nitrogenada (BUMB, 1995; STRONG, 1995).

Assim, os fertilizantes minerais são também responsáveis pelo aquecimento global e pela eutrofização dos mananciais, além de serem recursos naturais não

renováveis, como água e petróleo. Esses fatores ocasionam consequências diretas na produção mundial de alimentos (LANA, 2009).

A curva de Hubbert, que segue o modelo de sino, demonstra a exploração dos recursos naturais não renováveis, especialmente fertilizante, água e petróleo, em que, quanto mais persistente for a manutenção da exploração máxima do recurso, mais drástica é a queda das reservas restantes em um curto espaço de tempo, ocorrendo o chamado “blackout” ou queda brusca na taxa de produção (LANA, 2009).

Portanto, a partir do pico de exploração, se não houver novas alternativas para se produzir mais alimentos sem depender dos recursos vigentes, ou a racionalização da exploração com base na eficiência de uso destes recursos, consequências catastróficas podem ocorrer em algum momento neste século, conforme previsto pelo Clube de Roma em 1972, e publicado no livro “The limits of growth” (MEADOWS *et al.*, 1972). Esta curva ou modelo baseou-se na atual industrialização acelerada, no rápido crescimento populacional, na depleção dos recursos naturais não renováveis, na subnutrição generalizada e na poluição ambiental (LANA, 2009).

Apesar das escassas informações com relação aos impactos da agricultura na qualidade da água e do solo, especialmente a eutrofização dos mananciais hídricos devido aos intensivos sistemas de produção de culturas e animais no Brasil, os dados apontam para um aumento ocorrendo principalmente na região Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), onde, por exemplo, localizam-se 43% e 49% da produção de suínos e aves, respectivamente (SHIGAKI *et al.*, 2006). Enquanto a produção de gado de corte ocorre predominantemente em sistema de pastejo no campo, com deposição de esterco sobre os pastos, a produção de suíno e frango ocorre em sistema intensivo de confinamento, o que resulta em elevadas quantidades de esterco em pequenas áreas.

Portanto, a introdução de alternativas para o aproveitamento de resíduos da agroindústria em geral na produção de biofertilizantes será cada vez mais necessária, haja vista a diminuição das reservas de fertilizantes minerais, conforme discutido anteriormente, e o crescente aumento de produção e consumo de grãos e biocombustíveis, aquicultura, avicultura e suinocultura, e também por razões socioambientais de interesse público (Figura 1) (BENITES *et al.*, 2010).



Figura 1. Desafios, solução e benefícios dos resíduos agropecuários. A elevada produção de alimentos gera um excessivo acúmulo de resíduos agropecuários, que por sua vez podem ser convertidos, por meio de processos de compostagem e peletização, em fertilizantes organominerais, os quais são mais eficientes no aumento da produtividade agrícola.

2.2 RESÍDUOS DA CADEIA AGROPECUÁRIA, COMPOSTAGEM E POTENCIAL DE APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE FERTILIZANTES ORGÂNICOS E/OU ORGANOMINERAIS

2.2.1 RESÍDUOS: CAMA DE FRANGO E/OU DE AVIÁRIO

A grande e consolidada cadeia produtiva de bioetanol de cana-de-açúcar e as crescentes cadeias produtivas de biodiesel de óleo vegetal e sebo animal, da aquicultura, avicultura e suinocultura no Brasil disponibilizam, a baixos custos, enormes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar, torta de filtro, vinhoto, borras, farelos, efluentes líquidos, lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de origem vegetal (soja, algodão, mamona, etc.) e animal (sebo, vísceras, etc.), camas e esterco. Estes

coprodutos possuem significativas quantidades de macro e micronutrientes essenciais para nutrição vegetal e correção de solo, dentre outras biomoléculas que devem ser melhor aproveitadas (CANELLAS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

Segundo Benites e colaboradores (2010), o Brasil possuía em 2010 um rebanho de 5,5 bilhões de cabeças de frangos de corte e postura, e 37 milhões de suínos, além de 190 milhões de cabeças de bovinos de corte. Este rebanho gera anualmente cerca de 120 milhões de toneladas de resíduos orgânicos primários na forma de fezes, urina e camas, além de outros resíduos de origem agroindustrial, tais como resíduos de curtumes, farinhas de ossos e sangue, e resíduos de abatedouro (OLIVEIRA, 1995; SBCS, 2004). Somente o rebanho brasileiro de suínos e aves gera anualmente 105 milhões de m³ de dejetos líquidos de suínos e 7,8 milhões de toneladas de cama de aviário. Estes resíduos somados contêm cerca de 680 mil toneladas de nitrogênio “N”, 660 mil toneladas de P₂O₅ e 440 mil toneladas de K₂O, o que representa aproximadamente 27%, 21% e 12% do total anual consumido de N, P e K pela agricultura brasileira, respectivamente (BENITES, 2010).

Entretanto, os elementos que compõem os resíduos orgânicos supracitados não se encontram na forma mineralizada, ou seja, não estão disponíveis para a absorção vegetal, mas podem ser utilizados como matéria-prima na produção de compostos orgânicos e/ou organominerais (LANA, 2009; BENITES, 2010). Para tanto, é necessário ocorrer a mineralização ou humificação da matéria orgânica, ou seja, compostagem ou biocompostagem, que por sua vez depende de uma série fatores (oxigênio, relação carbono/nitrogênio e Capacidade de Troca Catiônica CTC/carbono orgânico, carbono orgânico, capacidade de troca catiônica e iônica, demanda bioquímica e química de oxigênio, pH, condutividade elétrica, micro-organismos, entre outros) (KIEHL, 1989).

Ainda neste sentido, as crescentes exigências quanto à defesa da qualidade do ambiente impõem que se proceda ao tratamento dos resíduos e efluentes orgânicos provenientes de diversas atividades no domínio da produção intensiva de alimentos, quer de natureza vegetal ou animal (SANCHUKI, *et al.*, 2011b).

Nos subprodutos agroindustriais, como citado anteriormente, há um potencial em elementos (nutrientes não mineralizados), principalmente de origem animal, que podem também ser carreados para os rios e lagos e serem considerados como uma fonte não pontual de poluição (ZHU E LEE, 2005). Por outro lado, os resíduos orgânicos por si só não podem servir de substrato para as plantas, já que necessitam sofrer modificações de ordem física e química. Os agentes dessa transformação são fundamentalmente de natureza biológica. Podem ser manipulados para permitir uma alteração correta dos materiais orgânicos, no sentido de proporcionar um produto final estável e nutritivamente enriquecido, capaz de ser utilizado com vantagem pelas plantas, sendo que a esse processo dá-se o nome de compostagem. Os benefícios da matéria orgânica do solo na produtividade das culturas são reconhecidos pelos agricultores desde tempos antigos. No entanto, o interesse pela compostagem de resíduos orgânicos aumentou, na última década, principalmente pelo surgimento da agricultura orgânica, em que o cultivo de plantas é feito sem o uso de insumos químicos (MATOS E PEREIRA, 2004).

Várias fontes de resíduos, como, por exemplo, a cama de aviário, são citadas na literatura como materiais adequados para serem transformados em fertilizantes orgânicos (TEIXEIRA *et al.*, 2004). O resíduo de aviário possui grandes quantidades de nitrogênio “N” orgânico. Do “N” presente no resíduo fresco, 60-80% está na forma orgânica. Dependendo das condições ambientais, uma grande percentagem deste nitrogênio orgânico é convertida em amônia no prazo de um ano. A amônia existe na forma de gás (NH_3) ou na forma de íon (NH_4^+), sendo este último solúvel em água. O gás pode ser perdido para a atmosfera, enquanto que o íon pode ser transformado pelos micro-organismos em nitrato e absorvido pelas plantas ou lixiviado (KELLEHER *et al.*, 2002).

2.2.2 COMPOSTAGEM

Definição

O termo compostagem é associado ao processo de tratamento e valorização de resíduos orgânicos sólidos e semissólidos, sendo um processo biológico por meio do qual a matéria orgânica constituinte do lixo e/ou resíduo é transformada, pela ação de

micro-organismos, em material estável, denominado de composto orgânico (húmus) (ORRICO JUNIOR *et al.*, 2010;MCESAPL, 2014).

A compostagem é um processo aeróbio de oxidação biológica da matéria orgânica facilmente degradável. Esta decomposição é mantida por um diversificado conjunto de micro-organismos, fundamentalmente bactérias e fungos, em condições adequadas de oxigênio, umidade e nutrientes, em que a matéria orgânica é parcialmente mineralizada e humificada pelo oxigênio do ar, resultando a liberação de dióxido de carbono, vapor de água, energia e acúmulo de calor (MCESAPL, 2014).

O desenvolvimento de temperaturas acima de 40 °C, que resultam da produção biológica de calor é o aspecto mais relevante do processo de compostagem (MATOS E PEREIRA, 2004). Deste processo de tratamento de resíduos resulta a produção de um produto estável, higienizado, designado por composto orgânico, isento de micro-organismos patogênicos e sementes viáveis de plantas, com elevado valor agregado, que pode ser aplicado e comercializado como corretivo de solo e/ou fertilizante orgânico, com benefícios para o solo e para a produção vegetal (MATOS E PEREIRA, 2004; MCESAPL, 2014).

Vantagens

O processo de compostagem é uma forma de reciclagem orgânica de resíduos. Este processo tem como vantagens:

- Diminuição do peso e volume de resíduos na ordem de 20 – 40%;
- Processo tecnologicamente simples;
- Redução da necessidade de espaço em aterro para deposição dos resíduos;
- Redução da formação de lixiviados líquidos e purgas gasosas em aterro, que requerem tratamento;
- Diminuição ou eliminação da carga poluente dos resíduos;
- Destruição da viabilidade de sementes e dos micro-organismos patogênicos, por meio da elevação da temperatura e de antagonismos microbianos;

- Estabilização da matéria orgânica;
- Produção de um composto que pode ser utilizado como condicionador de solos ou para outros fins;
- Obtenção de um composto cuja concentração de nutrientes e micronutrientes por unidade de volume é maior que no resíduo;
- Reciclagem da matéria orgânica em formato humificado com elevado poder tampão e grande capacidade de troca catiônica, que permite desenvolver e manter uma estrutura do solo que facilite o arejamento das raízes (MATOS E PEREIRA, 2004; MCESAPL, 2014).

O composto final, de menor volume e estabilizado, pode ser depositado em aterro sanitário e/ou utilizado como condicionador de solo, pois na fase de maturação ou humificação o composto atinge o auge de suas propriedades benéficas ao solo e às plantas. E por ser um composto estabilizado, evita fenômenos de competição e de fitotoxicidade. Isso é resultado de um longo período de decomposição e consequente produção de húmus e minerais essenciais para as plantas, apresentando boas propriedades físicas, químicas e biológicas. Este produto pode ainda ser utilizado para valorização energética (ORRICO JUNIOR *et al.*, 2010).

Desvantagens

Os aspectos que limitam esta técnica de tratamento de resíduos são de quatro tipos: o tempo do processo, existência reduzida de mercado para os produtos, baixa redução de volume e a liberação de odores. A colocação dos produtos no mercado é sem dúvida o aspecto de natureza mais incerta. O produto principal (o composto) tem aceitação muito diversa (MATOS E PEREIRA, 2004). A redução de volume é relativamente pequena (20 a 40%), em particular quando comparada com a incineração, o que tem implicação sobre o destino dos restantes 60 a 80%. Contudo, caso a compostagem seja considerada como um processo produtivo (produção de um bem comercializável: o composto orgânico), então a pequena redução de volume é um aspecto positivo, dado que as receitas são diretamente proporcionais à quantidade produzida (MCESAPL, 2014).

A aplicação de composto mal maturado, ou de composto resultante de resíduos contaminados, pode ocasionar também problemas de fitotoxicidade e mesmo de saúde pública. Finalmente, a presença de odores é inevitável, tanto os odores liberados pelas pilhas em compostagem como os que resultam da eventual degradação anaeróbia, quando existe umidade em demasia ou carência de oxigênio, e os que são emitidos durante o processo de revolvimento. Há ainda o problema do acúmulo de vetores de doenças, como moscas e mosquitos, e em alguns casos a geração de chorume (SANCHUKI *et al.*, 2011a).

No entanto, já é possível encontrar soluções técnicas para o controle de odores, ainda que elas impliquem necessariamente custos adicionais na compostagem. Neste aspecto, a medida primária que deve ser tomada para minorar a formação de odores é a prevenção, ou seja, realizar a compostagem em condições tecnológicas otimizadas (ORRICO JÚNIOR *et al.*, 2010).

Caracterização e fases do processo

As reações de compostagem de resíduos sólidos são muito complexas, mas ocorrem espontaneamente na natureza, como, por exemplo, a decomposição de estrume de animais ou durante a decomposição de restos vegetais. Em termos gerais, é possível distinguir duas fases bem características, que ocorrem consecutivamente: termofílica e maturação (MATOS E PEREIRA, 2004).

Fase termofílica

A fase termofílica, em que ocorre a assimilação das formas solubilizadas, dando origem a um intenso fenômeno de metabolismo e crescimento biológico com formação de CO₂, H₂O e liberação de calor, deve acontecer preferencialmente entre 55 a 65°C. No entanto, pode atingir mais de 70°C e dura alguns dias, dependendo da temperatura. Com temperaturas acima de 55°C, muitos dos micro-organismos patogênicos e sementes de plantas são inviabilizados. Acima dos 65°C, destrói-se a maioria dos micro-organismos, incluindo aqueles que são responsáveis pela decomposição (MATOS E PEREIRA, 2004; MCEAPL, 2014).

Fase de maturação

A fase de maturação é aquela em que ocorre a degradação da matéria orgânica residual mais refratária, como, por exemplo, a celulose, e as perdas de calor excedem promovendo o decréscimo da temperatura ao longo do tempo, fase esta que dura de um a dois meses (ORRICO JÚNIOR *et al.*, 2010).

Fatores que influenciam o processo

São vários os fatores operacionais que afetam diretamente o desenvolvimento da compostagem e que devem ser mantidos entre certos limites para que o processo transcorra em condições favoráveis.

Temperatura

A temperatura é um fator muito importante, principalmente para a questão de velocidade de reação química e para determinar se a operação de compostagem se processa como desejável. Cada resíduo orgânico tem uma gama de temperatura ótima, que se situa entre 50 a 60°C, abaixo da qual a reação é demasiado lenta e acima da qual há esporulação e redução da biodiversidade microbiológica, bem como a liberação de odores indesejáveis (MATOS E PEREIRA, 2004).

Para conseguir estabilizar a temperatura dentro da gama desejada, o calor produzido por oxidação microbiológica tem que ser parcialmente removido, o que ocorre essencialmente por arejamento controlado e/ou revolvimento da leira de compostagem. A generalidade dos processos de compostagem é de natureza termofílica, e isso tem como vantagem o fato de as temperaturas elevadas proporcionarem um processo de decomposição mais acelerado. A elevação de temperatura é o resultado de atividade respiratória muito intensa por parte dos micro-organismos (MATOS E PEREIRA, 2004).

Umidade

Um teor de umidade de 50 a 60% é considerado indicado para a compostagem (PROSAB, 1999). Abaixo de 35 a 40% de umidade, a decomposição da matéria orgânica é fortemente reduzida, e abaixo de 30% de umidade a decomposição é praticamente interrompida. O limite superior depende do material e do tamanho das partículas, sendo frequentemente considerado entre valores de 55 e 60% de umidade. Uma umidade superior a 65% retarda a decomposição e produz maus odores em zonas de anaerobiose localizadas no interior da pilha de compostagem, além de permitir a lixiviação de nutrientes (RODRIGUEZ *et al.*, 2008; SANCHUKI *et al.*, 2011b).

Durante a compostagem, a água serve como ambiente para que as reações químicas aconteçam, para o transporte dos nutrientes e também para a locomoção dos micro-organismos. A falta de água na pilha ou leira de compostagem retarda o processo, enquanto o excesso de água diminui a disponibilidade de oxigênio, o que limita a atividade dos micro-organismos que necessitam de oxigênio, e os micro-organismos anaeróbios passam a predominar (D'ALMEIDA e VILHENA, 2000).

Relação C/N

Dos muitos elementos químicos que os micro-organismos necessitam para proceder à compostagem, o carbono e o nitrogênio são os mais importantes. O carbono, além de ser fonte de energia para a atividade microbiana, representa uma grande parte da massa das células microbianas. O nitrogênio é essencial para a composição das proteínas, e estas representam grande parte da biomassa microbiana. Logo, o rápido crescimento dos micro-organismos depende da disponibilidade de carbono e nitrogênio (MCESAPL, 2014).

Os micro-organismos aeróbios usam de 15 a 30 gramas de C por cada grama de N, razão pela qual se recomenda uma relação C/N de cerca de 30 ou menos, para que a compostagem ocorra rapidamente. Apesar da relação C/N=30 ser desejável para o processo de compostagem, esta relação poderá variar em função das características específicas dos materiais utilizados para compostar, principalmente da disponibilidade de carbono desses materiais para o ataque microbiano. Acima de C/N=30, o crescimento dos micro-organismos é retardado pela falta de N. Para C/N<30, o excesso

de N acelera o processo de decomposição e cria áreas anaeróbias no sistema. O excesso de N é perdido para a atmosfera na forma gasosa (NH_3) (MCESAPL, 2014).

Oxigênio e/ou aeração

A aeração da pilha ou leira de compostagem favorece a oxigenação, mantendo as condições de aerobiose, a secagem e o arrefecimento no seu interior. Isto é, fornece o oxigênio para a atividade biológica, remove umidade da massa em compostagem e remove calor, diminuindo a temperatura da massa em compostagem (KIEHL, 2004; PEREIRA NETO, 2007; SANCHUKI, 2011b).

O oxigênio é um elemento necessário para o metabolismo e a respiração dos micro-organismos aeróbios, assim como para a oxidação das moléculas orgânicas presentes nos resíduos. Se ocorrer o esgotamento do oxigênio, o processo de compostagem torna-se anaeróbio, mais lento, ocorre uma grande produção de gases com odor desagradável e compostos tóxicos (D'ALMEIDA e VILHENA, 2000). A falta de oxigênio causa o ambiente redutor, resultando compostos incompletamente oxidados. Assim, a concentração de oxigênio no interior da massa em compostagem deve manter-se acima de 5%, mas não ultrapassar 15%, para evitar perdas de calor, sendo que abaixo de 10% de oxigênio, o elemento "O" poderá ser um fator limitante para que ocorra a compostagem. Ademais, quando o oxigênio fica abaixo de 5%, criam-se zonas de anaerobiose (MATOS E PEREIRA, 2004).

Potencial Hidrogeniônico - pH

No início do processo, o pH decresce até valores de aproximadamente 5 e, posteriormente, aumenta gradualmente com a evolução do processo de compostagem e estabilização do composto, alcançando finalmente valores entre 7 e 8. Assim, valores baixos de pH são indicativos de falta de maturação, devido à curta duração do processo ou à ocorrência de processos anaeróbios no interior da pilha em compostagem (KELLEHER *et al.*, 2002).

Gases

O dióxido de carbono, o vapor de água e a amônia são os principais subprodutos gasosos do processo de compostagem (KOMILIS E HAM, 2000). O dióxido de carbono é um gás fortemente associado ao efeito estufa. Sua produção resulta principalmente da

oxidação dos compostos de carbono facilmente degradáveis e depende da natureza dos substratos, do oxigênio, da umidade e da atividade dos micro-organismos. A amônia é um subproduto intermediário da degradação das proteínas, em que os micro-organismos convertem o N em amônia. Este é um gás incolor, irritante e teoricamente imperceptível ao olfato humano em níveis abaixo de 20 ppm (KOMILIS E HAM, 2000; CORRENTE *et al.*, 2001). Tanto o CO₂ como o NH₃ são emitidos em maior quantidade durante a fase termofílica (PAILLAT *et al.*, 2005).

A amônia é parcialmente responsável pelos problemas de odores comuns no processo de compostagem, podendo mesmo ter impactos na saúde humana (KOMILIS E HAM, 2000). Essa liberação, além de diminuir o teor de N do composto, pode contribuir para a poluição do ar, a acidificação das chuvas e do ambiente e a formação de aerossóis, sendo crítico este processo de perda de N, condicionando o potencial fertilizante do composto final (PAILLAT *et al.*, 2005). A liberação de amônia torna-se mais provável quando o teor de N do resíduo é superior a 2,4%, pois a quantidade que excede o necessário para os micro-organismos incorporarem na sua massa celular será liberada na forma de NH₃, sendo que a volatilização da amônia é a principal forma de perda de N durante a compostagem (CORRENTE *et al.*, 2001).

2.2.3 UTILIZAÇÃO DO COMPOSTO

Define-se composto como sendo o produto estabilizado, rico em compostos húmicos e resultante de um conjunto de transformações microbiológicas, na presença de oxigênio, de resíduos orgânicos de natureza vegetal e/ou animal, como palhas e outros resíduos das culturas, matos, resíduos sólidos urbanos, lamas de depuração e esterco (KIEHL, 1998). Em uma análise de composto orgânico, deve constar o teor de umidade, a matéria orgânica e as partes inertes. Para aplicações agrícolas, devem ser analisados também os teores de metais pesados tóxicos, a biodisponibilidade de nutrientes e a fitotoxicidade (MATOS E PEREIRA, 2004).

Aplicação no solo

Para se desenvolverem adequadamente, as plantas necessitam ter à sua disposição quantidades apropriadas de nutrientes. Quando os solos não têm a capacidade de fornecer às plantas esses nutrientes que elas necessitam, de uma forma equilibrada, pode-se recorrer à utilização de compostos orgânicos e/ou fertilizantes

químicos e/ou fertilizantes organominerais. Boa parte dos fertilizantes químicos aplicados no solo é carregada por lixiviação, sendo por isso de ação pouco duradoura. Por outro lado, o composto fornece a matéria orgânica fundamental para o melhoramento ou a manutenção das características físicas, químicas e biológicas do solo, aumentando a aeração e a retenção de umidade, melhorando a estrutura do solo, reduzindo a plasticidade e a erosão. Quando se aumenta a capacidade de retenção de água e a aeração, facilita-se a sobrevivência da cobertura vegetal nos períodos de estiagem/seca (NAKAYMA *et al.*, 2013).

Quimicamente, a matéria orgânica mineralizada é a principal fonte de nutrientes essenciais às plantas, pois além de atuar indiretamente na disponibilidade, devido à elevação do pH, aumenta a capacidade de retenção dos nutrientes, evitando perdas por lixiviação, ao mesmo tempo que solubiliza sais minerais inorgânicos, tornando-os mais acessíveis. Biologicamente, a matéria orgânica acelera a atividade biológica essencial ao crescimento das raízes (MATOS E PEREIRA, 2004; RICCI, 2006), além de ser um indicador da qualidade do solo (FONTANA *et al.*, 2001; NAKAYNA *et al.*, 2013)

Segundo Malavolta (2006), o nutriente vegetal é um elemento mineral ou mineralizado, essencial para o crescimento e a produção de biomassa das plantas, de forma que não pode ser substituído por nenhum outro e é frequentemente obtido pela planta do substrato que a sustenta.

Os nutrientes minerais essenciais correspondem de 5 a 6% da matéria seca da planta e são classificados em macronutrientes e micronutrientes. De acordo com a classificação de Marschner (1995), os macronutrientes são o Nitrogênio (N), o Fósforo (P) e o Potássio (K), assim como o Carbono (C), o Oxigênio (O) e o Hidrogênio (H), seguidos de perto pelo Enxofre (S), o Cálcio (Ca) e o Magnésio (Mg). Os micronutrientes são Boro (B), Zinco (Zn), Ferro (F), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Molibdênio (Mo), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cloro (Cl) e Selênio (Se), que são assim denominados por serem requeridos em baixas concentrações (Figura 2).

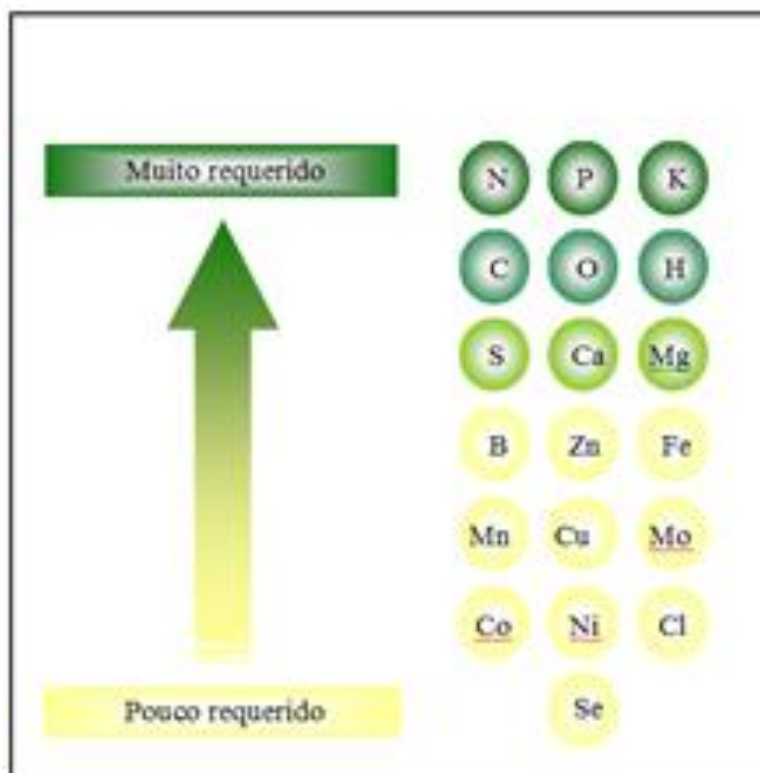


Figura 2. Elementos químicos requeridos pelas plantas em suas diferentes fases de desenvolvimento. Fonte: (LAPIDO-LOUREIRO *et al.*, 2009).

Em solos tropicais e subtropicais, a CTC da matéria orgânica pode representar um grande percentual da CTC total do solo. Nesses solos, a manutenção ou o aumento dos teores de matéria orgânica é fundamental na retenção dos nutrientes e na diminuição da sua lixiviação (SANTOS E CAMARGO, 1999). Com isso, o uso de fertilizantes formulados à base de um composto orgânico está sendo cada vez mais fomentado, a fim de se obter um fertilizante com uma capacidade de troca catiônica alta, para melhorar a adsorção de nutrientes e diminuir as perdas por lixiviação (BARBOZA *et al.*, 2012).

Segundo Santos e Camargo (1999), a matéria orgânica não possui um valor de CTC fixa, pois seu valor aumenta com a elevação do pH em função da ionização de grupos ácidos, principalmente carboxílicos (COOH). Com isto, verificou-se nos fertilizantes produzidos no laboratório da Embrapa Solos (Rio de Janeiro) uma CTC alta juntamente com valores de pH altos (BARBOZA *et al.*, 2012).

A importância do Nitrogênio (N), do Fósforo (P) e do Potássio (K) na nutrição vegetal

O nitrogênio está presente em todas as proteínas e nos aminoácidos, especialmente na clorofila. Sua deficiência promove atraso no crescimento e perda de intensidade de cor verde em toda a planta, seguida de amarelecimento das folhas do baixeiro (folhas da porção inferior da planta). As folhas secam e caem precocemente, prejudicando a produtividade e a qualidade da fibra (MULLINS E BURMESTE, 1990).

O fósforo é o nutriente envolvido em todas as transferências de energia na planta e sua deficiência provoca acúmulo de amido nos cloroplastos, reduz a fotossíntese e a translocação de carboidratos para os frutos. O potássio catalisa as atividades de várias enzimas na planta, sendo adicionalmente oportuno para a eficiência no uso da água, no aumento da fotossíntese, na translocação dos carboidratos formados para os frutos e na pressão de turgor necessária para promover maior crescimento da célula que formará a fibra. Sua deficiência promove clorose internerval nas folhas do baixeiro (folhas mais próximas do solo, ou seja, da porção inferior da planta), seguida de necrose nas margens e queda das folhas (MALAVOLTA, 1987; 1997; 2006).

O nitrogênio, o fósforo e o potássio são de grande importância na nutrição vegetal, de modo que a combinação desses, e mesmo de outros nutrientes, deve ser de forma a suprir as necessidades das diferentes culturas e, além disso, devem ser disponibilizados no momento adequado, isto é, fornecer o nutriente na fase de desenvolvimento da cultura em que ocorre o pico de absorção para posterior acúmulo (MALAVOLTA, 1987; 1997; 2006).

2.3 FERTILIZANTES ORGANOMINERAIS NO BRASIL

Na última década, o mercado brasileiro de fertilizantes organominerais cresceu a uma taxa média de 10% ao ano (Figura 3). Em 2009 foram produzidas e comercializadas cerca de 3,397 milhões de toneladas de fertilizantes organominerais. A maior parte desta produção é comercializada na forma de farelo ou em pó, e o consumo se concentra praticamente nos setores de olericultura, floricultura e plantas perenes (ABISOLO, 2009).

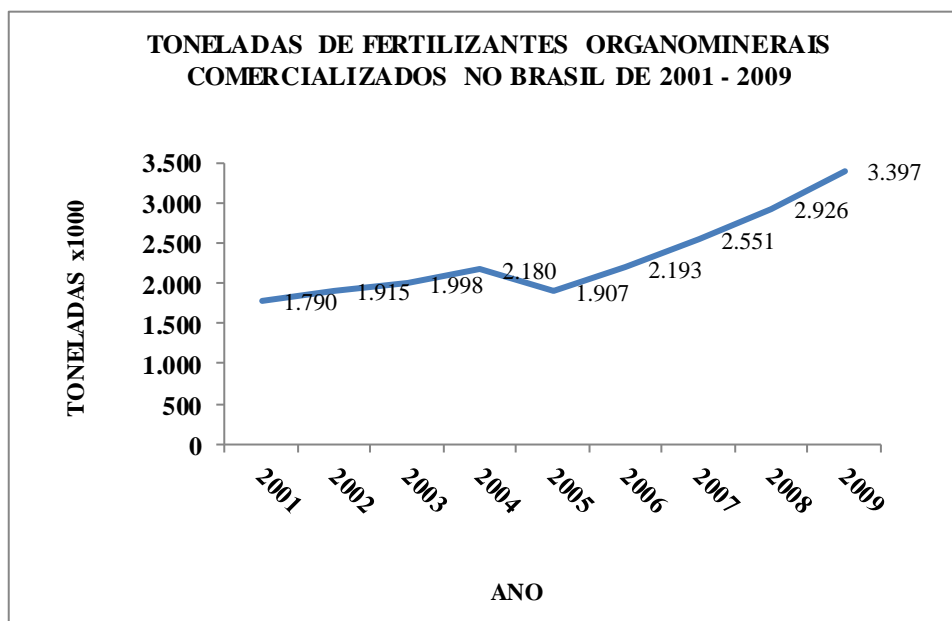


Figura 3. Comercialização de fertilizantes organominerais no Brasil entre os anos de 2001 e 2009. Fonte: (BENITES, *et al.*, 2010).

De todo o volume de fertilizante de base orgânica (orgânico e organomineral) produzido no país, apenas uma pequena parcela é destinada a grãos e fibras. A pouca utilização por esse segmento pode ser atribuída à baixa concentração de nutrientes e às características físicas do produto, uma vez que a maior parte dos fertilizantes organominerais é comercializada na forma de farelo ou pó, fator este que dificulta a utilização de implementos agrícolas do tipo plantadeira (BENITES, *et al.*, 2010).

A produção de fertilizantes organominerais na forma granulada e/ou peletizada, de forma que sejam oferecidos ao mercado produtos padronizados e com concentrações de nutrientes equivalentes às fórmulas minerais comerciais, representa o principal desafio tecnológico para ampliação do uso desses fertilizantes no Brasil. Ademais, as culturas de soja e milho utilizam os fertilizantes aplicados em quase sua totalidade na forma granulada, o que representa mais da metade de todo o consumo de fertilizantes minerais, aproximadamente 12 milhões de toneladas/ano (ANDA, 2009).

2.3.1 VANTAGENS DOS FERTILIZANTES ORGANOMINERAIS EM RELAÇÃO AOS FERTILIZANTES MINERAIS

A primeira grande vantagem dos fertilizantes organominerais em relação aos fertilizantes minerais é o fato de utilizarem como matéria-prima resíduos orgânicos que são passivos ambientais de outros sistemas de produção. A atual política nacional de resíduos sólidos enfatiza a importância do reaproveitamento e da agregação de valor aos resíduos sólidos. Aliado a esse registro, outro ponto favorável ao setor de fertilizantes organominerais é a proximidade entre o ponto de produção de resíduos de suínos e aves e as propriedades de produção de grãos. A proximidade favorece o estabelecimento de empresas regionais de produção de fertilizantes organominerais, resultando em ganho em logística (BENITES, *et al.*, 2010).

Diferentemente do sistema de produção de fertilizantes minerais, que exige grandes investimentos e instalações de grande porte, o setor de fertilizantes organominerais se enquadra em arranjos produtivos locais, associando-se a outros sistemas de produção, podendo ser uma alternativa para empresas de pequeno e médio porte. Esse modelo industrial normalmente gera mais empregos diretos que as grandes indústrias de fertilizantes. Nesse sentido, o Ministério da Agricultura preparou o Plano Nacional de Fertilizantes, em que são sugeridas medidas de incentivo às pequenas e médias empresas regionais para a produção de fertilizantes organominerais (ABISOLO, 2009).

No que diz respeito às vantagens comparativas do fertilizante organomineral em relação ao uso de resíduos *in natura*, observa-se uma redução significativa das perdas de nitrogênio pelo uso de fertilizante organomineral em relação à aplicação superficial de resíduos de suínos e aves, uma vez que o ato de enterrar ou injetar o resíduo no sulco de plantio reduz a volatilização de amônia. Nessa mesma lógica, o uso de fertilizantes organominerais reduz as emissões de gases de efeito estufa, representando ganhos ambientais em relação ao uso dos resíduos *in natura* (SBCS, 2004).

Comparativamente aos fertilizantes minerais, ainda faltam experimentos de longa duração no campo que permitam avaliar com maior precisão a eficiência dos fertilizantes organominerais. Os principais benefícios esperados são em relação à eficiência no fornecimento de fósforo. Teoricamente, espera-se maior eficiência em

relação ao fornecimento de fósforo, em função da presença de grande quantidade de ânions orgânicos nos grânulos de fertilizantes organominerais. Estes ânions orgânicos competem pelos sítios de adsorção de “P”, abundantes em solos tropicais, reduzindo momentaneamente a fixação desse nutriente e favorecendo a absorção pelas plantas. Espera-se ainda, um aumento da atividade microbiana no entorno da área de aplicação do fertilizante organomineral devido ao fornecimento de condições de desenvolvimento destes micro-organismos. Podem ocorrer efeitos adicionais sobre o crescimento de raízes, promovidos por compostos orgânicos presentes no fertilizante organomineral (BENITES, *et al.*, 2010).

2.3.2 PERSPECTIVAS PARA O SETOR DE FERTILIZANTES ORGANOMINERAIS E IMPACTOS ESPERADOS COM A EXPANSÃO DO USO DESSA TECNOLOGIA NO BRASIL

A produção de fertilizantes organominerais a partir de resíduos agropecuários pode minimizar o passivo ambiental gerado pelas atividades de avicultura e suinocultura. Ademais, a expansão da utilização desta tecnologia impactará diretamente a demanda brasileira por “N”, “P” e “K” importados. Em relação aos impactos socioeconômicos, espera-se uma diversificação da produção de fertilizantes, incentivando as pequenas e médias empresas (BENITES, *et al.*, 2010).

Devido a limitações de escala de produção, o mercado de fertilizantes organominerais explora nichos de mercado diversificados, não competindo diretamente com a indústria tradicional de fertilizantes minerais. Com o fortalecimento desses segmentos, surgirão novos empregos nas plantas de produção, na coleta da matéria-prima e na distribuição dos produtos acabados. Adicionalmente, a produção regionalizada de fertilizantes pode promover ganhos de logística e permitir o desenvolvimento de fertilizantes específicos para os sistemas produtivos locais, respeitando diferenças de solo, clima e cultivos, o que permitirá aumento na eficiência do uso desse importante insumo da cadeia agrícola. (BENITES, *et al.*, 2010).

Ademais, uma maior aceitação dos organominerais pelo mercado produtor de grãos, que é o maior consumidor de fertilizantes no Brasil, está baseada na superação de três desafios: a peletização do composto orgânico juntamente com a parte mineral; o

desenvolvimento de formulações com maior concentração de NPK; e padronização dos produtos acabados.

Embora o fortalecimento do setor de fertilizantes organominerais não seja uma ação que reverta a dependência externa brasileira por fertilizantes e nem impacte diretamente a formação dos preços dos fertilizantes, os fatores ambientais e socioeconômicos relacionados a essa atividade justificam a adoção de medidas estratégicas que estimulem esse setor (FAO, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Validar o processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização da cama de aviário por meio de testes químicos, físicos, biológicos e agronômicos realizados em laboratório e em campo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter um composto orgânico e um fertilizante organomineral por meio do processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário e determinar suas características químicas, físicas e biológicas.
2. Determinar a eficiência do fertilizante organomineral obtido, frente as principais culturas (milho, feijão e soja), avaliando-se parâmetros agronômicos em experimentos realizados em laboratório e em campo.
3. Desenvolver um produto comercial que atenda às necessidades agropecuárias dos produtores e quantificar o potencial da tecnologia no âmbito nacional, ou seja, relacionar o potencial de mercado com o potencial do uso do processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização.

4. METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO ORGÂNICO E ORGANOMINERAL

4.1.1 Coletas e acondicionamento da cama de aviário

As coletas de cama de aviário (cinco ninhadas crescidas sobre o mesmo suporte) foram realizadas em granjas de aves da região próxima a cidade de Formosa-GO (Figura 4), em um raio de até 30 km de distância. Este fator é importante no custo do frete rodoviário do resíduo e consequentemente influencia diretamente o valor final do produto.

A cama de aviário foi retirada das granjas de aves por meio de equipamento do tipo pá mecânica, por empresas especializadas, acondicionada em caminhões caçamba basculante, cobertos com lona e transportada até o Protótipo Industrial, localizado em Formosa - GO, armazenadas em galpão coberto, onde foi medida a umidade presente na mesma pelo equipamento HIDROFARM HFM2010x. Posteriormente, os lotes foram identificados passando de resíduo orgânico a matéria-prima para a produção de composto orgânico e/ou fertilizante organomineral de alto valor agregado.

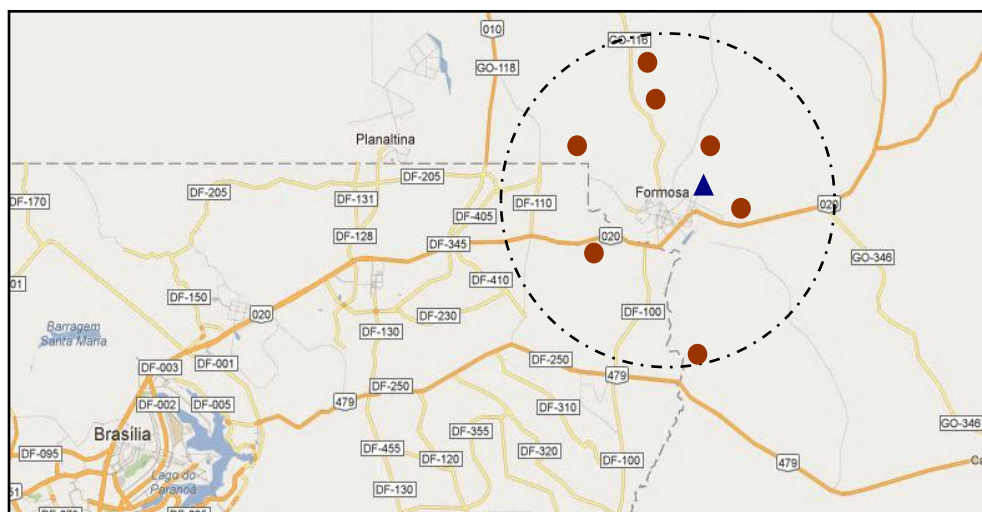


Figura 4. Região de coletas de cama de aviário, realizadas em um raio de até 30 km de distância da indústria de processamento da mesma (triângulo azul), localizada na cidade de Formosa-GO (distante 70 km de Brasília – DF). Imagem adaptada do website: <http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=ll>

4.1.2 Processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário

O processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário está em processo de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (PI0910087-3 A2). Para fins ilustrativos, abaixo são apresentadas etapas deste processo (Figura 5).

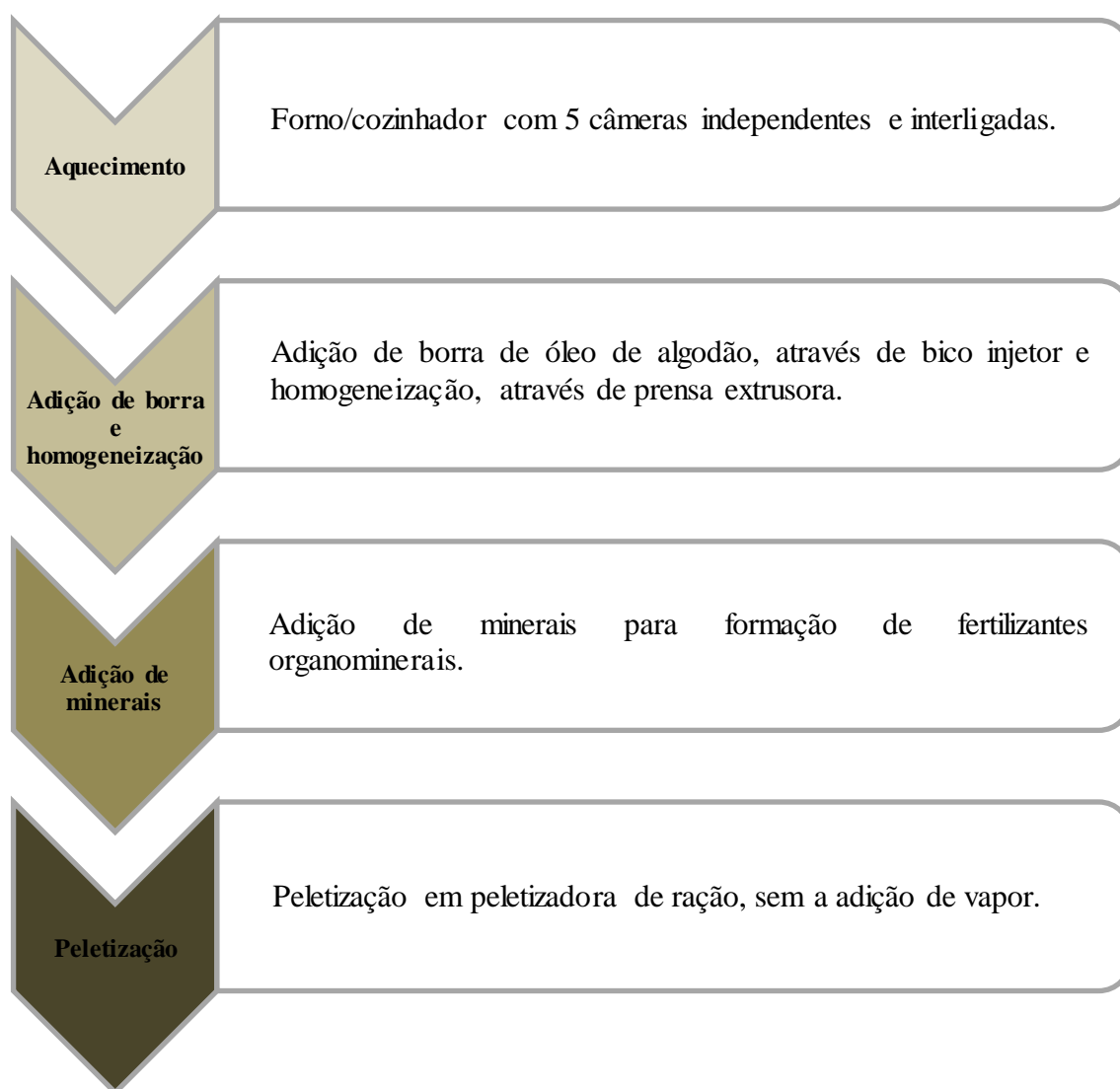


Figura 5. Fluxograma do processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário para a produção de composto orgânico e de fertilizantes organominerais.

Na Primeira etapa a cama de aviário foi aquecida por uma hora em um gradiente de temperatura de 40, 50, 55, 60, 70 °C, com a utilização de um forno cozinhador

industrial de cinco estágios (Figura 6), objetivando-se eliminar patógenos, sementes diversas e ativar processos de biotransformações.

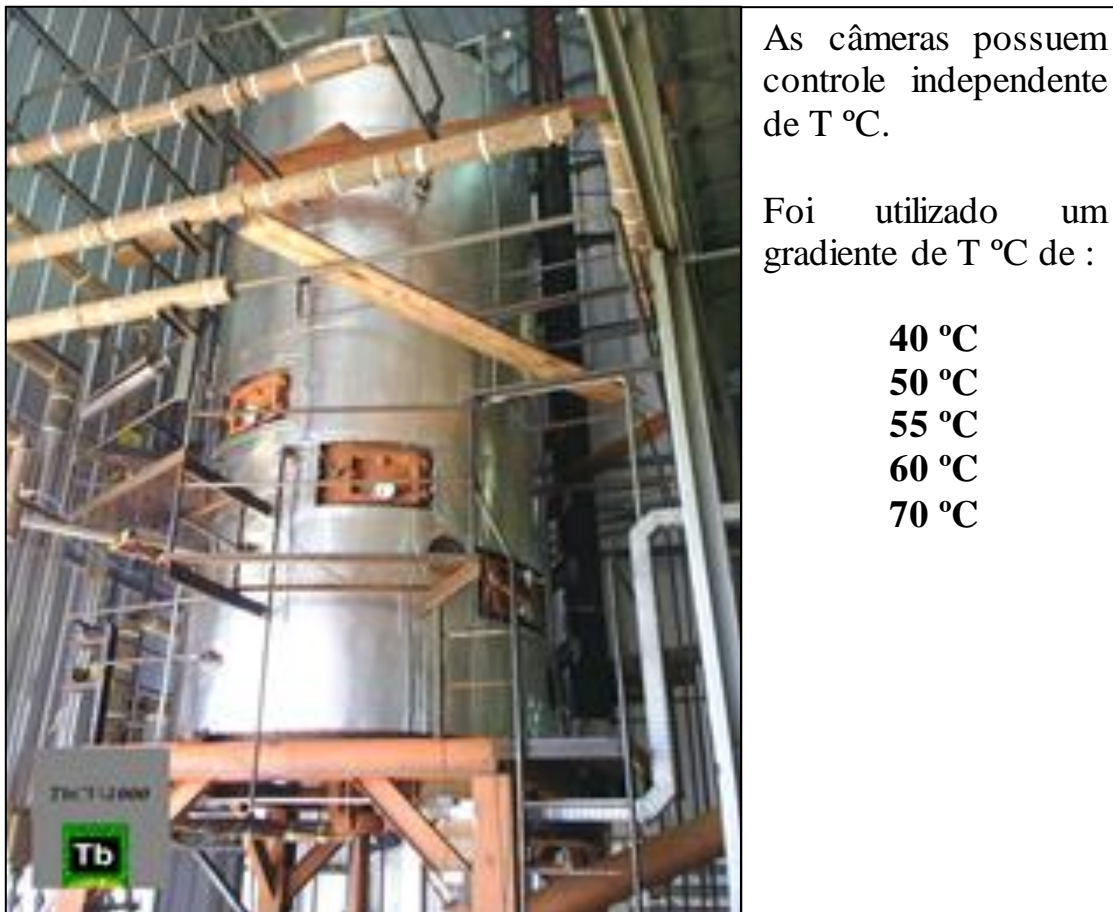


Figura 6. Cozinador de cinco estágios e de fluxo contínuo utilizado no aquecimento da cama de aviário. As setas indicam as portas de acesso a cada câmara do forno. Foto retirada do website: <http://tecnobach.com.br/produto.php?id=8>.

Na Segunda etapa foram adicionados 100 kg de borra de óleo de algodão, por tonelada de cama de aviário. Esta “massa” quente (cama de aviário aquecida + borra de óleo de algodão) foi direcionada a uma prensa extrusora de eixo helicoidal (Figura 7) com capacidade de 3 toneladas/h.

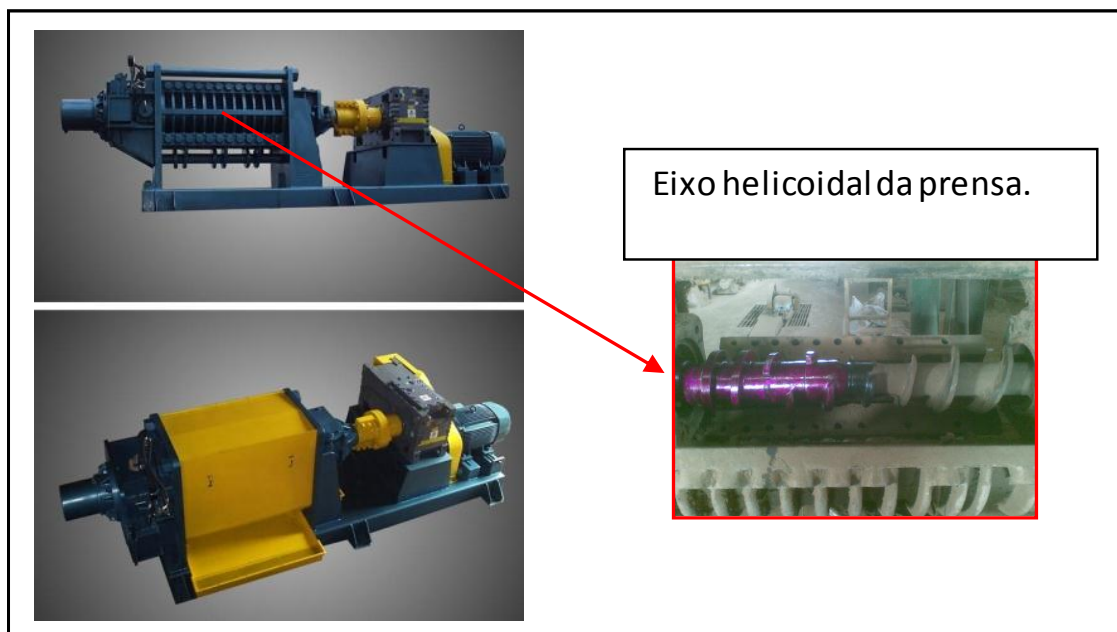


Figura 7. Prensa extrusora utilizada para homogeneização da cama de aviário aquecida à borra de óleo de algodão. Em vermelho está destacado o eixo helicoidal modificado para este tipo de resíduo. Imagem retirada do website: <http://www.brombimaq.com/pb125.html>.

A partir deste momento, a “massa” aquecida de cama de aviário + borra de óleo de algodão foi deixada em repouso por 72 horas para o resfriamento. Após o repouso, a matéria orgânica compostada foi encaminhada para silos de armazenamento. Posteriormente na Terceira etapa foram adicionados e homogeneizados, minerais (cloreto de potássio - KCl, Mono-amônio fosfato - MAP, Uréia e Ácido Bórico) dentro das proporções necessárias para se formular fertilizantes organominerais. Na Quarta e última etapa, a de peletização, o composto orgânico ou o fertilizante organomineral passaram por uma matriz perfurada, sob pressão, ocorrendo a formação dos pellets (Figura 8).

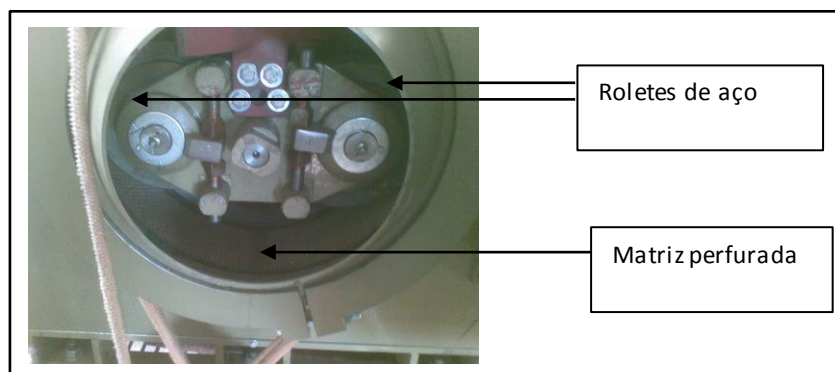


Figura 8. Detalhe do interior da peletizadora. No centro podem ser visualizados os dois roletes de aço, que pressionam o resíduo já compostado e/ou fertilizante organomineral, sobre uma matriz perfurada, desta forma produzindo os pellets.

Após passar pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário as características visuais e olfativas do composto orgânico produzido foram observadas, já que ocorrem modificações de tais aspectos em relação à cama de aviário *in natura*.

Amostras do composto pronto foram retiradas de quatro diferentes pontos (Figura 9) e posteriormente misturadas, acondicionadas em saco plástico transparente, identificadas e enviadas ao laboratório para caracterização dos seguintes parâmetros: Condutividade Elétrica – CE, Capacidade de Troca Catiônica – CTC, Relação CTC/C orgânico e Relação C/N.

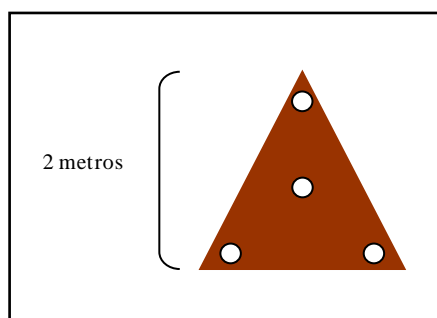


Figura 9. Figura esquemática de uma leira (monte) de composto orgânico pronto, e os pontos de amostragem do composto orgânico produzido pelo novo processo de digestão e de peletização de cama de aviário.

4.1.3 Determinação dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do composto orgânico e dos fertilizantes organominerais

Os parâmetros analisados no composto e nos fertilizantes organominerais foram determinados de acordo com as exigências da legislação específica do setor responsável, ou seja, pelo MAPA. Todos os testes foram realizados por laboratório credenciado no MAPA e descrito nos itens abaixo.

4.1.3.1 *Determinação da temperatura*

A temperatura do composto orgânico foi medida por intermédio de equipamento do tipo termômetro com escala entre 0 e 150 °C (unidade padrão utilizada °C).

4.1.3.2 *Determinação da umidade*

Os lotes de cama de aviário tiveram a umidade determinada pelo uso do equipamento HIDROFARM HFM 2010 (Falker Automação Agrícola) (Figura 10). Este aparelho permite a medição de umidade sem a necessidade de retirada de amostra. Já o composto orgânico e os fertilizantes organominerais produzidos foram avaliados segundo Brasil (2007), em laboratório credenciado pelo MAPA.



Figura 10. Aparelho Hidrofarm HFM 2010, utilizado para aferir a umidade dos lotes de cama de aviário e do composto produzido. Imagem retirada do website: www.falker.com.br

4.1.3.3 *Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)*

O pH foi determinado conforme metodologia proposta por Silva (1999) com algumas modificações. A amostra bruta foi diluída em água destilada na razão de 1:10 e homogeneizada através de agitação orbital com rotação de 120 rpm e temperatura ambiente por um período de 30 minutos.

4.1.3.4 *Determinação do nitrogênio (N)*

A determinação do teor de “N” foi realizada através do analisador elementar Flash 2000 da Thermo Scientific. As amostras foram secas a 60 °C por um período de 24 horas e trituradas. Posteriormente foram pesadas, em balança analítica e 2 mg das amostras foram encapsuladas em estanho e levadas para a análise. Sendo os resultados obtidos em porcentagem de concentração do elemento. Para a obtenção dos resultados oficiais (para posterior registro das formulações), amostras dos produtos foram encaminhadas para laboratório credenciado ao MAPA e analisadas segundo Brasil (2007).

4.1.3.5 *Determinação da concentração do fósforo ($H_2PO_4^-$) solúvel em água*

O teor de fósforo na forma $H_2PO_4^-$ foi determinado através do método espectrofotométrico com azul de molibdênio, conforme descrito no Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (SILVA, 1999). Para a obtenção dos resultados oficiais, amostras dos produtos foram encaminhadas para laboratório credenciado ao MAPA e analisadas segundo Brasil (2007).

4.1.3.6 *Determinação da concentração do potássio (K^+) solúvel em água*

A quantificação do elemento K^+ foi realizada através do cromatógrafo de íons Compac IC 761 com detector Bioscan 817 da Metrohm. Os resultados foram obtidos em mg de K^+ por ml de amostra e convertidos em mg de K por grama de massa seca de composto. Para a obtenção dos resultados oficiais, amostras dos produtos foram

encaminhadas para laboratório credenciado ao MAPA e analisadas segundo Brasil (2007).

4.1.3.7 *Determinação da capacidade de troca catiônica – CTC*

A CTC foi realizada conforme indicado pelo MAPA através do Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos (BRASIL, 2007). Para a obtenção dos resultados oficiais, amostras dos produtos foram encaminhadas para laboratório credenciado ao MAPA.

4.1.3.8 *Determinação do carbono orgânico total - COT*

A determinação do COT foi realizada através do analisador elementar Flash 2000 da Thermo Scientific. As amostras foram secas a 60 °C por um período de 24 horas e moídas até a obtenção de um fino pó. Após, foram pesadas 2 mg das amostras em cápsula de estanho e levadas para a análise.

4.1.3.9 *Avaliação da relação CTC/C*

A relação entre a Capacidade de Troca Catiônica – CTC e o Carbono – C foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\frac{CTC}{C}$$

Uma relação entre a Capacidade de Troca Catiônica e Carbono >1,7 indica uma boa humificação e como consequência é obtido um bom composto orgânico (BRASIL, 2007).

4.1.3.10 *Avaliação da relação C/N*

A determinação da relação C/N foi realizada através do analisador elementar Flash 2000 da Thermo Scientific. As amostras foram secas a 60 °C por um período de 24 horas e moídas até a obtenção de um fino pó. Posteriormente, 2 mg das amostras

foram pesados e colocados em cápsulas de estanho e levadas para a análise. Os resultados foram obtidos em porcentagem de cada elemento e a relação C/N calculada através da divisão dos teores de C pelos teores de N. Na relação C/N, valores próximos a 10/1 indicam uma boa humificação do composto orgânico obtido (BRASIL, 2007).

4.1.3.11 *Determinação de presença de patógenos do tipo nematoide*

Para a avaliação da presença de nematoides no composto orgânico farelado e peletizado, assim como no fertilizante organomineral peletizado, amostras de um quilograma foram retiradas e enviadas para laboratório, onde foram procedidas as análises de *Helicotylenchus sp.*, *Meloidogyne sp.*, *Pratylenchus sp.*, *Rotylenchulus sp.*, *Trichodorus sp.* (JENKINS, 1964).

4.2 AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DO FERTILIZANTE ORGANOMINERAL

4.2.1 Teste *in vitro*

4.2.1.1 *Avaliação de raízes de milho em tubos de ensaio*

Objetivando analisar o desempenho do fertilizante organomineral obtido pelo processo Físico-Químico-Mecânico de Digestão e Peletização, através do desenvolvimento radicular *in vitro*, foi analisado o crescimento de raízes de milho da cultivar BRS3025. O experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial com quatro repetições. Como fonte de nutrientes, foi utilizado em três diferentes distâncias da semente (1 cm, 5 cm e 12 cm), o fertilizante organomineral 4-14-8 (concentração de (4% de N, 14% de P e 8% de K na fórmula), e como testemunha o fertilizante mineral 4-14-8 adquirido comercialmente (Figura 11). Para facilitar a observação das raízes, utilizamos como substrato um ágar do tipo Fitagel 3,2 g/L, autoclavado por 20 minutos a 120 °C. Após 15 dias, de germinada a semente, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio e o resultado do desenvolvimento radicular foi mensurado. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de TUKEY a 5% de probabilidade usando-se o programa SPSS (VERSION 10.0 CHICAGO SPSS INC.).

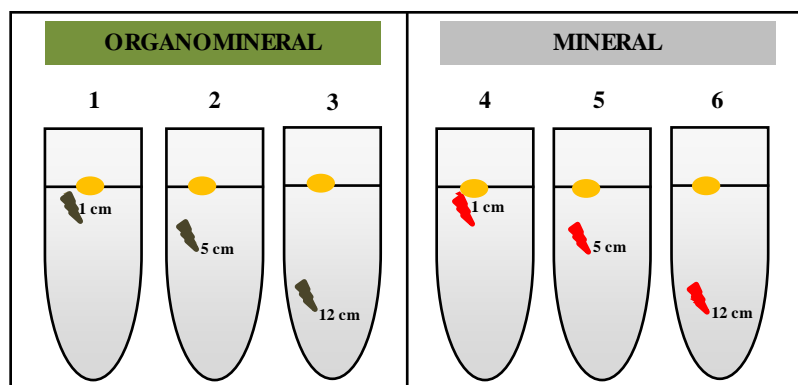


Figura 11. Desenho esquemático da disponibilização da fonte de nutrientes em relação à semente de milho. As distâncias utilizadas foram 1 cm (nº 1 e 4), 5 cm (nº 2 e 5) e 12 cm (nº 3 e 6) da semente.

No tratamento organomineral foi oferecido como nutriente, o fertilizante 4-14-8 organomineral produzido pelo Processo Físico-Químico-Mecânico de Digestão e de Peletização. Da mesma forma, no tratamento mineral (testemunha) foi oferecido como nutriente, o fertilizante 4-14-8 mineral comercial. Em amarelo está representada a semente de milho, o raio marrom claro representa o fertilizante organomineral e o raio em vermelho o fertilizante mineral comercial.

4.2.2 Testes agrônômicos em campo experimental

4.2.2.1 Avaliação de produtividade de milho

A cultivar de milho utilizada foi a BRS3025, em um campo experimental de 50 m² localizado em Brasília – DF. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições (Figura 12). Cada parcela foi composta, por uma fileira de cinco metros de comprimento, com espaçamento de um metro. O número de plantas por parcela foi de 16, sendo utilizada plantadeira manual. Os tratamentos constituíram-se da aplicação, no sulco de plantio, de 250 gramas de fertilizante organomineral (4-14-8) produzido pelo processo Físico-Químico-Mecânico de digestão e peletização, e de 250 gramas de fertilizante mineral (4-14-8) comercial. A posteriori, foram realizadas quatro aplicações de ureia, somando um total de 160 gramas para cada parcela, nas seguintes fases de desenvolvimento da planta (quatro folhas, oito folhas,

doze folhas e no pendoamento). O experimento foi conduzido entre os meses de setembro de 2009 e fevereiro de 2010.

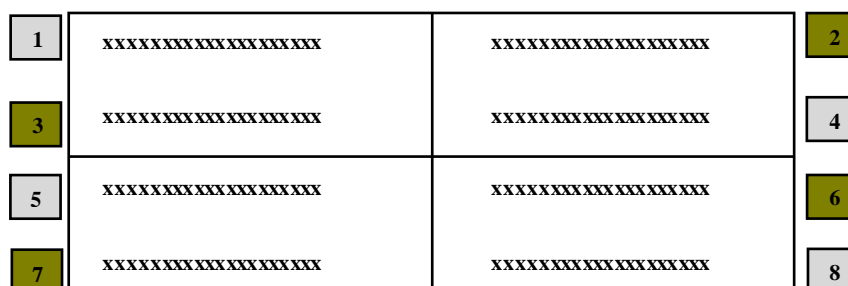


Figura 12. Desenho esquemático do campo experimental de milho com área total de 50 m².

O experimento foi realizado em blocos casualizados, com quatro repetições onde (1, 4, 5 e 8) representam parcelas de milho adubadas, no sulco de plantio, com fertilizante 4-14-8 mineral comercial; e (2, 3, 6 e 7) são parcelas de milho adubadas, no sulco de plantio, com fertilizante 4-14-8 organomineral produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização. O controle de plantas daninhas, insetos e doenças foram executados de acordo com recomendações de manejo para a cultura e a irrigação foi usada quando necessário para que não houvesse déficit hídrico.

Foi mensurada a produção de grãos de milho por parcela, determinando-se a produtividade. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Não-Paramétrico – Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade usando-se o programa SPSS (VERSION 10.0 CHICAGO SPSS INC.).

4.2.3 Testes agrônômicos em campo comercial

Para a verificação dos resultados, obtidos *in vitro* e campo experimental, o fertilizante organomineral (4-14-8) produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização foi avaliado em três diferentes importantes culturas brasileiras: soja, milho e feijão. Para tanto, foi aplicada a experimentação extensiva, onde os experimentos são realizados em fazendas, nas condições da prática, essenciais para que se julgue adequadamente a aplicabilidade e conveniência econômica dos novos métodos indicados pela experimentação intensiva (PIMENTEL-GOMES, 2000).

4.2.3.1 *Avaliação de produtividade de milho*

Foi utilizado, para avaliação em campo comercial, o milho híbrido P3862H da PIONEER® nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012. Os tratamentos constituíram-se da aplicação, no sulco de plantio, de 600 kg/ha do fertilizante organomineral (4-14-8), produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização, e 600 kg/ha de um fertilizante mineral (4-14-8) comercial. Ambas as áreas possuíam 250 hectares/ano/safra e o plantio foi conduzido segundo a prática agrícola da fazenda, localizada no município de Buritis – MG. A posteriori foram conduzidas duas aplicações de ureia (fonte de nitrogênio “N”) na lavoura, que somaram um total de 180 kg/ha nas seguintes fases de desenvolvimento da planta (4 folhas e no pendoamento), sendo que esta condução de ureia foi realizada nas duas áreas: teste e testemunha.

4.2.3.2 *Avaliação de produtividade de feijão*

Para avaliação da produtividade de feijão, em campo comercial irrigado, foi utilizada a variedade Carioca, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012. Os tratamentos constituíram-se da aplicação, no sulco de plantio, de 600 kg/ha do fertilizante organomineral (4-14-8), produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização, e 600 kg/ha de um fertilizante mineral (4-14-8) comercial. Ambas as áreas possuíam 50 hectares/ano/safra e o plantio foi conduzido segundo a prática agrícola da fazenda, localizada no município de Luziânia – GO (Figura 13). Após a emergência das plantas foram realizadas duas aplicações de ureia (na área teste e na testemunha) comumente chamada de adubação de cobertura, sendo a primeira com 15 dias (90 kg/ha) e a segunda com 45 dias (90 kg/ha).

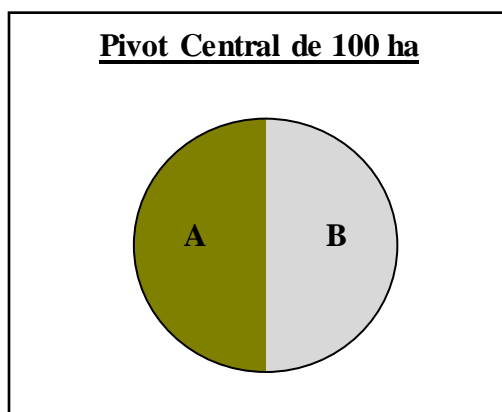


Figura 13. Desenho esquemático do Pivot Central de 100 ha de área, utilizado para desenvolvimento do plantio comercial de feijão (variedade Carioca). **A**) em verde área de 50 ha adubada, no sulco de plantio, com fertilizante organomineral (4-14-8), produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização; **B**) área de 50 ha utilizada como testemunha, também no sulco de plantio, um fertilizante mineral (4-14-8) comercial.

4.2.3.3 Avaliação de produtividade de soja

Foi utilizada variedade de soja A7002 da empresa BEVILCQUA e FONTANELLA[®] nos anos/safra 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012, em plantios de 500 hectares/ano/tratamento. Como fonte de nutrientes foram empregados 600 kg/ha de fertilizante organomineral (4-14-8), produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização, e como testemunha 600 kg/ha de um fertilizante mineral (4-14-8) comercial, sendo o plantio conduzido segundo a prática agrícola da fazenda, localizada no município de Buritis – MG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO ORGÂNICO E FERTILIZANTE ORGANOMINERAL DA CAMA DE AVIÁRIO

5.1.1 Coletas e acondicionamento da cama de aviário

A quantidade de cama de aviário coletada na região de Formosa-GO está apresentada na Tabela 1. Do início do projeto, até o final do ano de 2012 foram coletadas e processadas mais de 3000 toneladas deste tipo de resíduo. É possível observar um crescimento das atividades da indústria e uma elevada capacidade do projeto em absorver este tipo de coproduto agropecuário.

Tabela 1. Dados de toneladas de cama de aviário coletadas e processadas na região de Formosa – GO.

COLETA DE CAMA DE AVIÁRIO					
Ano	Toneladas/Trimestre				Total/Ton/Ano
	1º	2º	3º	4º	
2009/2010	100	70	100	150	420
2011	160	90	180	220	650
2012	180	210	600	1150	2140
2013*	1000	1000	1000	10000	13000
2014*	10000	10000	10000	10000	40000

*** Estimativa após automatização do protótipo de Formosa-GO e do início das operações na nova unidade, instalada em Toledo-PR.**

Durante o período de implementação do projeto, foi possível observar uma alta capacidade de processamento de cama de aviário, como apresentado em 2012 com 2140 toneladas coletadas e processadas. Assim como, a necessidade de uma constante verificação de características químicas e físicas deste coproduto para a produção de fertilizantes, ou seja, análise de umidade, quantidade de aves criadas sobre o mesmo suporte e o tipo de suporte utilizado. Estes fatores vão proporcionar padronização e qualidade ao produto final.

Como borras de óleo de algodão são adicionadas no processo de compostagem, padronizou-se que a cama de aviário recebida na unidade de processamento poderia ter no máximo 20% de umidade, já que uma porcentagem superior pode alterar as características físicas do produto acabado. Como exemplo, em uma umidade >30% há um grande aumento na quantidade de produto final com granulometria inadequada, sendo necessário o retorno do mesmo para a etapa de peletização.

Também foi observado, que a cama de aviário com menos de cinco aves crescidas sobre o suporte, altera significativamente a concentração final de nutrientes mineralizados e consequentemente, resulta em um produto sem as características desejadas, ou seja, com uma quantidade inferior de N, P e K. Já o coproduto que vem com o suporte de cepilha (pequenas lascas de madeira) apresenta a necessidade de passar por uma trituração mais efetiva, tornando assim as partículas menores e passíveis de processamento.

Por fim, após o recebimento e triagem da cama de aviário faz-se necessária uma adequada estocagem da mesma, isto significa proteção da chuva e do sol, bem como um local arejado. Este fator garante que as características analisadas no recebimento sejam mantidas até o momento de uso e, portanto colabora diretamente com a qualidade do produto obtido ao final de todo o processo.

5.1.2 Processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário

O processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário foi desenvolvido a partir da compreensão do processo natural de compostagem, bem como de características peculiares do processo, tais como, o aumento da temperatura, que pode ultrapassar os 60 °C (PROSAB, 1999), liberação de exsudados alcalinos e/ou ácidos, dependendo dos micro-organismos colonizadores (ALBERTA, 2005) e não menos importante a pressão exercida pela parte superior da pilha de resíduos sobre a porção inferior.

Tendo em vista os parâmetros supracitados e a aplicação de fenômenos físicos, químicos e mecânicos, foi possível demonstrar que o processo desenvolvido apresentou eficiência no tratamento de cama de aviário e principalmente na peletização do composto orgânico juntamente com os minerais essenciais para a produção de fertilizantes do tipo organomineral. Sendo o fator de peletização relevante, haja vista, a

necessidade de utilização de implementos agrícolas, do tipo plantadeiras, para a realização do plantio de grãos em grandes, médias e pequenas extensões de terra, desta forma, facilitando a aplicação do produto e promovendo o uso do mesmo.

Da mesma forma, outra característica deste processo é a redução do tempo para se produzir um composto orgânico dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira (CE <4; CTC 60-80; CTC/C >1,7; C/N >10). O tempo total, para que a cama de aviário passe por todas as etapas do processo é de 1,5 h (uma hora e trinta minutos). Dados da literatura, mostram que é possível obter um composto, também utilizando cama de aviário, a partir de 28 dias (SANCHUKI *et al.*, 2011a), sendo que processos tradicionais levam aproximadamente 180 dias (BENITES, *et al.*, 2010; SANCHUKI *et al.*, 2011a).

Após o processo físico-químico-mecânico, amostras do composto orgânico foram analisadas a fim de determinar a maturação da cama de aviário, para tanto parâmetros de indicação de compostagem foram analisados e estão apresentados na Tabela 2. Datas iguais indicam lotes diferentes que foram processados no mesmo dia.

Tabela 2. Parâmetros de indicação de compostagem, de diferentes lotes de composto orgânico produzidos pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização de cama de aviário. Condutividade Elétrica – CE, Capacidade de Troca Catiônica – CTC, Relação entre Capacidade de Troca Catiônica/Carbono orgânico - CTC/C e Relação entre Carbono orgânico/Nitrogênio - C/N.

PARÂMETROS DE INDICAÇÃO DE COMPOSTAGEM				
Composto Orgânico (data da análise)	CE (dS/m)	CTC (mE/100g)	CTC/C	C/N
29/11/2010	2,6	75,0	1,9	11,6
29/11/2010	2,0	59,0	1,7	14,0
28/03/2011	2,2	86,0	3,2	11,0
25/08/2011	2,3	42,0	1,6	9,0
14/09/2011	2,0	56,0	1,3	13,2
26/09/2011	2,0	43,0	1,2	12,1
29/12/2011	1,6	59,0	1,6	11,8
Média	2,1	60,0	1,8	11,8
Legislação	Até 4	60-80	>1,7	>10
Cama de aviário antes de ser digerida pelo processo	9	45	0,25	4

As análises dos diferentes lotes de composto orgânico produzidos demonstraram a compostagem e bioestabilização dos mesmos. Os resultados da CE alcançaram uma média de 2,1 dS/m, sendo que a legislação exige níveis de até 4 dS/m. Para a CTC foram obtidos resultados médios de 60 mE/100g enquanto a legislação exige entre 60-80mE/100g, da mesma forma a relação CTC/C apresentada foi em média de 1,8 atendendo a legislação, que exige >1,7) e a relação C/N foi de 11,8 (legislação >10).

Tendo em mãos os resultados supracitados, o foco dado ao projeto foi de agregar valor e demanda pelo composto maturado. Neste sentido, buscou-se transformar o composto orgânico em fertilizantes organominerais, que por sua vez possuem uma maior concentração de nutrientes, o que proporciona atender às necessidades nutricionais de “grandes culturas” (espécies vegetais mais cultivadas, como a soja, feijão, arroz e milho) (BENITES *et al.*, 2010). Desta forma, o resíduo compostado entra na composição de fórmulas comerciais de fertilizantes e torna-se uma alternativa para um mercado de mais 28 milhões de toneladas/ano, o dos fertilizantes (ANDA, 2009).

5.1.3 Determinação de parâmetros físicos, químicos e biológicos do composto orgânico e dos fertilizantes organominerais produzidos

5.1.3.1 Determinação da temperatura do composto orgânico

O composto orgânico (maturado) e sem a adição de minerais teve sua temperatura (T °C) aferida durante 72 horas, a fim de atingir a temperatura ideal para a adição dos minerais. Observou-se que o calor foi dissipado e a temperatura da leira alcançou níveis aceitáveis para prosseguir no processo de produção de fertilizantes organominerais, após 72 horas (aproximadamente 31 °C) (Figura 14).

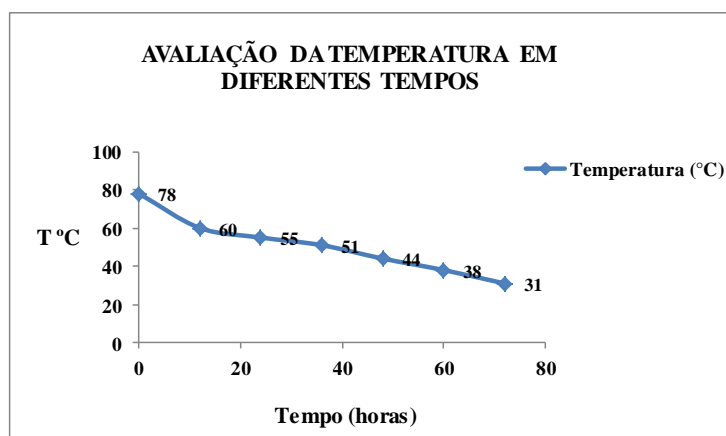


Figura 14. Gráfico da temperatura do composto orgânico em diferentes tempos.

Cabe neste momento observar, que é relevante para o processo que, a temperatura não esteja muito elevada (acima dos 35 °C) no momento de misturar os minerais ao composto orgânico, pois, o excesso de calor promove reações diversas e não desejadas, tais como a volatilização de componentes que serão adicionados para a produção dos fertilizantes organominerais, além de indicarem a não completa estabilização do composto produzido.

5.1.3.2 Determinação da umidade

A cama de aviário coletada nas granjas e armazenada no protótipo industrial possuía característica de 8 a 15% de umidade. Este fator é importante para o processo, pois no composto são acrescentados resíduos (borras) que apresentam um alto grau de umidade (85-92%). Desta forma, o composto orgânico produzido pelo processo e os fertilizantes organominerais tiveram umidade que variaram de acordo com o apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de umidade presente em diferentes fertilizantes formulados a partir do composto orgânico (2-2-2) produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização. A mesma numeração indica lotes diferentes do mesmo produto.

AVALIAÇÃO DA UMIDADE DE DIFERENTES FERTILIZANTES PRODUZIDOS	
Amostra (N-P-K)	UMIDADE (%) a 65 °C
2-2-2	9,8
1-14-8	8,1
3-15-15	7,4
3-15-3	12,9
4-4-8	9,9
4-14-8	9,3
4-14-8	5,4
4-14-8	9,2
4-14-8	8,4
15-3-15	10,5
Média	9,09
Desvio Padrão	1,99

Os resultados apresentaram uma umidade satisfatória e que atende a legislação brasileira, que é de até 50% de umidade para compostos orgânicos, como no caso da amostra 2-2-2 e de 30% para fertilizantes organominerais (demais amostras) (BRASIL, 2009).

Neste momento cabe ressaltar que a umidade do substrato é um fator de grande importância no processo de compostagem natural, uma vez que esta é fundamental para atividade microbológica (PEREIRA NETO, 2004). Durante o processo de compostagem a umidade ideal encontra-se na faixa entre 50 e 60% (BIDDLESTONE E GRAY, 1991; KIEHL, 2004; SANCHUKI, 2011b). Contudo, o processo aqui avaliado não se baseia na utilização de micro-organismos para a efetiva maturação do substrato, e sim no uso de parâmetros físicos, químicos e mecânicos para a efetiva bioconversão da cama de aviário em composto orgânico, sendo este fator relevante para que se consiga uma eficiente peletização dos fertilizantes organominerais.

5.1.3.3 Determinação do potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH do composto orgânico (2-2-2) e dos diferentes fertilizantes organominerais, obtidos através do processo foco deste estudo, foram aferidos e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado de potencial Hidrogeniônico do composto orgânico e de diferentes fertilizantes, obtidos pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização.

POTENCIAL HIDROGENIÔNICO DE DIFERENTES PRODUTOS	
Produto e pontos de N, P e K	pH
Composto orgânico (2-2-2)	7,1 - 8,3
Fertilizante organomineral (4-14-8)	6,4 - 7,2
Fertilizante organomineral (3-15-15)	6,1 - 6,5
Fertilizante organomineral (15-03-15)	5,9 - 6,3

Resultados de pH próximos a neutralidade ou tendendo a alcalinidade indicam uma boa maturação do substrato (KIEHL, 2004). Conforme dados supracitados na Tabela 4, o composto orgânico (2-2-2) apresentou pH variando entre 7,1 – 8,3. Esta variação pode ser explicada pela variedade e não uniformidade das camas de aviários

utilizadas no processo de compostagem, uma vez que foram coletadas em diferentes granjas da região. Já nos diferentes fertilizantes organominerais podemos observar uma diminuição no pH, o que é procedente da adição de minerais à formulação.

5.1.3.4 Determinação da concentração de N, P, K, C e da CTC de fertilizantes

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de diferentes fertilizantes, obtidos com o processo de compostagem aqui estudado.

Tabela 5. Composição de N, P, K, C e CTC do composto orgânico e dos diferentes fertilizantes organominerais obtidos pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização.

COMPOSIÇÃO DE N, P, K, C E CTC DO COMPOSTO ORGÂNICO E FERTILIZANTES ORGANOMINERAIS					
Tipo do Fertilizante (N-P-K)	Elementos analisados (%)				CTC (mmol _c .kg ⁻¹)
	N	P	K	C	
Composto orgânico (2-2-2)	1,9 - 3,4	2,1 - 4,2	1,9 - 3,6	34,7 - 49,3	730 - 890
Fertilizante Organomineral (4-14-8)	4,1 - 4,6	13,8 - 15,7	7,9 - 9,5	31,9 - 46,1	590 - 900
Fertilizante Organomineral (2-15-2)	2 - 3,8	14,8 - 16,9	1,9 - 3,3	28 - 41,8	610 - 780
Fertilizante Organomineral (8-15-6)	8,1 - 9,1	14,5 - 16,5	6,1 - 7	30,4 - 37,9	640 - 810
Fertilizante Organomineral (15-3-15)	15,2 - 17	5,1 - 6,5	15,2 - 18,1	29,3 - 36,4	450 - 770
Fertilizante Organomineral (20-2-2)	20,2 - 22,3	2,2 - 3,6	2,2 - 3,3	32 - 41,3	570 - 720

Os resultados apresentados, nos diferentes lotes de composto orgânico e fertilizantes organominerais (Tabela 5) apontaram para uma variação na concentração dos elementos mensurados (N, P, K, C) e na CTC. Embora, as concentrações de N, P, K, C e CTC encontradas nos seis produtos acabados, produzidas pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização, foco deste trabalho, sejam consideradas satisfatórias pela legislação pertinente.

A variação no número de aves que foram criadas sobre o mesmo suporte, a umidade presente, a espécie de ave criada, etc., pode ser apontada como possível fator na diversidade encontrada na matéria orgânica, levando ao aumento ou diminuição dos componentes (elementos minerais) formadores do produto acabado. Foi observado que cada estudo realizado com cama de aviário os resultados foram sempre próximos aos determinados, mas diversificados. Portanto, a qualidade da cama de aviário utilizado no processo de compostagem, está estreitamente relacionada aos valores finais dos elementos minerais presentes nos lotes do produto acabado, o adubo.

Neste sentido, a literatura relata diferentes valores de nitrogênio, fósforo e potássio disponíveis em cama de aviário, o que corrobora com os resultados obtidos neste documento. Kelleher e colaboradores (2002) relatam níveis de 3,56 % de N total, disponível em um composto de esterco de galinha. Já Orrico Júnior e colaboradores (2010) apresentaram níveis de N da ordem de 2,41%. E níveis de N superiores a 3% foram relatados por Bueno e colaboradores (2008).

Em um estudo publicado por Orrico Júnior e colaboradores (2010) foram detectadas concentrações de fósforo de 1,77% em cama de aviário compostada. Outro trabalho demonstra uma grande diversidade de disponibilidade de P em diferentes materiais, valores que variam de 0,20 a 3,87% (SEVERINO *et al.*, 2006).

Da mesma forma os níveis de potássio solúvel em água, encontrado em cama de aviário variam, como por exemplo, em seu trabalho Orrico Júnior e colaboradores (2010) o K disponível foi de 2,60%. Já Severino e colaboradores (2006) detectaram níveis de 1,10%.

Os índices de carbono orgânico encontrados nos diferentes lotes de compostos orgânicos, produzidos pelo processo aqui estudado corroboram com os estudos, com cama de aviário, realizados por Sanches (2007) e onde foram obtidos resultados de 40,42% Em seu trabalho, Ogunwande e colaboradores (2008) obtiveram resultados de menor concentração de C, aproximadamente 26,47%, valores estes próximos aos alcançados por Orrico Júnior e colaboradores (2010), que foram de 22,25%.

Os valores de CTC que são utilizados como indicativo de um bom composto, também são bastante diversificados de 1000 – 3000 $\text{mmol}_c.\text{kg}^{-1}$ (PEREIRA NETO, 2007). Outros estudos tem mostrado resultados diferentes, que variam de 600 – 800 $\text{mmol}_c.\text{kg}^{-1}$ (KIEHL, 1998; PEREIRA NETO, 2007) e de 550 – 900 $\text{mmol}_c.\text{kg}^{-1}$ (SANCHUKI, *et al.*, 2011b).

Neste trabalho, obtivemos resultados de N, P, K, C e CTC aproximados com a literatura. Também foi observado que há a necessidade do acompanhamento permanente, dos lotes de cama de aviário, composto orgânico e do produto acabado (fertilizantes organominerais). Este fator por sua vez, acumula qualidade aos produtos que são liberados para o mercado, já que abona a presença dos elementos nas concentrações desejadas de cada fórmula.

5.1.3.5 Determinação de patógenos

Foram avaliadas amostras do composto orgânico farelado (sem peletizar), composto orgânico peletizado e fertilizante organomineral peletizado, e em nenhuma das amostras foram encontrados nematoides dos gêneros *Helicotylenchus sp.*, *Meloidogyne sp.*, *Pratylenchus sp.*, *Rotylenchulus sp.* e *Trichodorus sp.*

Em estudo de compostagem, de cama de suíno, Orrico Junior e colaboradores (2009) discutem a efetividade de temperaturas superiores a 65 °C no controle de patógenos e de sementes de plantas daninha, que possam estar presente na matéria orgânica utilizada em processos de compostagem, corroborando com Mercedes e Pereira Neto (1993).

5.2 AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DO FERTILIZANTE ORGANOMINERAL OBTIDO PELO PROCESSO FÍSICO-QUÍMICO-MECÂNICO DE DIGESTÃO E DE PELETIZAÇÃO

5.2.1 Observação de raízes de milho em tubos de ensaio

Nos testes de desenvolvimento radicular *in vitro* utilizando plantas de milho foram obtidos resultados que apontam para um padrão diferenciado, quando utilizado o fertilizante organomineral 4-14-8 (concentração de NPK na fórmula) comparado com o fertilizante mineral comercial 4-14-8. Nos tratamentos com organomineral, mesmo em distâncias muito próximas do adubo (1 e 5 cm), houve a germinação das sementes e desenvolvimento das raízes (Figura 15 (A e B) e Figura 16). O mesmo não foi observado no tratamento mineral, onde, nas mesmas distâncias, não ocorreu à germinação das sementes (Figura 15 (C e D) e Figura 16). Este fator pode ser explicado, pela rápida disponibilidade dos íons nos fertilizantes minerais, o que pode promover uma alta salinidade na região próxima ao adubo com consequente inviabilidade das sementes ou efeito de toxicidade para as células radiculares (KHALAF e KOO, 1983; SCIVITTARO, *et al.*, 2004; SINHA e HERAT, 2012; DEEKS *et al.*, 2013). No ambiente, esta rápida disponibilidade dos nutrientes para a planta também não é eficiente, pois diminui a absorção dos nutrientes e facilita processos de perda como lixiviação, volatilização e/ou quelatização dos elementos a outros presentes no solo (SHAVIV, 2001).

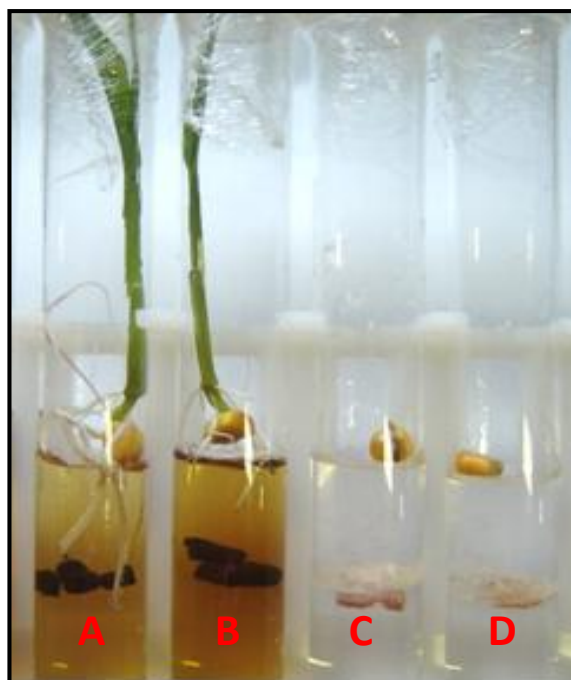


Figura 15. Experimento de visualização da germinação de sementes de milho em diferentes fontes de nutrientes a cinco centímetros de distância da semente. **A** e **B** foi utilizado o fertilizante organomineral 4-14-8. **C** e **D**, tratamento com fertilizante mineral comercial 4-14-8.

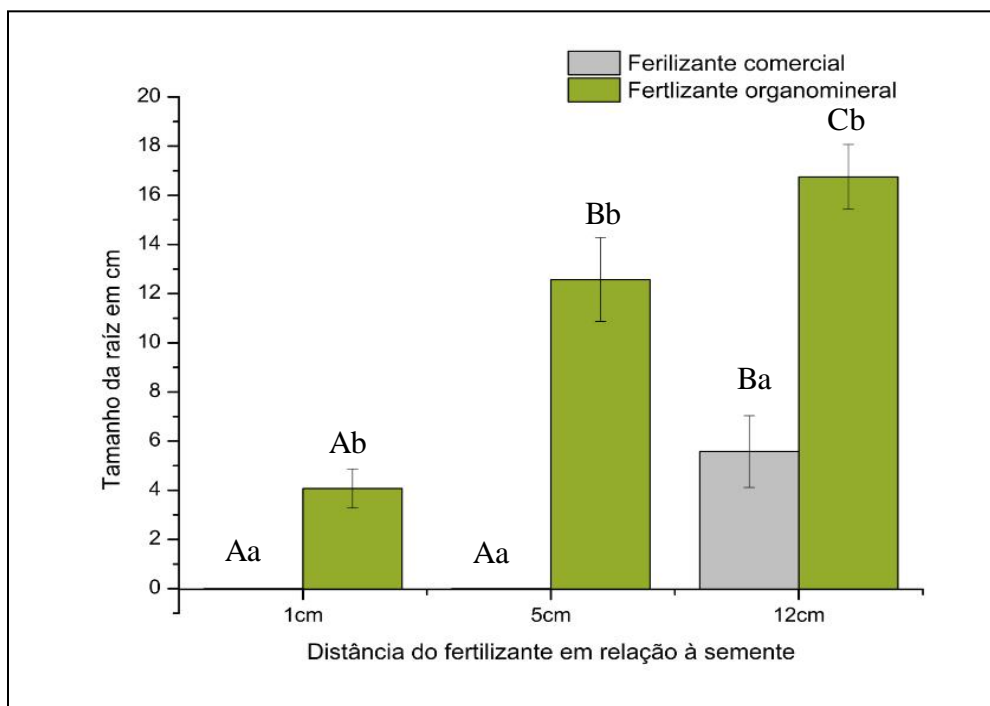


Figura 16. Desenvolvimento radicular *in vitro* de plantas de milho. Como tratamentos foram utilizados duas fontes de nutrientes: fertilizante organomineral 4-14-8 e fertilizante mineral comercial 4-14-8 em três diferentes distâncias das sementes (1, 5 e 12 cm).

- Letras maiúsculas representam a comparação do tratamento com fertilizante nas diferentes distâncias;
- Letras minúsculas representam a comparação entre os dois fertilizantes em cada uma das distâncias;
- Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como observado nas Figuras 16 e 17 os resultados obtidos no tratamento organomineral, com a semente posicionada a 12 cm de distância apresentou um desenvolvimento radicular três vezes superior quando comparado com o mineral. O trabalho de Scivittaro e colaboradores (2004) mostra que o desenvolvimento de caules e parte aérea de mudas de citros adubadas com fertilizantes organominerais peletizados também foi superior em comparação a adubação feita com fertilizantes minerais não peletizados e/ou revestidos. De acordo com Bennett (1996) a liberação lenta ou gradual,

promovida por determinadas classes de fertilizantes pode ser classificada, genericamente, em três grupos: peletizados, quimicamente alterados e recobertos. O primeiro grupo compreende compostos de baixa solubilidade, na forma de “pellets”, cuja liberação dos nutrientes depende da ação microbiana. No segundo grupo, estão incluídos os fertilizantes modificados de maneira a converter parte dos nutrientes em formas insolúveis em água, liberadas ao meio de forma gradativa. Os fertilizantes recobertos incluem compostos solúveis envolvidos por uma membrana semi-permeável, que controla a liberação de nutrientes ao meio de cultivo ou substrato.



Figura 17. Desenvolvimento radicular de plantas de milho adubadas com fertilizante mineral (lado esquerdo da foto) e do lado direito utilizando como fonte de nutrientes, fertilizante organomineral produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização.

Na maioria dos casos, os adubos organominerais não são encontrados peletizados devido à dificuldade no estabelecimento dos pellets (Benites *et al.*, 2010). Frente a isso, a peletização é outra característica importante do processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário, pois possibilita que os fertilizantes organominerais sejam utilizados em implementos agrícolas do tipo plantadeiras, que são normalmente utilizados nos sistemas de grandes culturas, tais como milho, soja, feijão e outras.

5.2.2 Avaliação de produtividade de milho em campo experimental

Na Figura 18 são apresentadas fotos do campo experimental de milho em diferentes estágios de desenvolvimento: (A) Plantio; (B) 15 dias após a germinação; (C) e 45 dias após a germinação. Após 15 dias de germinação já foi possível observar um maior porte das plantas no tratamento organomineral.

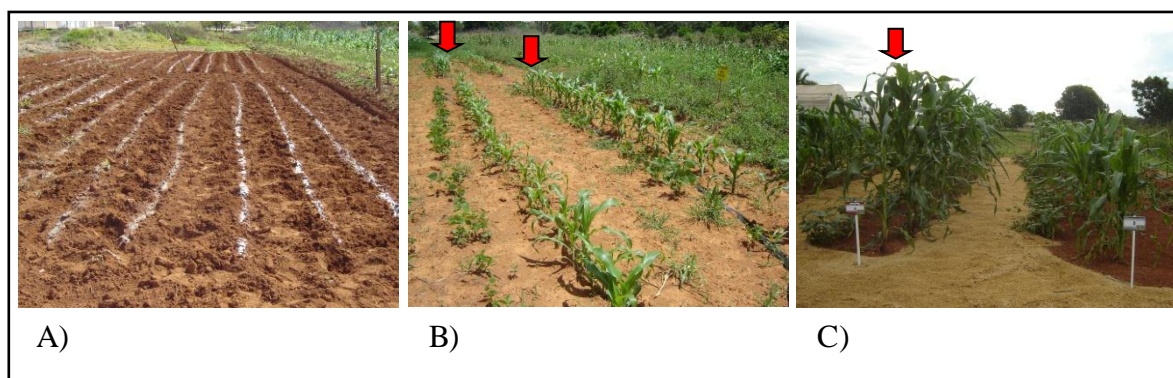


Figura 18. Campo experimental de milho. **A)** Vista do campo experimental durante o plantio; **B)** 15 dias após a germinação; e **C)** 45 dias após a germinação. As setas vermelhas apontam para os tratamentos com o fertilizante organomineral 4-14-8.

Neste experimento foram coletados dados da composição de folhas de plantas de milho, que demonstraram uma melhor absorção de nutrientes no tratamento com fertilizante organomineral em comparação com a testemunha (fertilizante mineral). A Tabela 6 apresenta os dados das análises de forma a comparar os resultados dos dois tratamentos.

Tabela 6. Tabela comparativa entre a composição elementar de folhas de plantas de milho adubadas com fertilizante organomineral 4-14-8 e a testemunha com fertilizante mineral 4-14-8.

ANÁLISE FOLIAR DE PLANTAS DE MILHO						
Nutrientes analisados	Concentrações adequadas	Fertilizantes		Diferença	Diferença (%)	
		Organomineral	Mineral			
Nitrogênio (N) g/kg	28 - 35	29	23,5	5,5	18,97%	
Fósforo (P) g/kg	1,8 - 3	2,56	2,13	0,43	16,80%	
Potássio (K) g/kg	13 - 30	20,4	14,2	6,2	30,39%	
Cálcio (Ca) g/kg	2,5 - 10	3,53	3,42	0,11	3,12%	
Magnésio (Mg) g/kg	1,5 - 5	1,21	1,16	0,05	4,13%	
Enxofre (S) g/kg	1,4 - 3	0,99	0,98	0,01	1,01%	
Boro (B) ppm	10 -- 25	14,2	13,4	0,8	5,63%	
Cobre (Co) ppm	6 -- 20	8	7,4	0,6	7,50%	
Ferro (Fe) ppm	30 - 250	80,4	78,5	1,9	2,36%	
Manganês (Mn) ppm	20 - 200	63,3	56	7,3	11,53%	
Zinco (Zn) ppm	15 - 100	40,9	34,6	6,3	15,40%	
Sódio (Na) ppm	x	607	606	1	0,16%	

É possível observar que no tratamento organomineral houve uma melhor absorção e assimilação de diferentes nutrientes analisados quando comparado com a testemunha (fertilizante mineral). Tal fator pode ser explicado pela diversidade de elementos que compõem o composto orgânico utilizado na fabricação dos fertilizantes organominerais (SINHA e HERAT, 2012), já que os minerais são constituídos unicamente pelo que está descrito na formulação, por exemplo, fertilizante mineral 4-14-8 (4% de N, 14% de P e 8% de K). Outro fator relevante que pode influenciar na absorção dos nutrientes é a característica presente nos compostos orgânicos e nos fertilizantes organominerais de condicionador do solo, melhorando as características físicas, químicas e biológicas da rizosfera e consequentemente promovendo a liberação de íons, antes indisponíveis (SINHA e HERAT, 2012; DEEKS *et al.*, 2013).

As plantas, assim como os diferentes organismos complexos, necessitam de diferentes elementos no seu desenvolvimento, sendo que estes são encontrados nos solos em concentração e disponibilidade variável (LAPIDO-LOUREIRO *et al.*, 2009). Desta forma, a suplementação destes nutrientes através de fertilizantes é uma estratégia eficiente e adotada como prática agrícola (SINHA e HERAT, 2012). Ademais, os fertilizantes organominerais possuem uma variedade de elementos e características ímpares, que possibilitam um maior desenvolvimento das plantas e consequentemente ganho em produtividade, por exemplo, a ativação da microbiota, o que por sua vez, promove uma maior mineralização dos nutrientes do solo, tornando-os disponíveis para as plantas (DEEKS *et al.*, 2013).

Outro dado relevante extraído do campo experimental de milho foi que as espigas do milho tratado com fertilizante organomineral possuíam em média duas fileiras grãos (Figura 19 B) a mais do que as espigas da testemunha (Figura 19 A).

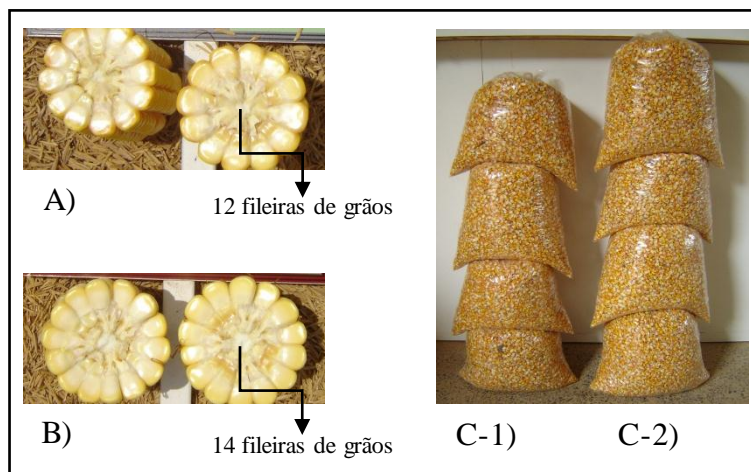


Figura 19. Milho produzido em campo experimental. **A)** Espiga de milho com 12 fileiras de grãos (testemunha, fertilizante mineral); **B)** Espiga de milho com 14 fileiras de grãos (fertilizante organomineral); **C-1)** Resultado do milho adubado com fertilizante mineral (testemunha); **C-2)** Resultado do milho adubado com o fertilizante organomineral. Cada saco de milho é referente a uma fileira com 16 plantas.

Os resultados do campo experimental de milho indicaram uma diferença superior de 16,38% para o tratamento organomineral 4-14-8, quando comparado com o mineral comercial 4-14-8 (Figura 20). Apesar de ambos os tratamentos terem recebido a mesma quantidade de NPK, o fertilizante organomineral fornece às plantas carbono e outros nutrientes presentes na matéria orgânica, que não são encontrados nos fertilizantes minerais (MUTEGI *et al.*, 2012; DEEKS *et al.*, 2013); bem como apresenta um pH que favorece a absorção dos nutrientes pelas plantas e por possui uma alta Capacidade de Troca Catiônica, ou seja, uma capacidade de trocar cargas (íons) com solo e/ou raízes, fator este não presente nos fertilizantes minerais (SINHA e HERAT, 2012).

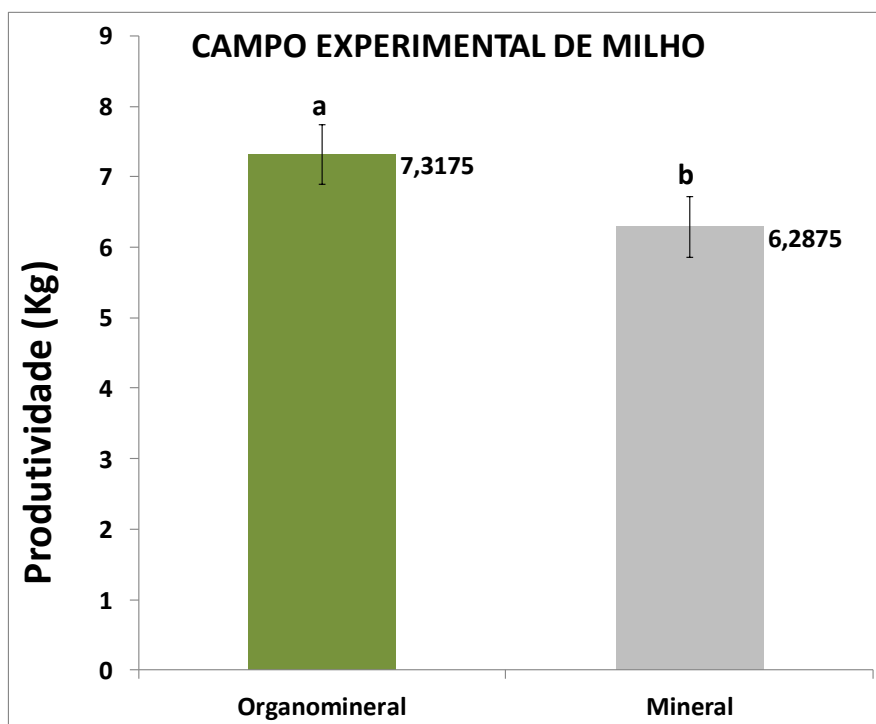


Figura 20. Resultado comparativo entre dois diferentes tratamentos, na produtividade de milho, em campo experimental.

No estudo realizado por Egodawatta e colaboradores (2013) foram obtidos resultados de 15-20% de aumento de produtividade de milho, quando utilizou-se matéria orgânica em conjunto com o NPK mineral. Em seu trabalho Mutegi e colaboradores (2012) ressalva a importância da adoção de metodologias agrônomicas que visem o uso de matéria orgânica juntamente com os minerais (NPK), ocorrendo a melhoria das características nutricionais do solo, como por exemplo, a liberação de diferentes elementos como Ca, Mg e K, e consequente ganho de produtividade e rentabilidade financeira.

Neste trabalho, os resultados do campo experimental de milho mostraram o potencial uso do fertilizante organomineral avaliado. Foi colhido, em média, por fileira de 16 plantas 7,3175 kg (+ 16,38%, com $p \leq 0,05$), quando utilizado o fertilizante organomineral (4-14-8), já a testemunha, com o fertilizante mineral (4-14-8) comercial, o resultado foi em média de 6,2875 kg (Figura 20). Com base nos resultados obtidos foram feitas análises em campos comerciais, a fim de avaliar a aplicabilidade a nível prático da tecnologia desenvolvida.

5.2.3 Avaliação de Produtividade de Milho em Campo Comercial

A Figura 21 apresenta os dados de produtividade do plantio comercial de milho, com o fertilizante organomineral 4-14-8 produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização, em comparação ao fertilizante mineral 4-14-8 adquirido comercialmente (testemunha). O rendimento médio da área cultivada com fertilizante organomineral foi de 33,56% superior em comparação à área testemunha.

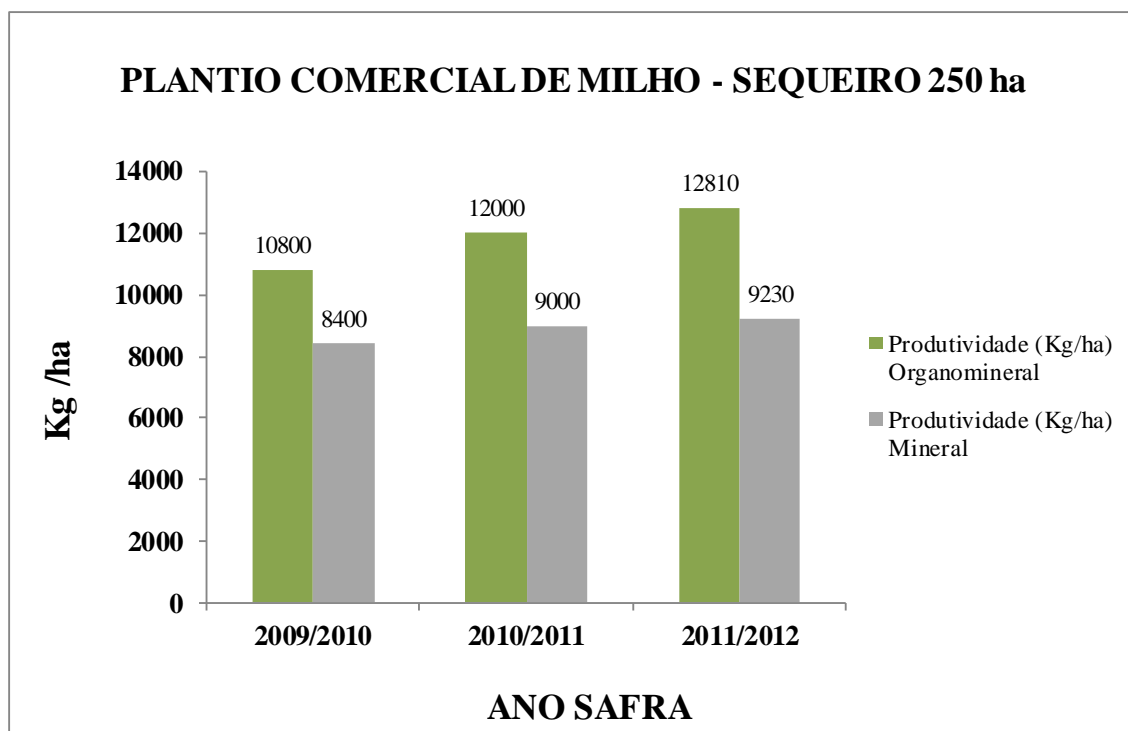


Figura 21. Plantio comercial de milho realizado na região de Buritis – MG, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.

A diferença de produtividade, do tratamento organomineral, foi de 28,57%, 33,33% e 38,78%, em relação à testemunha (fertilizante mineral comercial) nos três anos de testes. Os resultados significativos, obtidos no campo comercial de milho, quando utilizado fertilizante organomineral podem estar relacionados à adição da matéria orgânica associada aos minerais, principalmente em solos como o cerrado brasileiro (baixa quantidade de material orgânico). Em solos com estas características, o uso de fertilizantes de base orgânica favorece as condições físicas, químicas e biológicas do mesmo, ocorrendo a liberação de íons antes imobilizados e consequente aumento de absorção de nutrientes pelas plantas e ganho de produção (EFTHIMIADOU *et al.*, 2010, SINHA *et al.*, 2010; MUTEKI *et al.*, 2012). Sinha e colaboradores (2010)

também mostraram que o uso de fertilizantes vermicompostados promoveu um aumento de 30-40% de produtividade de milho quando comparado aos químicos.

Tratando-se de grande culturas, o incremento de produção pode fazer a diferença no resultado financeiro de uma lavoura, em anos/safra não ideais, como por exemplo, com estiagem prolongada, índice pluviométrico elevado no momento da colheita, incidência de insetos-praga, entre outros (MUTEGI *et al.*, 2012). Os altos custos de instalação de uma lavoura e a dependência do clima e ambiente torna o plantio, em alguns casos, um negócio de risco. Portanto, o uso de tecnologias, que auxiliem no desenvolvimento da lavoura, contribuam com o aumento de reservas energéticas e potencializem a produtividade é estratégico para o agricultor e para a produção mundial de alimentos (ROUSSEFF, 2009).

5.2.4 Avaliação de Produtividade de Feijão em Campo Comercial

Foi obtido, já na primeira safra utilizando o fertilizante organomineral produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização, um aumento de 9,67% em relação ao tratamento com fertilizante mineral, comercialmente adquirido (Figura 22).

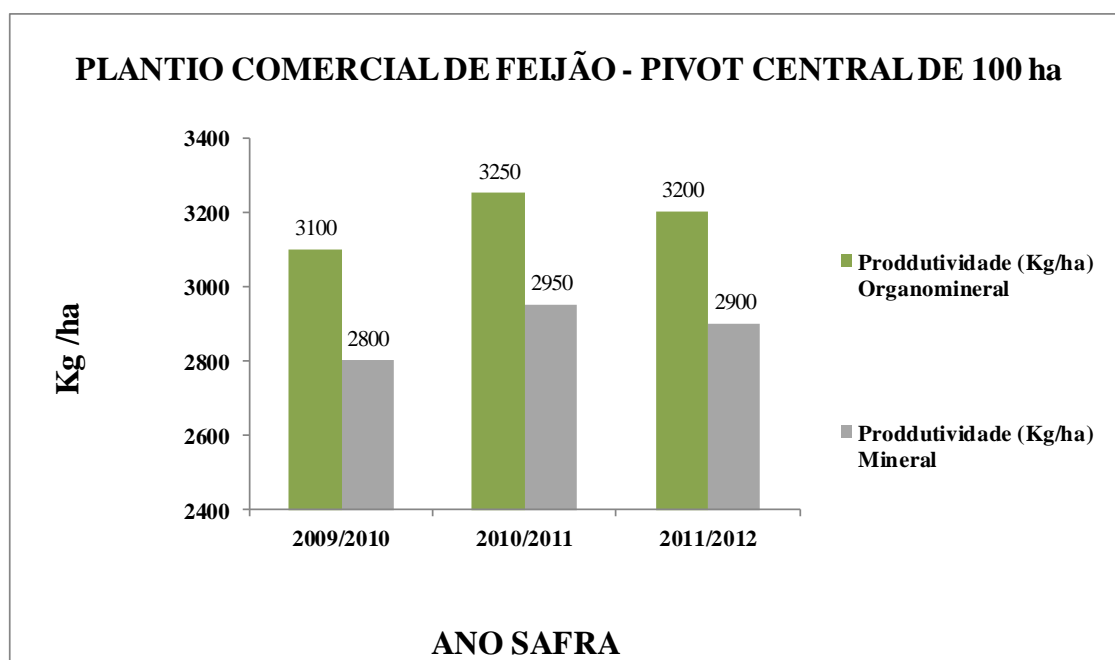


Figura 22. Plantio comercial de feijão realizado na região de Cristalina – GO, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.

A diferença de produtividade, do tratamento organomineral, foi de 9,67%, 9,23% e 9,37%, em relação à testemunha (fertilizante mineral comercial) nos três anos de testes. Dados da literatura destacam o potencial uso de fertilizantes orgânicos e organominerais, no aumento de produtividade de diferentes culturas. Estudos estes, realizados em países com solos e condições climáticas/ambientais distintos (EFTHIMIADOU *et al.*, 2010, SINHA *et al.*, 2010; YAMIKA E IKAWATI, 2012).

Nakayama e colaboradores (2013) obtiveram resultados superiores significativos, em plantio direto de feijão, adubado com fertilizante organomineral quando comparado com o tratamento com fertilizante mineral. No estudo de avaliação da resposta do feijão-fava em função da adubação orgânica (esterco caprino) e adubação mineral (NPK) realizada por Carvalho (2012), mostrou se benéfico o emprego do esterco caprino por contribuir para o aumento no rendimento da cultura. Doses de 40 t ha⁻¹ de esterco caprino, associado a 200 kg ha⁻¹ de fertilizante mineral, foram responsáveis pelo número máximo de 119 vagens por planta e pela maior produtividade (3 t ha⁻¹). Gadioli e Neto (2004) também sugerem que a aplicação de doses de lodo de esgoto no solo proporciona aumentos nos rendimentos de culturas agrícolas. Em seu trabalho, a aplicação de lodo de esgoto 5 t ha⁻¹, calculada pela taxa de nitrogênio disponível no mesmo e recomendado às culturas do feijão preto, apresentou rendimento significativo quando comparado a adubação mineral.

A adição de matéria orgânica traz uma série de benefícios para o solo e, conseqüentemente, para as plantas cultivadas porque reduz a acidez, diminui os teores de alumínio e manganês tóxicos, aumenta pH, CTC, o transporte e disponibilidade de micronutrientes (RODRIGUES, 1994; CARDOSO e OLIVEIRA, 2002). A presença de adubação orgânica ainda favorece o aumento nos estoques de carbono orgânico e nitrogênio total (RAIJ, 1991; LEITE *et al.*, 2003; CIANCIO, 2010). Além disso, plantas adubadas organicamente, apresentam-se de maneira mais equilibrada, o que resulta em melhor desenvolvimento vegetativo quando comparadas àquelas adubadas exclusivamente com fertilizantes minerais (OLIVEIRA, 2002; DANTAS, 1995).

5.2.5 Avaliação de Produtividade de Soja em Campo Comercial

Dados de produtividade do plantio comercial de soja, com o fertilizante organomineral 4-14-8 produzido pelo processo físico-químico-mecânico de digestão e

peletização, em comparação com fertilizante mineral 4-14-8 adquirido comercialmente (testemunha) são apresentados na Figura 23. O rendimento médio da área cultivada com fertilizante organomineral foi de 22,58% superior do que a área testemunha. Informações adicionais, cedidas previamente pelo produtor revela que nos dois primeiros anos de plantio (2008/2009) anterior a instalação dos testes a produtividade por hectare, na mesma área, foi de 2650 kg/ha. Fazendo uma correlação entre os anos anteriores e o último ano de testes (2011/2012) observamos que, a produtividade na área testemunha, com fertilizante mineral aumentou em 22,22%, já na área com o tratamento organomineral o crescimento foi de 51,69%.

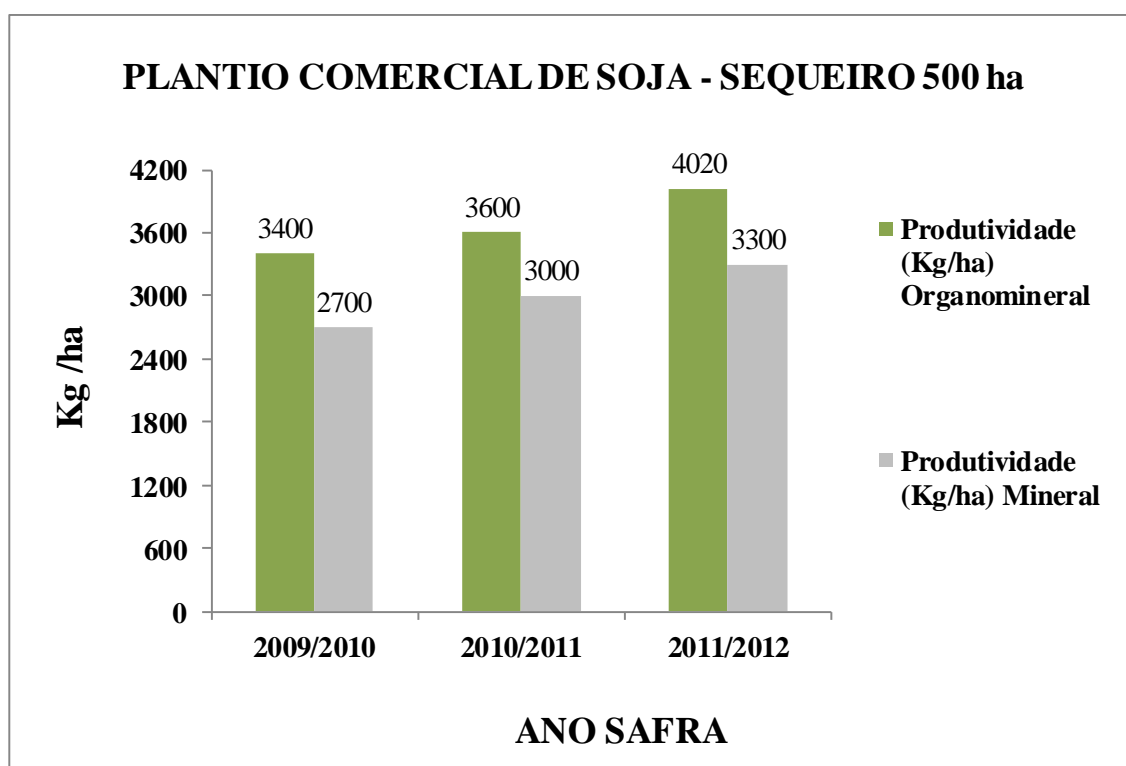


Figura 23. Plantio comercial de soja realizado na região de Buritis – MG, nos anos safra de 2009/2010, 2010/2011 e 2011/2012.

A diferença de produtividade, do tratamento organomineral, foi de 25,92%, 20% e 21,81%, em relação à testemunha (fertilizante mineral comercial) nos três anos de testes. Sinha e colaboradores (2010) discutem uma maior eficiência de fertilizantes produzidos a partir de compostos orgânico vermicompostado, em relação aos químicos ao longo dos anos. Os resultados de produtividade dos fertilizantes vermicompostados podem ser de 30 a 40% maiores em relação aos químicos, podendo ainda diminuir

custos e aumentar os níveis de nutrientes contidos nos alimentos SADHALE (1996). Em experimentos realizados a campo por Yamika e Ikawati (2012) na Indonésia, foram obtidos resultados de aumento de produtividade de soja de 26,4% quando utilizou-se fertilizante orgânico juntamente com o mineral.

Finalmente, estes resultados positivos observados nas avaliações em campo comercial, certificam que o adubo produzido pela tecnologia de digestão e peletização, foco deste trabalho, e anteriormente analisado em condições controladas, segue os padrões estabelecidos para a nutrição vegetal, em conformidade com as boas práticas agrícolas. Portanto, para a implantação deste modelo de tecnologia em diferentes regiões brasileiras foram desenvolvidas análises de viabilidade financeira do projeto (Processo físico-químico-mecânico de digestão e peletização de cama de aviário), no formato de Plano de Negócios, oportunamente apresentado e premiado junto a Federação das Indústrias do Estado do Paraná – FIEP (anexo II). O mesmo foi considerado potencialmente inovador e atendendo a diferentes estratégias do país, no que diz respeito à legislação de resíduos sólidos, e desenvolvimento de tecnologias que sejam ambiental e socialmente corretas.

6. CONCLUSÃO

O processo físico-químico-mecânico de digestão e de peletização converge soluções para a atual legislação de resíduos sólidos, e impulsiona o agronegócio em direção a Economia Verde. Diferentemente dos desafios, encontrados pelos processos de compostagem tradicionais, a tecnologia aqui abordada é um processo industrial, que pode ser automatizado e apresenta eficiência na transformação de resíduos agroindustriais, especificamente cama de aviário em fertilizantes orgânicos e organominerais peletizados.

Com o tratamento, de 10 milhões de toneladas de resíduos agroindustriais, especificamente cama de aviário, através desta tecnologia é possível a produção de aproximadamente 17 milhões de toneladas de fertilizantes organominerais peletizados, além de contribuir para a redução da dependência, do país, em relação à importação de minerais, emissões de gases causadores do efeito estufa e com o aumento da produtividade dos sistemas agropecuários.

Destaca-se que, a implantação do referido processo de digestão e peletização, em regiões relevantes ao agronegócio é estratégica para o Brasil, haja vista a necessidade de equilíbrio entre o crescente aumento na demanda por alimentos e fertilizantes, e a sustentabilidade dos sistemas biotróficos. Ademais, a viabilidade deste novo modelo de tratamento de resíduos orgânicos apresentou-se economicamente sustentável, como referido pelos consultores em gestão de negócios da Federação das Indústrias do Estado do Paraná – FIEP no ano de 2011.

Diante dos resultados obtidos em campo comercial com as culturas de milho (+33%), feijão (+9%) e soja (+22%) e das características do processo aqui apresentado, como o tempo de 1,5 h para digestão e peletização, conclui-se que o mesmo é eficiente no tratamento de resíduos agroindustriais, especificamente cama de aviário e na produção de composto orgânico e de fertilizantes organominerais em escala industrial e automatizada, desde que todas as etapas do processo sejam devidamente acompanhadas, analisadas e padronizadas.

Os níveis dos elementos N (1,9-3,4%), P (2,1-4,2%), K (1,9-3,6%) e C (34,7-49,3%) encontrados no composto orgânico e N (4,1-4,6%), P (13,8-15,7%), K (7,9-9,5%) e C (31,9-46,1%) encontrados no fertilizante organomineral 4-14-8, foram

satisfatórios, bem como, os testes agrônômicos indicaram um produto acabado de qualidade, quando comparado com produtos similares comerciais. Todas as formulações desenvolvidas foram registradas junto ao MAPA e estão disponíveis para a comercialização.

Finalmente, ao se utilizar o composto orgânico para a produção de fertilizante é gerada uma economia na quantidade de matéria-prima mineral necessária para se formular o fertilizante. Por exemplo, no caso do organomineral 4-14-8 economizou-se pelo menos 50% de N, 12,5% de P e 25% de K, desta forma contribuindo consideravelmente com a sustentabilidade dos sistemas agropecuários.



“Opções existem, basta escolhermos a melhor estratégia.”

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARON, S. Some statistics on limited natural resources. 2005. Disponível em: <<http://scotaaron.com/resources2.html>> Acesso em: 08/02/2014.
- ABISOLO. Plano Nacional de Biomassa. 44ª Reunião da Câmara Temática de Insumos Agropecuários – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Palestra técnica, Brasília-DF, 16 novembro, 2009.
- ALBERTA. Manure composting manual. Canada. 27 p. 2005.
- ANDA. Anuário estatístico do setor de fertilizantes. (CD-ROM). 2009.
- ANGUS, J.F. Modeling N fertilization requirements for crops and pasture. In: BACON, P.E. (Ed.) Nitrogen fertilization in the environment. New York: Marcel Dekker, p.109- 127. 1995.
- BARBOZA, B. B.; CUNHA, G. O. M.; INKOTTE, J; CAMPOS, D. V. B.; SANTOS, H. J. Determinação da Capacidade de Troca de Cátions, pH e Matéria Orgânica de Fertilizantes Organominerais Produzidos na Embrapa Solos. IX Reunião sul-brasileira de ciência do solo. Lages-SC, 08 a 09 de Novembro de 2012.
- BENITES, V.M.; CORREA, J.C.; MENEZES, J.F.S.; POLIDORO, J.C. Produção de fertilizante organomineral granulado a partir de dejetos de suínos e aves no Brasil. XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade de Solo e Nutrição de Planta. FERTBIO, Guarapari – ES. 2010.
- BENNETT, E. Slow-release fertilizers. Virginia Gardener Newsletter, Blacksburg, v 11. n 4. 1996.
- BIDDLESTONE, A. J.; GRAY, K. R. Introduction do compost – principles. In: Waste Not Want Not Conference, p. 1-9. 1991.
- BRASIL. *Instrução Normativa nº 28 de julho de 2007*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais,

Orgânicos, Organominerais e Corretivos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 de julho de 2007, Seção 1, p.11. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa, nº 25 de Julho de 2009. Ministério da Agricultura, 77 Pecuária e Abastecimento. Official Gazette, Brasília, DF, July, 28, 2009, Section 1, p. 20. 2009.

BUENO, P.; TAPIAS, R.; LÓPEZ, F.; DÍAS, M. J. Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. *Bioresource Technology*, 99. p. 5069–5077. 2008.

BUMB, B.L. World nitrogen supply and demand: an overview. In: BACON, P.E. (Ed.) *Nitrogen fertilization in the environment*. New York: Marcel Dekker, p. 1-40. 1995.

CANELLAS, L.P.; TEIXEIRA JUNIOR, L.R.L.; DOBBSS, L.B.; SILVA, C.A.; MÉDICI, L.O.; ZANDONADI, D.B.; FAÇANHA, A.R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.*, n 153. p. 157-166. 2008.

CAPORAL, F. R; COSTABEBER, J. A. Agroecologia e sustentabilidade. Base conceptual para uma nova extensão rural. Botucatu, SP. 22 p. 2001.

CARDOSO, E. L.; OLIVEIRA. H. Sugestões de uso e manejo dos solos do assentamento Taquaral. Corumbá - MS: Corumbá-MS. EMBRAPA PANTANAL, 4 p. (Circular Técnica, 35). 2002.

CARVALHO, M.G. Produção de feijão-fava em função de diferentes doses de adubação orgânica e mineral. Dissertação apresentado ao Programa de Agronomia /Universidade Federal do Piauí. 60f. 2012.

CIANCIO, N. H. R. Produção de grãos, matéria seca e acúmulo de nutrientes em culturas submetidas à adubação orgânica e mineral. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo – Universidade Federal de Santa Maria. 83f. 2010.

CORRENTE, J.E.; NOGUEIRA, M.C.S.; COSTA, B.M. Contrastes Ortogonais na Análise do Controle de Volatilização de Amônia em Compostagem. *Scientia Agricola*, v 58. n 2. p. 407-412. 2001.

DEEKS, L. K.; CHANEY, K.; MURRAY, C.; SAKRABANI, R.; GEDARA, S.; LE, M. S.; TYRREL, S.; PAWLETT, M.; READ, R.; SMITH, G. A new sludge-derived organo-mineral fertilizer gives similar crop yields as conventional fertilizers. *Agron. Sustain. Dev.* v 33. p. 539–549. 2013.

- D'ALMEIDA, M. L. O.; VILHENA, A. Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado. São Paulo: IPT/CEMPRE, 2 ed., 370 p. 2000.
- EFTHIMIADOU, A.; BILALIS, D.; KARKANIS, A.; FROUD-WILLIAMS, B. Combined organic/inorganic fertilization enhance soil quality and increased yield, photosynthesis and sustainability of sweet maize crop. Australian Journal of Crop Science. v 4. n 9. p. 722-729. 2010.
- EGODAWATTA, W. C. P.; STAMP, P.; SANGAKKARA, U. R. Yield Responses of Maize to Organic and Mineral Fertilizers at Different Inclinations in Tropical Smallholder Farming Systems. Journal of Agricultural Science, v 5. n 8. 2013.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível no site. <http://www.fao.org/corp/statistics/en/>. Acessado em 20 de janeiro de 2012.
- FONTANA, A.; PEREIRA, M.G.; NASCIMENTO, G.B.; ANJOS, L.H.C.; EBELING, A.G. Matéria orgânica em solos de tabuleiros na Região Norte Fluminense-RJ. Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v 8. n 1. p. 114-119. 2001.
- GADIOLI, J.L; NETO, P.F. Rendimento de milho e de feijão preto cultivado em solo acrescido de lodo de esgoto. Sanare. Revista Técnica da Sanepar. v 21. n.21, p.53-58. 2004.
- GRANLI, T.; BOCKMAN, O.C. Nitrogen oxide from agriculture. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, v 12. p. 7-127. 1994.
- HELYAR, K.R.; POTER, W.M. Soil acidification, its measurement and the processes involved. In: ROBSON, A.D. (Ed.) Soil acidity and plant growth. Sydney: Academic Press, p. 61-100. 1989.
- HENRIQUE, A. Segunda mesa redonda da sociedade civil EU-Brasil. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cdes.gov.br%2Fdocumento%2F2100696%2Fapresentacao-conselheiro-artur-henrique-cdes-25012010-.html&ei=ovJZUMGDM-iP0QHj1IGgBA&usq=AFQjCNGaDN9XskTOz1SHgBnbOM7Jw2ge0A&sig2=wSk4X1uJaexve4XIYgN2SA>. Acessado em 19 de setembro de 2012.

- HERRING, J.R.; FANTEL, R.J. Phosphate rock demand into the next century: Impact on world food supply. *Nonrenewable Resources*, v 2. n 3. p. 226-246. 1993.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for extracting nematodes from soil. *Plant Disease Report*, p. 648-692. 1964.
- KHALAF, H. A.; KOO, R. C. J. The use of controlled release nitrogen on container grown citrus seedlings. *Citrus & Vegetable Magazine*, Tampa, v 46. n 9. p. 10. 1983.
- KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MILLS, J.A.N. et al. A dynamic model of N metabolism in the lactating cow and an assessment of impact on N excretion on the environment. *Journal of Animal Science*, v 80. p. 248-259. 2002.
- KELLEHER, B. P.; LEAHY, J. J.; HENIHAN, A. M.; O'DWYER, T. F.; SUTTON, D.; LEAHY M. J. Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresource Technology*, n 83, Elsevier. p. 27-36. 2002.
- KIEHL, J. C. Distribuição e retenção da amônia no solo após aplicação de uréia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v 13. p. 75-80. 1989.
- KIEHL, E. J. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. 171 p. Piracicaba/SP. 1998.
- KIEHL, E. J. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. Piracicaba. 4^a ed. 173 p. 2004.
- KOMILIS, D.P.; HAM, R.K. A Laboratory Method to Investigate Gaseous Emissions and Solids Decomposition During Composting of Municipal Solid Wastes. *Compost Science & Utilization*. v 8. n 3. p. 254-265. 2000.
- LANA, R.P. Uso racional de recursos naturais não-renováveis: aspectos biológicos, econômicos e ambientais, *R. Bras. Zootec.*, v 38. p. 330-340. 2009.
- LAPIDO-LOUREIRO, F.E.V.; MELAMED, R.; NETO, J.F. Fertilizantes: agroindústria e sustentabilidade. Rio de Janeiro, CETEM/MCT. 645 p. 2009.

- LEITE, L. F. C. et al. Estoques totais de carbono orgânico e seus compartimentos em Argissolo sob floresta e sob milho cultivado com adubação mineral e orgânica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 821–832, 2003.
- LEMKE, R.L.; IZAURRALDE, R.C.; MALLEI, S.S. *et al.* Nitrous oxide emissions from agricultural soils of the Boreal and Parkland regions of Alberta. *Soil Science Society of America Journal*, v 62. p. 1096-1102. 1998.
- LOPES, M.A.; NASS, L.L.; MELO, I.S. Bioprospecção. In: BOREM, A. *Biotecnologia e meio ambiente*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2008.
- MALAVOLTA, E. Manual de calagem e adubação das principais culturas. São Paulo: Ceres, 496 p. 1987.
- MALAVOLTA, E. *et al.* Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional. In: *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, p. 115-230. 1997.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. 638 p. 2006.
- MATOS, M.A.; PEREIRA, F.J.M.A. Tratamento e Gestão de Resíduos Sólidos. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Universidade de Aveiro. v 10. 2004.
- MARSCHNER, H. Mineral of higher plants. 2ª Edição. San Diego: Academic Press, 889 p. 1995.
- MCESAPL - Manual de Compostagem da Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. Escola Superior Agrária. Instituto Superior de Viana do Castelo. URL:http://www.ci.esapl.pt/mbrito/compostagem/Manual_de_compostagem%20capa.htm. Acessado em 10 de fevereiro 2014.
- MEADOWS, D.H.; MEADOWS, D.L.; RANDERS, J. et al. The limits of growth. A report for the Club of Rome's project on the predicament of mankind. New York: Universe Books, 205 p. 1972.

- MERCEDES, S. S.; PEREIRA NETO, J. T. O efeito da temperatura na eliminação de patógenos durante a fase ativa da compostagem de lixo urbano. Anais do 17º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES. Natal – RN. 1993.
- MOTTA, A. C. V.; SERRAT, B. M.; REISSMANN, C. B.; DIONÍSIO, J. A. Micronutrientes da rocha, no solo e na planta: elementos essenciais. Curitiba, PR, Brasil, Edição do autor. 2007.
- MULLINS, G. L.; BURMESTER, C. H. Dry matter, nitrogen, phosphorus and potassium accumulation by four cotton varieties. *Agronomy Journal*. Madison. v 82. p. 729–736. 1990.
- MUTEGI, E. M.; KUNG’U, J. B.; MUCHERU-MUNA; PIETER, P.; MUGENDI, D. N. Complementary effects of organic and mineral fertilizers on maize production in the smallholder farms of Meru South District, Kenya. v 3. n 2. p. 221-229. 2012.
- NAKAYAMA, F. T.; PINHEIRO, G. A. S.; ZERBINI, E. F. Eficiência do fertilizante organomineral na produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) em sistema de semeadura direta. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v 9. n 7. p. 122-138. 2013.
- OGUNWANDE, G. A.; OSUNADE, J. A.; ADEKALU, K. O.; OGUNJIMI, L.A. O. Nitrogen loss in chicken litter compost as affected by carbon to nitrogen ratio and turning frequency. *Bioresource Technology*, n 99. p. 7495–7503. 2008.
- OLIVEIRA, A. M. G.; DANTAS, J. L. L. Composto Orgânico. Cruz das Almas, BA: Embrapa - CNPMF, 1995. 12 p.
- OLIVEIRA NETO, A. A. Os problemas na agricultura e a metamorfose na política agrícola. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, Ano 19, n 3. p. 33- 38. 2008.
- ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JÚNIOR, J. Compostagem da fração sólida da água residuária de suinocultura. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v 29. n 3. p. 483-491. 2009.
- ORRICO JÚNIOR, M.A.P.; ORRICO, A.A.; JÚNIOR, J.L. COMPOSTAGEM DOS RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v 30. n 3. p. 538-545. 2010.

- PAILLAT, J.M.; ROBIN, P.; HASSOUNA, M.; LETERME, P. Predicting ammonia and carbon dioxide emissions from carbon and nitrogen biodegradability during animal waste composting”, *Atmospheric Environment*. v 39. p. 6833 - 6842. 2005.
- PEREIRA NETO, J. T. Compostagem: fundamentos e métodos. 1º Simpósio sobre compostagem: Ciência e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista, 18 a 19 de Agosto de 2004.
- PEREIRA NETO, J. T. Manual de compostagem, processo de baixo custo. Edição revisada e ampliada. Ed. UFV, Viçosa, MG. 2007.
- PIMENTEL-GOMES, F. Estatística experimental. ESALQ, Piracicaba, SP. 14ª Edição, 477 p. 2000.
- PROSAB. PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO. Manual prático para a compostagem de biossólidos. Universidade Estadual de Londrina – UEL. 1999.
- RAIJ, B. V. Fertilidade do Solo e Adubação. Piracicaba: Ceres - Potafós, 1991. 343 p.
- RICCI, M. S. F. Cultivo de Café Orgânico – Adubação. Embrapa Agrobiologia, Sistemas de Produção,
URL:<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/sistemasdeproducao/cafe/adubacao.htm#biofertilizantes>. Acessado 14 de janeiro de 2009.
- ROBERTS, T.L.; STEWART, W.M. Inorganic phosphorus and potassium production and reserves. *Better Crops*, v 86. n 2. p. 6-7. 2002.
- RODRIGUES, E. T. Resposta de cultivares de alface ao composto orgânico. *Horticultura Brasileira*. Brasília, v. 12, n.2, p. 260-262, 1994.
- RODRÍGUEZ LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; STURM, W.; LETTI, L. A. J.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, D. E. Solid-state fermentation. In PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; Dussap, C. G. *Advances in Fermentation Technology*, Asiantech Publishers, New Delhi, p. 539-555. 2008.

- ROMEIRO, A.R. Meio ambiente e dinâmica de inovações na agricultura. São Paulo: Annablume: FAPESP. 1998.
- ROUSSEFF, Dilma. Compromisso com o futuro. O Estado de S. Paulo, São Paulo, 13 dez. 2009. Caderno Aliás. Disponível em: <http://www.casacivil.planalto.gov.br/2009/12/artigo-compromisso-com-o-futuro/>. Acessado em 19 de setembro de 2012.
- SANCHES, A. P. C. Aplicação do processo de compostagem na estabilização de resíduo de aviário. Universidade de Aveiro. Departamento de Ambiente e Ordenamento. 2007.
- SANCHUKI, C. E.; SOCCOL, C. R.; CARVALHO, J. C. C.; SOCCOL, V. T.; NASCIMENTO, C.; WOICIECHOWSKI, A. L. Evaluation of Poultry Litter Traditional Composting Process, v 54. n 5. p. 1053-1058. 2011a.
- SANCHUKI, C. E. Estudo da compostagem acelerada de cama de frango. Dissertação de mestrado. PPGEBB - UFPR. Curitiba. 2011b.
- SANTILLI, Juliana. Agrobiodiversidade e direitos dos agricultores. São Paulo: Peirópolis, 2009.
- SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais. Porto Alegre, Genesis. 508 p. 1999.
- SANTOS, Milton. Por uma globalização: do pensamento único à consciência universal. 13. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2006.
- SBCS. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo 10ª ed., Porto Alegre, 400 p. 2004.
- SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P.; RADMANN, E. B. Doses de fertilizante de liberação lenta na formação do porta-enxerto 'trifoliata'. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v 26. n 3. p. 520-523. 2004.
- SEVERINO, L. S.; LIMA, R. L. S.; BELTRÃO, N. E. M. Composição química de onze materiais orgânicos utilizados em substratos para produção de mudas. Comunicado

técnico. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Campina Grande, PB. Agosto de 2006.

SADHALE, N. Recommendation to incorporate earthworms in soil of pomograte to obtain high quality fruits. Surpala's Vrikshayurveda, Verse 131. The Science or Plant Life by Surpala, 10th Century A.D. Asian Agri-History Bulletin, Secunderabad. 1996.

SHAVIV, A. Advances in controlled-release fertilizers. Advances in Agronomy, San Diego, v 71. p. 1-49. 2001.

SHIGAKI, F.; SHARPLEY, A.; PROCHNOW, L.I. Animal-based agriculture, phosphorus management and water quality in Brazil: Options for the future. Scientia Agricola, v 63. n 2. p. 194-209. 2006.

SILVA, F. C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa, 1999.

SILVA, A.C.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; DOBBSS, L.B.; AGUIAR, N.O.; FRADE, D.A.R.; REZENDE, C.E.; PERES, L.E.P. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. R. Bras. Ci. Solo, n 35. p. 1609-1617. 2011.

SINHA, R. K. Earthworms Vermicompost: A Powerful Crop Nutrient over the Conventional Compost & Protective Soil Conditioner against the Destructive Chemical Fertilizers for Food Safety and Security. Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci., v 5 (S). p 01- 55. 2009.

SINHA, R. K.; AGARWAL, S.; CHAUHAN, K.; VALANI, D. Tthe Wonders of earthworms & its vermicompost in farm production: Charles darwin's 'friends of farmers', with potential to replace destuctive chemical fertilizers from agriculture. Agriculture Sciences, v 1. n 2. p. 76-94. 2010.

SINHA R. K.; HERAT, S. Organic farming: producing chemical-free, nutritive and protective food for the society while also protecting the farm soil by earthworms and vermicompost – reviving the dreams of sir Charles Darwin. Agricultural Science Research Journals. v 2. n 5. p. 217-239. 2012.

SPSS (VERSION 10.0) CHICAGO SPSS INC.

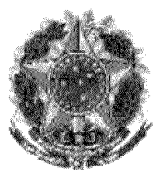
- STRONG, W.M. Nitrogen fertilization of upland crops. In: BACON, P.E. (Ed.) Nitrogen fertilization in the environment. New York: Marcel Dekker, p. 129-169. 1995.
- TEIXEIRA, L.B.; OLIVEIRA, R.F.; JÚNIOR, J.F. Características Químicas de Composto Orgânico Produzido com Lixo Orgânico, Caroço de Açaí, Capim e serragem. Comunicado Técnico 105, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, PA, URL: <http://www.cpatu.embrapa.br/online/comunicado/com.tec.105.pdf>. 2004
- YAMIKA, W. S. D.; IKAWATI, K. R. Combination Inorganic And Organic Fertilizer increased Yield Production Of Soybean In Rain-Field Malang, Indonesia. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. v 6. n 1. p. 14-17. 2012.
- ZHU, S.; LEE, S.W.; Co-combustion performance of poultry wastes and natural gas in the advanced Swirling Fluidized Bed Combustor. Waste Management, v 25, Elsevier. p. 511-518. 2005.

8. ANEXOS

ANEXO – I

PATENTES PUBLICADAS:

1. PROCESSO DE DIGESTÃO E PELETIZAÇÃO DE CAMA DE FRANCO PARA A PRODUÇÃO DE FERTILIZANTE(S) ORGÂNICOS E/OU ORGANOMINERAIS.
2. PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S) ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO CO-PRODUTO(S) DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE PREGEL E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATERIAS PRIMAS ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET.
3. PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS.
4. PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA A OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCOÓLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE CACHAÇA.
5. PROCESSO DE USO DO COMPOSTADOR E/OU REVOLVEDOR AUTOPROPELIDO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS URBANO, AGROINDUSTRIAL, AGROPECUÁRIO E/OU LODO DE ESGOTO NA PRODUÇÃO DE FERTILIZANTES, ADUBOS E/OU COMPOSTOS ORGÂNICO (**em sigilo**).



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0910087-3 A2**



(22) Data de Depósito: 11/12/2009
(43) Data da Publicação: 17/01/2012
(RPI 2141)

(51) *Int.Cl.:*
C05F 15/00

(54) Título: PROCESSO INDUSTRIAL DE COMPOSTAGEM FÍSICO-QUÍMICA-MECÂNICA E PELETIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE, FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E/OU FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO A PARTIR DE CO-PRODUTOS OU RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E/OU AGROINDUSTRIAIS

(73) Titular(es): Sebastião Gomes da Silva

(72) Inventor(es): Brenner Magnabosco Marra, Cezar Silva Fonseca, Gustavo Ramos de Oliveira, Maria Fátima Rossi de Sá, Sebastião Gomes da Silva, Valter Rücker

(57) Resumo: PROCESSO INDUSTRIAL DE COMPOSTAGEM FÍSICO-QUÍMICA MECÂNICA E PELETIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE, FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E/OU FERTILIZANTE ORGANICO COMPOSTO A PARTIR DE CO-PRODUTOS OU RESÍDUOS AGROPECUARIOS E/OU AGROINDUSTRIAIS. A presente patente de invenção refere-se a um inédito processo industrial de compostagem físico-química-mecânica caracterizado pelo fato de existir no processo a inédita conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos em substituição a compostagem biológica tradicional/convencional utilizada na obtenção de biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto fabricados e formulados a partir de resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários. Tal processo consiste na utilização de um cozinhador/autoclave com diferentes estágios/camadas de aquecimento dos co-produtos ou resíduos agroindustriais e/ou agropecuários; seguido de extrusora com bico injetor com sistema automático convencional de injeção de borra de óleo vegetal e/ou animal, especialmente a borra de óleo de algodão ou soja; seguido de um novo comportamento de peletização pela substituição da adição de vapor d'água na peletizadora pela borra de óleo de algodão e/ou soja adicionada e mencionada na etapa anterior.

**PI0910087--3**

"PROCESSO INDUSTRIAL DE COMPOSTAGEM FÍSICO-QUÍMICA-MECÂNICA E PELETIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE, FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E/OU FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO A PARTIR DE CO-PRODUTOS OU RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E/OU
5 **AGROINDUSTRIAIS"**

A presente patente de invenção refere-se a um novo processo industrial de compostagem físico-química-mecânica caracterizado pelo fato de existir no processo a inédita
10 conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos em substituição a compostagem biológica tradicional/convencional utilizada na obtenção de biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto, fabricados e formulados a partir de
15 resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários e/ou lixo orgânico urbano. Tal processo consiste na utilização de um cozinhador/autoclave com diferentes estágios/camadas de aquecimento dos co-produtos ou resíduos agroindustriais e/ou agropecuários; seguido de extrusora com bico injetor com
20 sistema automático convencional de injeção de borra de óleo vegetal e/ou animal, especialmente a borra de óleo de algodão ou soja; e novo comportamento de peletização pela substituição da adição de vapor d'água na peletizadora pela borra de óleo de algodão e/ou soja adicionada e mencionada na etapa
25 anterior.

O aumento da população humana e a demanda por melhoria da qualidade de vida têm pressionado a produção crescente de alimentos e de fontes alternativas de energia de origem vegetal, animal e/ou industrial em substituição ao petróleo. A
30 baixa eficiência no uso dos recursos limitantes (inclui água, fertilizante e petróleo) está levando à excessiva utilização dos recursos naturais não renováveis e a poluição ambiental. Por exemplo: as reservas de fosfato no mundo que podem ser

exploradas a baixo custo são suficientes para mais 40-100 anos apenas. A situação dos micronutrientes é pior, podem chegar ao no máximo 60 anos de reserva e exploração. Além disso, o uso indiscriminado de fertilizantes minerais tem diminuído a
5 fertilidade dos solos e conseqüentemente a não reposição da matéria orgânica. Além disso, estes fertilizantes minerais possuem custo elevado, são importados e vem poluindo as bacias hidrográficas, rios e lagos. A utilização exclusiva de fertilizante minerais em alguns países tem demonstrado redução
10 crescente e significativa na produção e qualidade de alimentos. Além disso, existe um movimento mundial pro-orgânicos, ou seja, estímulo aos produtos orgânicos certificados, onde não se utiliza fertilizantes minerais e se preconiza alternativas na nutrição vegetal com apelo sócio-
15 ambiental. Dessa forma, existe uma necessidade de desenvolvimento de estratégias de fertilização orgânica e, sobretudo alternativas de compostagem de resíduos agropecuários, agroindustriais e lixo orgânico urbano. Existem alguns obstáculos a utilização de resíduos orgânicos na
20 fertilização, tais como: produção baixa pela baixa concentração de nitrogênio, fósforo e potássio; utilização de grande quantidade de mão-de-obra e, sobretudo um grande tempo de compostagem da matéria orgânica. Dessa forma, o desenvolvimento de um processo industrial automatizado de
25 compostagem física-química-mecânica é uma inovação tecnológica que resolve estes obstáculos.

Tradicionalmente, a compostagem convencional/tradicional é uma processo artesanal de processamento de resíduos orgânicos, deixando-os depositados sobre solo e dispostos em forma de
30 leiras ou montes, sendo necessário aguardar durante meses para se obter esta compostagem. Eventualmente, estas leiras são revolvidas para obter uniformidade de temperatura e do processo biológico, e ainda podendo ser adicionado alguns

microrganismos e/ou enzimas que hidrolisam as fibras dos resíduos e são denominados comercialmente como biocatalisadores. Essa prática usual e precária, utilizada no mundo inteiro e que necessita de mais de 120 dias, não oferece 5 condições necessárias para a produção industrial em larga escala dos biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto em questão. Além disso, este único sistema convencional/tradicional de compostagem resulta no aparecimento de focos de moscas, insetos, roedores, odores 10 desagradáveis e sobretudo, liberação de metano na atmosfera, um dos principais gases responsáveis pelo efeito estufa. Portanto, é consenso também que os resíduos ou co-produtos e/ou subprodutos agropecuários e/ou agroindustriais devam ser reutilizados de forma correta na produção de outras demandas, 15 com o menor impacto ambiental e para maximizar as reservas de minerais ainda existentes. Neste caso, a utilização de resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustriais e/ou lixo orgânico urbano na produção industrial de biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante 20 orgânico composto em larga escala é uma alternativa com excelentes justificativas sócio-ambientais.

Em contrapartida, o objeto desta patente é um sistema industrial que permitirá a compostagem físico-química-mecânica, a produção de biofertilizantes, fertilizante 25 organomineral e/ou fertilizante orgânico composto em larga escala e com a utilização de matérias-primas que no seu estado natural se constituem em produtos residuais altamente poluentes, tais como: cama de frango, adubo de galinha poedeira, palha de arroz (sílica orgânica), lodo de esgoto 30 urbano, lixo orgânico urbano, excrementos de animais, resíduos orgânicos em geral. Estes produtos, ao serem utilizados no novo processo industrial, além de deixarem de ser elementos poluidores, se transformarão em biofertilizantes, fertilizante

organomineral e/ou fertilizante orgânico composto de alta qualidade, não poluidores e permitindo produção de alimentos a menor custo. Estes biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto obtidos
5 aumentam a fertilidade e repõem as características físico-química do solo, que são perdidas pelo uso contínuo de fertilizantes minerais.

O presente pedido de patente se constitui na inédita conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a
10 obtenção de resultados novos. O primeiro principal resultado novo é o inédito sistema industrial de compostagem físico-química-mecânica dos resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustrial e/ou lixo orgânico urbano que permitirá a produção em larga escala de produtos de grande valor agregado
15 a partir de matéria-prima de baixo valor comercial num curto espaço de tempo de compostagem, conforme já mencionado.

Essa compostagem, na sua fase mais importante consiste na utilização pela primeira vez de uma autoclave ou cozinhador que funciona sem que o vapor de água entre em contato com os
20 resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustrial e/ou lixo orgânico urbano. Este equipamento já existe, e tem a denominação de cozinhador de oleaginosas, sendo utilizado atualmente em indústrias de extração de óleos vegetais. Esta autoclave/cozinhador possui vários estágios com câmaras de
25 aquecimento progressivo e seqüencial. O cozimento dos resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustrial e/ou lixo orgânico urbano é feito em um curto período de trabalho, com aplicação progressiva, seqüencial e controlada de calor nas várias câmaras ou estágios. O inédito resultado é a
30 compostagem perfeita conforme as análises físico-química e rigorosamente iguais a compostagem tradicional/usual; sendo que, esta nova conjugação de equipamentos para obtenção de novos resultados permitem a perfeita eliminação dos patógenos,

de substâncias nocivas, sementes e ervas daninhas, bem como os odores desagradáveis da compostagem convencional/tradicional.

A matéria prima, antes e depois do cozimento deve sofrer operações de beneficiamento para colocá-la em condições de ser cozida. Em primeiro lugar, deve haver uma moega (n°1) para ser carregada com o produto (resíduos ou co-produtos agroindustrial e /ou agropecuários) que, a seguir passa por um moinho (n°2), depois por uma peneira (n°3) para selecionar a granulometria necessária para seu cozimento na autoclave ou cozinhador de oleoginosas tradicional (n°4).

Após o cozimento, o produto será encaminhado para uma extrusora (n°7), onde o biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto irá receber de forma inédita um novo componente, que é a borra de óleo de algodão ou borra de óleo de soja ou outro ácido graxo orgânico. Esta é a segunda maior novidade do processo, porque a borra de algodão ou a borra de óleo de soja ou o graxo orgânico permitem a aglutinação e a lubrificação do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto formando uma nova massa homogênea, rica em ácidos graxos. A borra de óleo de algodão ou do óleo de soja ou outro ácido graxo orgânico é previamente aquecido e injetado ineditamente na extrusora (n°7) através de um bico injetor (n°6) e de um sistema automático convencional de injeção (n°5).

O biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto sai da extrusora (n°7) em forma de grânulos de formatos e dimensões diversas. Esse biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto pode ser aplicado ao solo no estado em que se encontra, pronto para utilização. Ou, a seguir o produto poderá de acordo com as necessidades, passar por um moinho (n°8) que irá transformá-lo em pó, depois por uma peneira

(n°9), podendo ser aplicado também no estado em que se encontra. Dependendo do modo de se utilizar o biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto, ele poderá ou não ser encaminhado para uma peletizadora (n°12) que determinará o tamanho necessário dos grânulos, de acordo com o sistema e necessidade da respectiva aplicação no solo.

O fato de se utilizar no fertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto a borra do óleo de algodão ou do óleo de soja ou outro ácido graxo orgânico introduz a terceira novidade, que é o novo comportamento de peletização na peletizadora (n°12). Neste caso, o uso da borra de algodão e/ou soja dispensa o uso do vapor de água direto, que é absolutamente necessário para o funcionamento das peletizadoras usuais tradicionais.

Há casos em que uma determinada cultura agrônômica exija algum elemento mineral adicional, que não exista no biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto. Neste caso, estes podem ser adicionados de acordo com a necessidade e estão acondicionados no depósito (n°13). A adição de um ou mais elementos minerais ao biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto será obtida com auxílio de um dosador mecânico tradicional (n°10) e um misturador mecânico tradicional (n°11). Na seqüência, este fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto é conduzido a uma peletizadora tradicional(n°12), que de forma inédita conjuga princípios e equipamentos conhecidos para obtenção de resultados novos, ou seja, utiliza a borra de óleo pré-aquecida para peletizar o fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto, em substituição ao vapor d'água tradicionalmente utilizado, conforme mencionado anteriormente.

A borra do óleo de algodão ou a borra do óleo de soja ou outro ácido graxo orgânico substituem totalmente com vantagem o vapor de água na peletizadora (n°12), porque os grânulos do biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto são lubrificados e expelidos com maior facilidade. Abaixo segue uma legenda de localização (Tabela I) da representação esquemática que é apresentada no final presente documento (Desenho I).

10 **Tabela I:** Legenda de localização na representação esquemática do processo.

<i>Localização</i>	<i>Descrição</i>
Número 1	Moega de entrada da matéria-prima ou resíduos
Número 2	Moinho
Número 3	Peneira
Número 4	Autoclave/Cozinhador
Número 5	Sistema automático de injeção de borra de óleo
Número 6	Bico injetor de borra de óleo
Número 7	Extrusora
Número 8	Moinho
Número 9	Peneira
Número 10	Silo dosador
Número 11	Misturador
Número 12	Peletizadora
Número 13	Depósito

A utilização da borra de óleo de algodão ou similar agregam componentes orgânicos importantes, melhorando a qualidade do produto e com motor de menor potência, além de diminuir o desgaste por atrito do equipamento e aumentando a conformidade aos grânulos peletizados.

As características e parâmetros físico-químicos do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante

orgânico composto obtido neste presente pedido de patente são os mesmos do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto obtido pela compostagem convencional/tradicional. A diferença é o processamento 5 industrial num curto intervalo de tempo.

Portanto, o presente pedido de patente relata a inédita conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos, ou seja, a compostagem físico-química-mecânica industrial e sua peletização num fluxo 10 industrial de curta duração conforme descrito acima em substituição a compostagem biológica tradicional/convencional/artesanal.

Descrição da Invenção

15 A presente invenção tecnológica consiste num processo inovador de compostagem físico-química-mecânica de resíduos agropecuários e agroindustriais, transformando-os em biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto e sua peletização/granulação através de um 20 processo industrial em fluxo contínuo de curta duração de tempo, e que pode ser automatizado.

Mais precisamente, a presente invenção ou novo processo industrial consiste no seguinte fluxo, que podem apresentar pequenas alterações na frequência do beneficiamento dos 25 resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários (duração aproximada de 2 horas): recepção em moega, moagem dos resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários, classificação em peneira e a seguir até a autoclave/cozinhador de oleaginosas, que vai promover o aquecimento/cozimento dos 30 resíduos ou co-produtos sem a adição de vapor d'água. A autoclave/cozinhador aquece de forma controlada diferentes camadas. Seguindo para a extrusora com injeção de borra de óleo animal e/ou vegetal, especialmente borra de óleo de

algodão ou soja através do bico injetor com sistema automático convencional de injeção, seguido pela moagem final e peneira para uniformização das partículas, podendo seguir ou não para a peletização/granulação, a injeção de borra de óleo animal e/ou vegetal, especialmente borra de óleo de algodão ou soja através do bico injetor permite com sucesso a peletização/granulação do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto em substituição do vapor d'água na tradicional peletizadora.

10 Dessa forma, obtém-se o biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto, compostado de forma físico-química-mecânica e peletizado pela adição da borra de óleo. Posteriormente, pode ser ensacado. Caso tenha que ser adicionado algum elemento mineral adicional este

15 misturado previamente, igualmente pode ser peletizado/granulado com sucesso. Todo este processo está representado esquematicamente abaixo. E refere-se a resultados inéditos a partir de uma inovação da técnica de compostagem, ou seja, uma compostagem físico-química-mecânica inédita.

20 Após a exemplificação abaixo segue uma representação esquemática (formato funcional) do presente invento tecnológico (modelo não restritivo), ou seja, um processo de compostagem físico-química-mecânica do biofertilizante e sua peletização pela injeção de borra de óleo de algodão e/ou

25 similar.

Apenas a título de exemplificação e ilustração do pedido de patente; abaixo é descrito uma formulação/mistura de resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustriais que pode ser usada neste processo industrial, e suas análises

30 físico-químicas antes e após o processo de compostagem físico-química-mecânica. Vale salientar que misturas de resíduos diferentes fornecerão resultados físico-químicos distintos e que o objeto do pedido de patente é apenas a inédita

conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos em substituição a compostagem tradicional/convencional do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto.

5

Exemplo I

Tabela II: Exemplo de mistura de resíduos agroindustriais e/ou agropecuários que pode ser submetido ao novo processo industrial de compostagem físico-química-mecânica:

Resíduo agroindustrial	agropecuário e/ou	Quantidade
Bagaço de cana		200 kg
Esterco e camas de aviário		380 kg
Farelos e tortas de origem vegetal		300 kg
Borra de óleo de algodão		120 kg
Total		1000 kg

- fertilizantes minerais e corretivos de solo podem ser adicionados ou não na mistura a ser compostada e/ou peletizada.

15

Tabela III: Resultados da análise físico-química da mistura de resíduos agroindustriais/agropecuários antes da compostagem citado logo acima; do biofertilizante obtido a partir da compostagem físico-química-mecânica, com e sem a adição da borra de óleo de algodão utilizada na peletização.

Parâmetros físico-químicos	Mistura de resíduos agroindustriais e/ou agropecuários antes da biocompostagem	Compostagem físico-química-mecânica sem adição da borra de óleo de algodão	Compostagem físico-química-mecânica com adição da borra de óleo de algodão
Umidade a 65°C	8	6,9	6,6
Matéria Orgânica	35	50,8	52
Nitrogênio(%)	0,3	2,6	2,9
Fósforo(%)	0,2	2,5	2,2
Potássio(%)	0,2	2,6	2,8
Cálcio(%)	0,4	5,5	5,9
Magnésio(%)	0,2	1,2	1,3
Enxofre(%)	0,2	1,0	1,0

Boro (%)	0,1	0,4	0,5
Cobre (%)	0,05	0,1	0,1
Ferro (%)	0,05	0,1	0,1
Manganês (%)	0,2	0,5	0,7
Zinco (%)	0,5	1	1,1
Condutividade elétrica (dS/m)	9	2	2,4
Capacidade Troca Catiônica (mmol/kg)	45	440	450
Relação C.T.C/carbono orgânico	0,25	10	10
Relação Carbono/nitrogênio	32	10	10
Demanda Química de Oxigênio	1065	280	285

Obs: Parâmetros e níveis de uma boa compostagem definidos pela literatura científica são:

- Condutividade elétrica: menor que 4 dS/m
- Capacidade de Troca Catiônica: 350-800 mmol/kg
- 5 - Relação C.T.C / C. orgânico: maior que 1,7/1,0
- Relação C/N: 10/1
- Demanda Química de Oxigênio: 300 mg/g

Os parâmetros físico-químicos avaliados/comparados após
 10 este processo de compostagem físico-química-mecânica mencionado no presente invento são: relação carbono/nitrogênio, capacidade de troca catiônica, relação CTC/ carbono orgânico, demanda química de oxigênio, condutividade elétrica e disponibilidade de fósforo, potássio,
 15 nitrogênio, enxofre, cobre, cálcio, magnésio, manganês e outros macro- e micronutrientes (Tabela III).

Considerando-se que, tendo em vista as explanações do presente memorial, foram demonstradas as inovações tecnológicas, sendo por justiça, requeremos que o presente
 20 pedido de patente seja concedido.

REIVINDICAÇÕES

"PROCESSO INDUSTRIAL DE COMPOSTAGEM FÍSICO-QUÍMICA-MECÂNICA E PELETIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE, FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E/OU FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO A PARTIR DE CO-PRODUTOS OU RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E/OU AGROINDUSTRIAIS"

Caracterizado pelo fato de:

- 10 1 - Conforme representação esquemática apresentado no Relatório, existir no processo a inédita conjugação de princípios e equipamentos já conhecidos para obtenção de novos resultados e novos comportamentos de compostagem e peletização, ou seja, pela primeira vez a compostagem
- 15 físico-química-mecânica através utilização de uma autoclave/cozinhador de oleaginosas (nº4) que possui vários estágios com câmaras de aquecimento e pressão progressiva e seqüencial, sem o contato do vapor d'água com os resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários e/ou lixo
- 20 orgânico urbano para a compostagem/obtenção do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto. Seguido pelo uso inédito de uma extrusora (nº7), que possui um bico injetor (nº6) com sistema automático convencional de injeção (nº5) de borra
- 25 de óleo vegetal e/ou animal, especialmente a borra de óleo

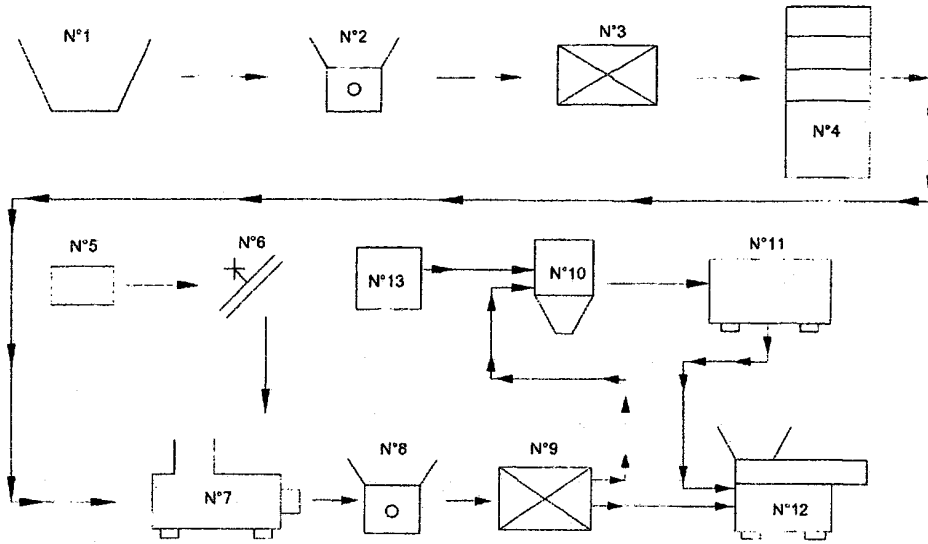
de algodão ou soja no biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto pré-aquecido/cozido com o uso da autoclave/cozinhador de oleaginosas (nº4) ou outro sistema tradicional de aquecimento. Seguido adicionalmente de um novo comportamento de peletização do biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto numa peletizadora convencional pela substituição da adição de vapor d'água pela borra de óleo de algodão e/ou soja adicionada e mencionada na etapa anterior.

2. "**PROCESSO**", de acordo com as reivindicações do item 1, caracterizado pelo fato de que haverá a compostagem físico-química-mecânica dos resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários e/ou lixo orgânico urbano pelo aquecimento e pressão progressiva e seqüencial (sucessivo e crescente) em diferentes fases e sob diferente pressão e temperatura, o que permite a compostagem físico-química-mecânica (hidrólise, acidogênese, acetanogênese e mineralização) dos resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários e/ou lixo orgânico urbano, com os mesmos resultados da compostagem físico-química tradicional. A injeção de borra de óleo de algodão, soja e/ou similar na extrusora permite um novo comportamento de peletização/granulação, dispensando vapor d'água na peletizadora convencional e resultando em biofertilizante,

fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico
composto.

DESENHOS

Desenho N° 1:

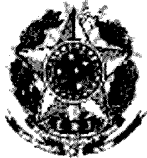


DESENHO N°1

RESUMO

"PROCESSO INDUSTRIAL DE COMPOSTAGEM FÍSICO-QUÍMICA-MECÂNICA E PELETIZAÇÃO NA FABRICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTE, FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E/OU FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO A PARTIR DE CO-PRODUTOS OU RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E/OU AGROINDUSTRIAIS"

A presente patente de invenção refere-se a um inédito processo industrial de compostagem físico-química-mecânica caracterizado pelo fato de existir no processo a inédita conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos em substituição a compostagem biológica tradicional/convencional utilizada na obtenção de biofertilizante, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico compostos fabricados e formulados a partir de resíduos ou co-produtos agroindustriais e/ou agropecuários. Tal processo consiste na utilização de um cozinhador/autoclave com diferentes estágios/camadas de aquecimento dos co-produtos ou resíduos agroindustriais e/ou agropecuários; seguido de extrusora com bico injetor com sistema automático convencional de injeção de borra de óleo vegetal e/ou animal, especialmente a borra de óleo de algodão ou soja; seguido de um novo comportamento de peletização pela substituição da adição de vapor d'água na peletizadora pela borra de óleo de algodão e/ou soja adicionada e mencionada na etapa anterior.



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 10 2013 008138-8 A2

(22) Data de Depósito: 04/04/2013
(43) Data da Publicação: 30/07/2013
(RPI 2221)



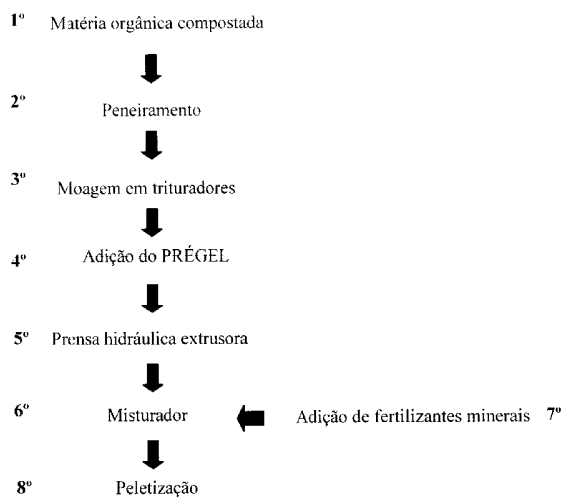
(51) Int.Cl.:
C05F 17/00
C05F 5/00

(54) Título: PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTES (S) ORGANOMINERAL (IS) E ORGÂNICO (S) UTILIZANDO CO-PRODUTO (S) DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE PRÉGEL E/OU BORRA (S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE E/OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET

(73) Titular(es): Universidade Federal do Paraná

(72) Inventor(es): Brener Magnabosco Marra, Dile Pontarolo Stremel, Gustavo Ramos de Oliveira, Leandro Belermino, Luis Fernando Souza Gomes

(57) Resumo: PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTES (S) ORGANOMINERAL (IS) E ORGÂNICO (S) UTILIZANDO CO-PRODUTO (S) DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE PRÉGEL E/OU BORRA (S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE E/OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET. A presente patente, natureza privilégio de invenção, refere-se a um processo industrial de peletização de fertilizante (s) organomineral (is) e orgânico (s) utilizando co-produto (s) de amidolarias de milho e mandioca, especialmente borra (s) e/ou prégel e/ou lodo (s), como agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias primas orgânicas e minerais; objetivando a produção de fertilizantes organominerais e orgânico (s) peletizados, diferentemente dos fertilizante granulados, e ainda, o melhor aproveitamento do (s) co-produto (s) ou resíduo (s) do (s) sistema (s) de produção agroindustrial e agropecuária. Sendo este processo aplicado ao setor tecnológico do agronegócio, especialmente a produção de fertilizantes organominerais orgânico (s) peletizados.



"PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S) ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO CO-PRODUTO(S) DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE PRÉGEL E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE E/OU
5 AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET".

CAMPO DA INVENÇÃO

10

A presente patente, natureza privilégio de invenção, refere-se a um inédito processo industrial de peletização de fertilizante(s) organomineral(is) e orgânico(s) utilizando co-produto(s) de
15 amidolarias de milho e mandioca, especialmente denominados do prégel e/ou borra(s) e/ou lodo(s), como agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias primas orgânicas e minerais; objetivando a produção de fertilizantes organominerais e orgânico(s) peletizados, diferentemente
20 dos fertilizante organominerais granulados; e ainda o melhor aproveitamento do(s) co-produto(s) ou resíduo(s) do(s) sistema(s) de produção agroindustrial e agropecuária.

Mais precisamente, a presente patente de invenção visa o processo de uso industrial de
25 produto e/ou co-produto e/ou subproduto e/ou resíduo da cadeia produtiva da(s) amidolaria(s) de milho e mandioca; conhecidamente como prégel e/ou borra e/ou lodo e demais denominações, assim como seus componentes, tais como os ácidos graxos, ácidos orgânicos, hidróxidos e seus
30 derivados conjugados ou não do processo industrial de extração do amido de mandioca e/ou milho em qualquer porcentagem, para o uso como agente selante e/ou quelante

e/ou aglutinante das matérias primas orgânicas e minerais no fertilizante organomineral peletizado.

O uso industrial deste(s) co-produto(s) da(s) amidolaria(s) ou fecularia(s) na
5 peletização de fertilizante(s) organomineral(is) é estratégico pois o consumo de fertilizantes e a produção de co-produto(s) ou resíduo(s) de sistemas agroindustriais exportadores são crescentes no País.

Este processo é aplicado
10 especialmente ao setor tecnológico do agronegócio e está relacionado à sua cadeia produtiva de alimentos, mais especificamente na área de produção de fertilizantes organominerais e orgânico(s) peletizados, além do aproveitamento de co-produtos ou resíduos dos sistemas
15 agroindustriais de produção de amido de milho e mandioca.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 Existem dois fundamentos essenciais da presente patente de invenção: a produção e a utilização de fertilizantes (especialmente os fertilizantes organominerais e orgânico(s) peletizados) e o aproveitamento racional (sócio-econômico e ambiental) de
25 co-produtos ou resíduos da agroindústria de amido de milho e mandioca.

Quanto ao primeiro fundamento;
o aumento da população humana e a demanda por melhoria da qualidade de vida têm pressionado a produção crescente de
30 alimentos e de fontes alternativas de energia de origem vegetal, animal e industrial em substituição ao petróleo, especialmente os fertilizantes. A eficiência de uso dos

recursos limitantes (inclui água, fertilizante e petróleo) deve ser levada em consideração.

Esta visão equivocada está levando à excessiva utilização dos recursos naturais não renováveis e a poluição ambiental. Por exemplo, as reservas de fosfato no mundo que podem ser exploradas a baixo custo são suficientes para mais 40-100 anos apenas. A situação dos micronutrientes é pior, podem chegar ao no máximo 60 anos de reserva e exploração. Portanto, os fertilizantes minerais são recursos naturais não-renováveis e sua utilização racional e a busca por novas alternativas, especialmente os fertilizantes orgânicos e organominerais são essenciais para o País. Além disso, a literatura científica elucida o enorme potencial agronômico dos fertilizantes organominerais sobre a tradicional fertilização mineral, dentre eles: maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pela planta, menores perdas de nutrientes por volatilização, adsorção e/ou lixiviação, maior capacidade de troca catiônica, e retenção de água no solo, etc.

Além disso, o mercado atual de fertilizantes no Brasil é de 28,3 milhões de toneladas/ano (ANDA, 2012) sendo o setor de fertilizantes uma questão estratégica para o país que importa 70% do que consome (neste caso considera-se apenas os fertilizantes minerais), pela sua condição de maior importador mundial deste insumo e pela sua economia de vocação agroexportadora, responsável por 37% do PIB de 2010.

No Brasil, o mercado de fertilizantes restringe-se fundamentalmente ao mercado de minerais, em que poucos grupos dominam, entretanto, nas últimas décadas, um novo cenário vem se projetando, onde a

demanda por novas tecnologias eficientes na nutrição das plantas, e ao mesmo tempo em que recuperam o solo vem ganhando espaço - os fertilizantes organominerais. Esta alternativa vem sendo publicada pelo meio acadêmico em

5 estudos técnicos/científicos, onde o potencial dos fertilizantes organominerais e sua utilização mecanizada em grandes, médias e pequenas propriedades vem ganhando destaque e relevância nacional e internacional. Além disso, na formulação do fertilizante organomineral, utiliza-se

10 aproximadamente 30-50% de minerais, dessa forma, tecnologias que permitam agregar, agrupar a matéria orgânica compostada ou estabilizada com os fertilizantes minerais no processo de peletização do fertilizante organomineral são também pesquisadas. Existe no Brasil uma

15 legislação bastante eficiente neste setor.

Paralelamente, enorme parte da produção agrícola (soja, milho, etc), que utilizam fertilizantes como insumo, são transformados em ração animal. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores

20 de carne de frango e suíno do mundo e o setor ocupa posição de destaque no PIB brasileiro. Entretanto, durante a produção de suínos e frangos existem inúmeros resíduos agropecuários e agroindustriais. Devido ao crescimento do setor nos últimos anos, estes percentuais passaram a

25 representar milhões de toneladas e se transformaram em problemas ambientais e sanitários significativos. E garantir o status sanitário e ambiental da avicultura, suinocultura e bovinocultura brasileira no cenário mundial tem uma importância estratégica para a cadeia produtiva

30 destas carnes. Neste sentido, o correto destino é necessário e a melhor utilização é transformá-los em fertilizantes orgânicos e organominerais. Tais fertilizantes podem ser farelado, granulado e/ou

peletizado. A presente patente visa apenas o peletizado, obtido de peletizadoras.

Portanto, é consenso que os resíduos ou co-produtos e/ou subprodutos agropecuários e/ou agroindustriais devam ser reutilizados de forma correta na produção de outras demandas, com o menor impacto ambiental e para maximizar as reservas de minerais ainda existentes. Neste caso, a utilização de resíduos ou co-produtos agropecuários e/ou agroindustriais na produção industrial de biofertilizantes, fertilizante organomineral e/ou fertilizante orgânico composto em larga escala é uma alternativa com excelentes justificativas sócio-ambientais.

Outro fundamento da presente invenção, trata-se a busca de alternativas ambientais para aproveitamento dos co-produtos ou resíduos das amidolarias de mandioca e milho; neste presente pedido de patente para a produção de fertilizantes organominerais e orgânico(s) peletizados.

Assim, o uso industrial da borra, pré-gel e/ou lodo e demais denominações, assim como seus componentes, tais como os ácidos graxos e orgânicos, hidróxidos e seus derivados conjugados ou não do processo industrial de extração do amido de mandioca e/ou milho em qualquer porcentagem, para o uso como agente selante e/ou quelante e/ou aglutinante das matérias primas orgânicas e minerais no fertilizante organomineral peletizado foi aqui analisado sob o ponto de vista de inovação técnica.

Portanto, trata-se de um processo industrial de utilização de co-produtos (pré-gel) agroindustriais para peletização de fertilizantes.

ESTADO DA TÉCNICA

Como apresentado anteriormente, neste documento, a produção de fertilizantes, especialmente os organominerais peletizados, utilizando o pré-gel das amidolarias de milho e mandioca, seus componentes e derivados é estratégico e pode gerar o desenvolvimento de diferentes processos industriais e/ou produtos adequados, eficientes e sustentáveis.

10 A composição do pregel e seus derivados obtidos durante o processo de extração do amido de milho e mandioca são fundamentalmente: amido (residual do processo de extração), outros polissacarídeos, ácidos orgânicos, ácidos graxos e/ou hidróxidos em diferentes porcentagens de concentração e bastante variável entre as amidolarias. Esta mistura apresenta composição, densidade e estrutura física singular, e muitíssimo bem apropriada para a necessidade de aglutinação do pellet na fabricação de fertilizante organomineral peletizado.

20 Quando tais substâncias supracitadas, que compõem o pregel, entram em contato homogêneo com a matéria prima orgânica (camas aviárias, lodo de flotação, resíduo de incubatório, cinzas, etc; já compostadas e/ou estabilizadas, em mistura ou não) e os fertilizantes minerais (cloreto de potássio, ureia, MAP, DAP, etc) em temperatura, umidade, pressão e sob um conjunto de operações unitárias em escala industrial adequadas e automatizadas ocorrem algumas reações. Tais reações físico-químicas permitem a hidrólise da matéria orgânica, estabilização da mistura organomineral, e expansão e aglutinação pela ação do amido, dos hidróxidos (ex: sódio e/ou potássio, etc) e dos ácidos orgânicos e graxos da mistura organomineral, formando finalmente um

pellet estável. Dessa forma, a partir do pré-gel sob temperatura, umidade e pressão específicas origina-se um polímero selante e/ou aglutinante e/ou quelante, que permite que o material orgânico e mineral formem um único pellet de fertilizante organomineral homogêneo. Entretanto, o presente pedido de patente se constitui na conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos. O primeiro principal resultado é o sistema industrial de peletização de fertilizante organomineral utilizando o pré-gel e/ou borra e/ou lodo de amidolarias em larga escala, e a respectiva proteção dos nutrientes minerais pela matéria orgânica selada, quelatinizada e/ou aglutinada (especialmente o fósforo e o nitrogênio). Tais operações unitárias ocorrem de forma contínua e automatizada conforme será demonstrado a seguir.

Após buscas na literatura e nos bancos de dados de patentes, não foi encontrado nenhuma patente referenciando a peletização de fertilizantes organominerais e orgânico(s) utilizando o pré-gel e/ou borra e/ou lodo de amidolarias como agente selante e/ou aglutinante do pellet, sendo então aqui revelado um processo de uso destas moléculas. Inúmeras outras patentes e/ou pedidos de patentes são encontrados utilizando as seguintes palavras chaves isoladas: fertilizante, granulação, peletização, mandioca, milho, amidolaria, pellet, pré-gel, borra e lodo. Entretanto, nenhuma delas relaciona-se com o presente pedido de patente.

A fim de exemplificar, podemos citar algumas moléculas presentes no pré-gel das amidolarias: amido, polissacarídeos (dextrose, maltose, riboses, etc), hidróxidos (sódio e/ou potássio, etc), ácidos orgânicos (huminas, flavinas, etc) e ácidos graxos (ácido butírico, capróico, caprílico, cáprico, láurico,

merístico, palmítico, esteárico, melíssico, untriacentanoico, etc); podendo estes atuarem de forma conjugada ou individualmente na formação e estabilização do pellet de fertilizante organomineral.

5

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 O processo de uso do pré-gel de amidolarias de milho e mandioca, especialmente borra(s) e/ou lodo(s), como agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias primas orgânicas e minerais; objetivando a produção e peletização de fertilizantes organominerais é inovador e apresentado pela primeira vez.

15 O pré-gel ou outras denominações podem ser constituídos por diferentes concentrações de amidos, polissacarídeos, hidróxidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, lipídeos, e umidade, além de fragmentos e/ou tecidos vegetais. Exemplos destes
20 componentes foram citados no item Estado da Técnica. E o comportamento físico-químico destes componentes submetidos no processo industrial requerido do presente pedido de patente permite a peletização eficiente de fertilizantes organominerais e orgânico(s).

25 O processo industrial de uso consiste fundamentalmente em: (1°) matéria orgânica compostada ou estabilizada passa por peneiras (2°) para selecionar a granulometria desejável, posteriormente é moída em trituradores (3°) até atingir a granulometria
30 específica para peletização. A matéria orgânica triturada e selecionada recebe o pré-gel (4°) em fluxo contínuo. A mistura pré-gel + matéria orgânica passa também em fluxo contínuo por uma prensa extrusora (5°). Posteriormente a

mistura é conduzida até um misturador (7°), onde também recebe os fertilizantes minerais (6°). Após esta mistura homogênea no misturador (6°), a massa é conduzida para as peletizadoras (7°) e posteriormente resfriadores. A
5 utilização do pré-gel permite agregar componentes orgânicos e minerais importantes, melhorando a qualidade físico-química do fertilizante organomineral peletizado e a conformidade de pellets.

Portanto, o processo inovador, aqui descrito, usa de forma única, relevante e inovadora o pré-gel, seus componentes e derivados como aglutinante na processo de peletização dos fertilizantes organominerais.

Não foram encontradas
15 informações e modelos de inovação tecnológica que utilizem o pré-gel, ou borra e/ou lodo de amidolarias de milho e mandioca na produção e peletização de fertilizantes organominerais e orgânico(s), bem como seus componentes e derivados. Assim como há aplicação e conjugação dos
20 princípios e equipamentos já conhecidos, mas com resultados diferentes do que se encontra nos atuais métodos e técnicas de peletização de fertilizantes organominerais.

25

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente patente, natureza privilégio de invenção, refere-se a um inédito processo industrial de peletização de fertilizante(s)
30 organomineral(is) utilizando pré-gel (ou outras denominações) de amidolarias de milho e mandioca como agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias

primas orgânicas e minerais; objetivando a produção e peletização de fertilizantes organominerais e orgânico(s).

A figura 1 representa etapas do processo, que consiste fundamentalmente nas seguintes etapas: (1°) matéria orgânica (camas aviárias, lodos, farelos, cascas, cinzas, resíduo de incubatório, resíduos vegetais, etc) compostada ou estabilizada deve sofrer operações unitárias de beneficiamento para colocá-la em condições de ser peletizada. Este material orgânico compostado ou estabilizado passa por peneiras (2°) para haver uma seleção de granulometria desejável para posteriormente ser moída em trituradores (3°) até atingir a granulometria específica para peletização. Na sequência, o produto orgânico triturado e selecionado pela granulometria ideal, recebe o pré-gel (4°), que é injetado através de um bico injetor e de um sistema automático convencional de injeção. O pré-gel deve ser originalmente aquecido com vapor d'água para permitir melhor homogeneização, podendo estar ou não diluído em água ou outro líquido inerte. O pré-gel é adicionado em fluxo contínuo na matéria orgânica selecionada e triturada. A quantidade de pré-gel adicionada dependerá da concentração de seus compostos e da formulação agronômica esperada no fertilizante organomineral peletizado. Maiores quantidades de pré-gel serão requeridas quanto maior for a capacidade higroscópica da mistura organomineral, por exemplo, em misturas organominerais com maiores quantidade de uréia ou nitrogênio será necessário maior quantidade de pré-gel quando comparado com uma formulação sem uréia ou apenas MAP ou supersimples. Esta mistura pré-gel + matéria orgânica passa em fluxo contínuo por uma prensa extrusora (5°) de oleaginosas (convencional) para misturar/ homogeneizar a massa. A mistura de matéria orgânica com pré-gel é conduzida até um misturador (6°),

onde recebe os fertilizantes minerais de interesse (7°) (ex: MAP, uréia, cloreto de potássio, ácido bórico, sulfato de cálcio, etc) e em quantidades determinadas para obtenção de formulações requeridas. Esta é a maior novidade do processo, porque o pré-gel permite a aglutinação da mistura com os minerais de forma homogênea e em um pellet. Após esta mistura homogênea no misturador (6°), a massa formulada é conduzida para as peletizadoras (8°) convencionais, em fluxo contínuo ou por batelada, com resfriadores. As peletizadoras (8°) devem estar calibradas nos seguintes parâmetros: rotação, pressão, vazão de vapor d'água, matriz da peletizadora em aço inoxidável, preferencialmente, tamanho de matriz da peletizadora, capacidade de resfriamento do pellet, etc. Portanto, a utilização do pré-gel representa um novo comportamento de peletização na peletizadora (8°). A utilização do pré-gel permite agregar componentes orgânicos e minerais importantes, melhorando a qualidade física-química do produto final (fertilizante organomineral peletizado) e aumentando a conformidade do tamanho dos pellets. As características e parâmetros físico-químicos do fertilizante organomineral peletizado obtido neste presente pedido de patente são rigorosamente similares aos demais fertilizante e em conformidade com a legislação brasileira de fertilizantes.

Portanto, o presente pedido de patente relata a conjugação de princípios e equipamentos conhecidos para a obtenção de resultados novos, ou seja, processo industrial de peletização de fertilizante(s) organomineral(is) utilizando co-produto(s) de amidolarias de milho e mandioca, especialmente denominados do pré-gel e/ou borra(s) e/ou lodo(s), como agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias primas orgânicas e

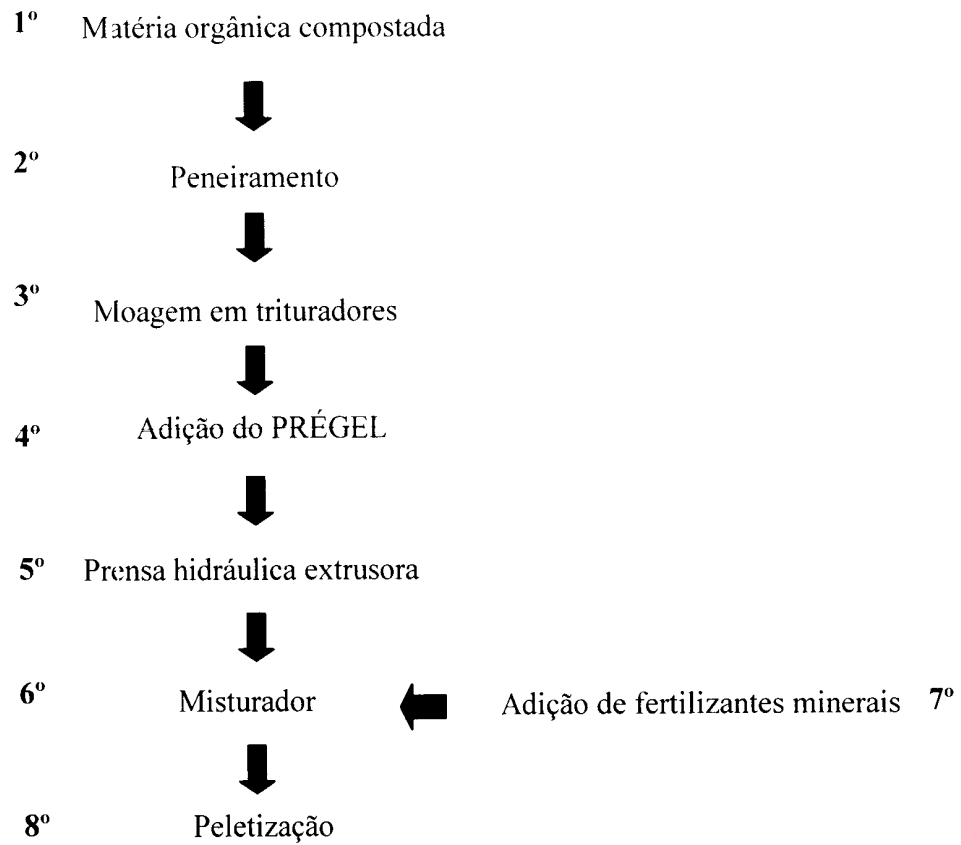
minerais; objetivando assim a produção e peletização de fertilizantes organominerais e orgânico(s).

REIVINDICAÇÕES

- 1- "PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S)
5 ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO COPRODUTO(S)
DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE
PRÉGEL E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE
E/OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS
10 ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET", caracterizado pela
conjugação de máquinas e equipamentos existentes e da
utilização de resíduo(s) e/ou coproduto(s) de amidolaria
de milho e/ou mandioca, resíduo(s) este comumente
denominado de prégel e/ou borra(s) e/ou lodo(s), para o
desenvolvimento de um processo e caracterizado por gerar
15 uma "massa" quelante e/ou aglutinante e/ou selante de
fertilizantes organominerais e orgânicos peletizados;
- 2- "PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S)
20 ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO COPRODUTO(S)
DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE
PRÉGEL E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE
E/OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS
ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET", caracterizado pela
25 conjugação de máquinas e equipamentos existentes e da
utilização de resíduo(s) e/ou coproduto(s) de amidolaria
de milho e/ou mandioca, resíduo(s) este comumente
denominado de prégel e/ou borra(s) e/ou lodo(s), para o
desenvolvimento de um processo e caracterizado por gerar
fertilizantes organominerais e orgânicos peletizados;
- 30 3- "PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S)
ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO COPRODUTO(S)
DE AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE
PRÉGEL E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE

E/OU AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS ORGÂNICAS E MINERAIS EM PELLET", caracterizado pela conjugação de máquinas e equipamentos existentes e da utilização de resíduo(s) e/ou coproduto(s) de amidolaria de milho e/ou mandioca, resíduo(s) este comumente denominado de pré-gel e/ou borra(s) e/ou lodo(s), para o desenvolvimento de um processo e caracterizado por gerar um agente peletizante de matéria orgânica, de produtos minerais e da associação da matéria orgânica com a mineral em qualquer proporção, resultando em fertilizante organomineral e/ou orgânico peletizados.

Figura 01



RESUMO

5 "PROCESSO INDUSTRIAL DE PELETIZAÇÃO DE FERTILIZANTE(S)
ORGANOMINERAL(IS) E ORGÂNICO(S) UTILIZANDO CO-PRODUTO(S) DE
AMIDOLARIA DE MILHO E/OU MANDIOCA, ESPECIALMENTE PRÉGEL
E/OU BORRA(S) E/OU LODO(S), COMO AGENTE QUELANTE E/OU
AGLUTINANTE E/OU SELANTE DAS MATÉRIAS PRIMAS ORGÂNICAS E
MINERAIS EM PELLET".

10 A presente patente, natureza privilégio de invenção,
refere-se a um processo industrial de peletização de
fertilizante(s) organomineral(is) e orgânico(s) utilizando
co-produto(s) de amidolarias de milho e mandioca,
especialmente borra(s) e/ou prégel e/ou lodo(s), como
agente quelante e/ou aglutinante e/ou selante das matérias
15 primas orgânicas e minerais; objetivando a produção de
fertilizantes organominerais e orgânico(s) peletizados,
diferentemente dos fertilizante granulados, e ainda, o
melhor aproveitamento do(s) co-produto(s) ou resíduo(s)
do(s) sistema(s) de produção agroindustrial e agropecuária.
20 Sendo este processo aplicado ao setor tecnológico do
agronegócio, especialmente a produção de fertilizantes
organominerais orgânico(s) peletizados.



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1107297-0 A2



* B R P I 1 1 0 7 2 9 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 29/11/2011
(43) Data da Publicação: 19/11/2013
(RPI 2237)

(51) Int.Cl.:
C05B 11/00
C05F 7/00
C22B 7/00
C02F 11/00
C02F 103/14
C02F 103/16

(54) Título: PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS

(73) Titular(es): Universidade Federal do Paraná

(72) Inventor(es): Brenner Magnabosco Marra, Djair dos Santos de Lima e Souza, Gustavo Ramos de Oliveira

(57) Resumo: "PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTE PARA AS PLANTAS". A presente patente de invenção refere-se a um processo de uso da lama de fosfato (lama de ETE + borra de tinta + lama do tratamento superficial de chapa de aço), obtido das etapas de preparo e pintura dos móveis oriundos das indústrias moveleiras para a fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto com aplicação agrícola a partir da técnica de compostagem físico-química-mecânica. Mais precisamente, a presente invenção visa um novo processo de uso e aproveitamento do subproduto das indústrias moveleiras (lama de fosfato), na proporção de 1% a 50%, associado a resíduos agropecuários e agroindustriais para fabricação de fertilizantes mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto através da tecnologia de compostagem físico-química-mecânica para cultivo agrícola devido sua composição nutricional, especialmente pela presença fósforo e zinco em níveis representativos.

"PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS".

5

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente patente de invenção refere-se a um processo de uso da lama de fosfato (lama de ETE + borra de tinta + lama do tratamento superficial de 10 chapa de aço), obtido das etapas de preparo e pintura dos móveis de aço oriundos das indústrias moveleiras para a fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral, fertilizante orgânico composto e/ou fonte de nutriente para 15 as plantas através da técnica de compostagem físico-química-mecânica, ou seja, com aplicação agrícola.

Mais precisamente, a presente invenção visa um novo processo de uso e aproveitamento do subproduto das indústrias moveleiras (lama de fosfato), na 20 proporção de 1% a 50%, associado a resíduos agropecuários e agroindustriais para fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto para cultivos agrícolas através da técnica de comóstagem físico-química-mecânica devido sua composição nutricional, 25 especialmente a presença fósforo e zinco.

Este produto é aplicado especialmente ao setor tecnológico do agronegócio e está relacionado à sua cadeia produtiva de alimentos, mais especificamente na área de produção e comercialização de 30 fertilizantes agrícolas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Segundo MALAVOLTA (1980), os elementos minerais podem ser classificados de acordo com a Tabela 1.

5 Tabela 1. Funções e compostos dos elementos nas plantas

Nutriente	Função	Compostos
N	Importante no metabolismo como composto	Aminoácidos e proteínas, amins, amidas, aminoaçúcares, purinas e pirimidinas, alcalóides; coenzimas, vitaminas, pigmentos
P	Armazenamento e transferência de energia, estrutural	Ésteres de carboidratos, nucleotídios e ácidos nucléicos, coenzimas, fosfolipídios
K	Abertura e fechamento dos estômatos, síntese e estabilidade de proteínas, relações osmóticas, síntese de carboidratos	Predomina na forma iônica, compostos desconhecidos
Ca	Ativação enzimática, parede celular, permeabilidade	Pectato de cálcio, fitato, carbonato, oxalato
Mg	Ativação enzimática, estabilidade dos ribossomos, fotossíntese	Clorofila
S	Grupo ativo de enzimas e coenzimas	Cisteína, cistina, metionina e taurina, glutathione, glicosídeos e sulfolipídios, coenzimas
B	Transporte de carboidratos, coordenação com fenóis	Boratos, compostos desconhecidos
Cl	Fotossíntese	Cloreto, compostos desconhecidos
Co	Fixação de N ₂	Vitamina B ₁₂
Cu	Enzima, Fotossíntese	Polifenoloxidase, Plastocianina, Azurina, esteleacianina, Umecianina
Fe	Grupo ativo em enzimas e transporte de elétrons	Citrocromos, ferredoxina, catalase, peroxidase, reductase de nitrato, nitrogenase, reductase do sulfito
Mn	Fotossíntese, metabolismo de ácidos orgânicos	Manganina
Mo	Fixação de N ₂ , redução do nitrato	Reductase do nitrato, nitrogenase
Zn	Enzimas	Anidrase carbônica, adolase

Os elementos essenciais são divididos em dois grandes grupos, dependendo das quantidades exigidas pelas plantas:

10

1. Macronutrientes - N, P, K, Ca, Mg e S

2.Micronutrientes - B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn e (Co).

Assim, como alguns outros elementos, o fósforo é um macronutriente para as plantas sendo, portanto, exigido em quantidades elevadas para a
5 correta nutrição vegetal. Tradicionalmente o fornecimento de macronutrientes, entre eles o fósforo é feita através do uso de fertilizantes contendo o elemento em questão de maneira que, em tese, qualquer fonte do elemento pode ser
10 usada para tal, sendo que a quantidade a ser utilizada para atender as necessidades vegetais dependerá, portanto, do teor do elemento existente na fonte considerada e, evidentemente, da exigência da espécie vegetal em particular. Deve-se salientar que a fonte do elemento
15 considerado deve ser de boa qualidade não levando consigo quantidades significativas de outros elementos, ditos contaminantes, que podem prejudicar sua qualidade fertilizante devido poluir/contaminar o solo, deteriorando assim as condições ambientais. Desta forma, toda e qualquer
20 fonte de fósforo pode ser utilizada na nutrição mineral das plantas desde que atenda os seguintes requisitos: fonte de fósforo; estar disponível para absorção pelas plantas; não apresentar contaminantes em quantidades prejudiciais ao ambiente.

25 Tradicionalmente, os fertilizantes têm sido produzidos pelo uso de matérias-primas extraídas da natureza que passaram, ou não, por processos físicos (exemplo: moagem, ataque sulfúrico em apatita, etc).

30

Entretanto, o aumento da população humana e a demanda por melhoria da qualidade de

vida têm pressionado a produção crescente de alimentos e de fontes alternativas de energia de origem vegetal, animal e industrial em substituição ao petróleo. A eficiência de uso dos recursos limitantes (inclui água, fertilizante e petróleo) deve ser levada em consideração.

Esta visão equivocada está levando à excessiva utilização dos recursos naturais não renováveis e a poluição ambiental. As reservas de fosfato no mundo que podem ser exploradas a baixo custo são suficientes para mais 40-100 anos apenas. A situação dos micronutrientes é pior, podem chegar ao no máximo 60 anos de reserva e exploração.

Portanto, é consenso também que estes subprodutos industriais (ex: lama de fosfato) e agroindustriais devem ser reutilizados de forma correta na produção de outras demandas, com o menor impacto ambiental e para maximizar as reservas de fosfato existentes.

Assim, o uso da Lama de Fosfato como fonte nutricional para as plantas foi aqui analisado sob o ponto de vista de inovação técnica devido sua aplicação na produção de fertilizantes organominerais e orgânico composto.

Infelizmente, o uso de resíduos em qualquer atividade no Brasil, embora oficialmente (nas normas e resoluções dos órgãos ambientais competentes) seja recomendado, é cercado de vários preconceitos que são às vezes fundamentados e, em outras, não. Evidentemente, a utilização descompromissada e sem critérios deve ser combatida por todos e, principalmente, pelos técnicos que, em última instância têm a obrigação moral e ética de preservar as condições de vida para que todas as espécies; inclusive, e, principalmente, a humana; não sejam

prejudicadas. Desta maneira o uso de resíduos (no caso específico da Lama de Fosfatos) deve ser criteriosa.

Tecnicamente, para se fazer uma aplicação responsável e correta de produtos ou resíduos; quer da maneira como saem do processo produtivo ou após terem sofrido processos físicos e/ou químicos; ou mesmo mistura de produtos/resíduos ou destes com matérias-primas naturais; no solo, é necessário conhecer o produto/resíduo que será aplicado.

Portanto, o presente pedido de patente, aborda a possibilidade de uso de subprodutos do processo de fosfatização de móveis metálicos como matéria-prima na composição de fertilizantes para nutrição mineral de plantas.

No processo de fabricação dos móveis, uma das etapas se constitui no preparo e pintura. Esta etapa gera Lama de Fosfato rica em fósforo, e que apresenta alto potencial de uso agrícola.

Para a realização do estudo agronômico da Lama de Fosfato, coletas de amostras e análises físico-químicas foram realizadas.

Foi utilizada a metodologia oficial do Ministério da Agricultura para fertilizantes (Portaria SNAD nº 31 de 08/06/1982) e os valores de metais pesados foram comparados com os valores máximos permitidos para contaminantes em fertilizantes (Instrução Normativa do MAPA DAS 27 de 05/06/2006).

Em seguida os resultados foram estudados e discutidos sob o ponto de vista de agronômico. Foram também conduzidos dois testes, em casa-de-vegetação, sendo um deles de incubação da Lama de Fosfatos com solo e o outro plantio de alface em solo incubado com a Lama de

Fosfatos. Estes experimentos encontram-se abaixo detalhados.

Experimento I: Plantio de alface

5 O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação do Campus Experimental do Departamento de Fitotecnia da UFV, situado nas coordenadas geográficas latitude 20,450 S e longitude 42,510 W.

10 Para desenvolvimento da pesquisa foi tomado um solo junto ao banco de solos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, cuja caracterização química e física já estava pronta e que atendia aos objetivos projetados, ou seja, pobre em fósforo.

15 O experimento constou de dois materiais: um adubo fosfatado (super-simples) utilizado no mercado e a Lama de Fosfatos que foi misturado em proporções iguais. Foram seguidas as recomendações de adubação, contida nas "Recomendações para Uso de Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais", Quinta Aproximação
20 (1999). Os níveis utilizados foram: uma testemunha, com zero de Lama de Fosfato ou super-simples, e, uma, duas, cinco e dez vezes a quantidade necessária de adubação fosfatada, calculada segundo as Recomendações para o Uso de
25 Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais, Quinta Aproximação (1999) e baseando nos teores das diferentes fontes, de maneira a serem aplicadas quantidades semelhantes de P, independentemente da fonte. Foram utilizadas três repetições.

30 Uma vez instalado o experimento, e garantida a estabilidade estrutural do solo, as parcelas ficaram incubadas em casa-de-vegetação onde foram umedecidas de maneira a manter a umidade do solo

variando entre 50 e 80% da capacidade de campo. O controle foi feito por pesagem.

Após 30 dias de incubação, foi realizada a adubação química e orgânica de acordo com a análise de solo e a necessidade de adubação da cultura da alfaca calculada segundo as Recomendações para o Uso de Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais, Quinta Aproximação (1999), sendo então feito o transplântio de mudas de alfaca produzidas em leito de areia.

Na ocasião da colheita da alfaca, foram analisados os seguintes parâmetros da cultura: número de folhas, peso fresco e área foliar. Foi também estudada a absorção de metais pesados pelas plantas da alfaca.

Ao final do experimento os resultados foram submetidos a análises estatísticas segundo o modelo estatístico inteiramente casualizado, obtido pela disposição das repetições e tratamentos aleatoriamente e com mudanças de posições, aleatórias, semanalmente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O decreto n° 4.954/2004 aprova o regulamento da lei n° 6.894, de 16/12/80, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. O regulamento estabelece as normas gerais sobre registro, padronização, classificação, inspeção e fiscalização da produção e do comércio desses produtos.

Conforme anteriormente especificado, um material para ser considerado fertilizante ou para compor um fertilizante necessita de atender a

algumas especificações e garantias. Desta maneira, o enfoque dado a Lama de Fosfatos sob o ponto de vista de sua utilização agrícola foi baseado no atendimento a estas especificações ou garantias.

5 Os resultados das análises da Lama de Fosfatos encontram-se no Quadro 1.

10 Quadro 1. Resultados da análise da Lama de Fosfatos resultantes do processo de fosfatização.

Umidade			Macronutrientes						
65° C	110° C	Total	pH	Ca (total)	Mg (total)	K (água)	P(ácido cítrico)	N (neutro de amônio)	
*									
Dados Base Seca (Umidade 65° C)									
76,2	8,23	84,43	2,72	1,64	0,04	0,13	7,00	7,00	
Micronutrientes				Contaminantes					
Cu	Zn	Mn	Fe	Cd	Ni	Pb	Cr	As	Hg
mg/kg									
Dados Base Seca (Umidade 65° C)									
58,20	5,000	0,00	56,97	12,60	918	48,4	76	*	*

* não detectado (abaixo do limite de detecção do método utilizado)

15 A Lama de Fosfato apresentou elevada umidade e, para ser utilizada para a fabricação de fertilizantes deverá ser secada, embora a umidade elevada não se constitua um fator de impedimento à utilização, conforme acima abordado, no que se refere à legislação pertinente. Para ser utilizada diretamente no solo também não haveria problemas relacionados ao teor de umidade que
20 apresenta.

Outra opção, a produção de fertilizantes organo-minerais; o uso da Lama de Fosfatos com elevada umidade seria até benéfica, pois, normalmente

na produção deste tipo de fertilizante é feita uma compostagem, para a qual é necessária a utilização de água, sendo a Lama de Fosfato já bastante úmida facilitaria a confecção das leiras de compostagem.

5 O Quadro 1 mostra que a Lama de Fosfato apresenta pH baixo. Na composição de fertilizantes não é observado o pH dos componentes, de maneira que são utilizados fertilizantes ácidos, básicos e neutros. Como exemplo, pode-se citar o pH do fertilizante fosfatado
10 super-simples que tem pH de 1,76, a uréia de 8,38 e o sulfato de amônio de 4,91 (estes resultados foram obtidos em amostras destes fertilizantes, tomadas junto ao comércio de Viçosa/MG).

O Cálcio, magnésio, potássio,
15 fósforo, nitrogênio, cobre, zinco, manganês e ferro são nutrientes essenciais para as plantas e a presença deles é sempre favorável à qualidade do fertilizante.

Desta maneira, todos os elementos acima listados serão utilizados pelas plantas e
20 ainda serão necessárias aplicações de fontes extras visto não estarem em quantidade suficiente para atender a demanda das mesmas a não ser que fosse utilizada grande quantidade, o que foge a um dos princípios da adubação química que é o de utilizar fertilizantes concentrados. Exceção deve ser
25 feita para o fósforo, este em quantidade maior na Lama de Fosfatos. Ressalta-se também que, para a obtenção de produtividades elevadas, uma das premissas básicas é o fornecimento adequado de elementos nutrientes já que, conforme a Lei do Mínimo (ou de Mitscherlich), o elemento
30 faltante é quem limita a produtividade de uma determinada planta. De maneira que a nutrição mineral das plantas deve ser feita observando o suprimento adequado de todos os

elementos essenciais e mesmo daqueles considerados úteis.

Na prática agrícola as plantas dispõem de duas fontes de fósforo: o solo e o adubo. Nas regiões tropicais e subtropicais, como acontece no Brasil, o P é o elemento cuja falta no solo mais freqüentemente limita a produção, particularmente das culturas anuais: em 90% das análises de solos feitas no País encontram-se teores baixos de P "disponível", isto é, menores do que 10 ppm. No Cerrado é freqüente encontrar-se apenas 1 ppm. O adubo representa uma transferência do fósforo das jazidas (= litosfera) para o solo considerado como parte da biosfera.

Já foi discutido que o P é o elemento menos abundante na solução do solo quando se consideram os macronutrientes. E, aumentar sua concentração na fase líquida através de adubação é, talvez, a mais difícil das tarefas dessa prática agrícola. A fixação pode ser diminuída com a redução da acidez através da calagem e com a granulação dos adubos.

Cádmio, níquel, chumbo e cromo não são considerados elementos nutrientes e o fornecimento deles ao solo deve ser criteriosamente analisado. Inicialmente deve ser abordada a presença destes elementos nos solos e nos fertilizantes e corretivos largamente utilizados na agricultura.

A Tabela 3 apresenta os valores médios destes elementos em alguns fertilizantes e corretivos utilizados em Minas Gerais. A Tabela 4 apresenta os valores médios destes elementos em fertilizantes e corretivos utilizados em diferentes partes do mundo.

Tabela 3. Valores médios de níquel, cádmio, chumbo e cromo em alguns fertilizantes e corretivos utilizados em Minas Gerais

Produto	Ni	Cd	Pb	Cr
	ppm			
Calcário Unaí (MG)	16,4	3,2	23,3	0,4
Calcário Arcos (MG)	8,0	2,4	27,3	0,3
Calcário Italva (RJ)	11,5	3,0	26,2	0,3
Calcário Pote (MG)	19,0	2,6	23,3	0,3
Calcário Coramandel (MG)	17,1	3,1	27,9	0,6
Calcário Bocaiúva (MG)	12,3	3,4	27,2	0,1
Calcário Formiga (MG)	10,7	2,3	25,3	0,3
Corretivo Lama de Fosfato Paracatu (MG)	11,4	51,9	2.817,0	0,6
Fórmula (NPK + Zn) 0-30-15 +0,2%	20,6	5,4	55,4	0,4
Fórmula (NPK + Zn) 0-20-20 +0,4%	13,8	2,7	37,7	0,6
Fórmula (NPK + Zn) 2-28-8 +0,5%	30,3	14,6	275,0	1,6
Termofosfato Yoorin	3.300,0	3,1	65,3	9,1
Apatita de Araxá	117,7	6,7	36,1	1,9
Superfosfato triplo + Cu	24,6	4,4	17,9	0,9

Fonte: Adaptado de AMARAL

5 SOBRINHO, *et al.*, 1.992.

Tabela 4. Faixas de concentrações típicas de metais pesados em fertilizantes fosfatados, calcários e rochas fosfatadas

Produto	Cd	Pb	Ni
	PPM		
Fertilizantes Fosfatados ⁽¹⁾	0,1-170,0	7-225	7-38
Calcários ⁽²⁾	0,04-0,10	20-1.250	10-20
Rochas Fosfatadas da Flórida EUA ⁽³⁾	6,8	15,0	39
Rochas Fosfatadas de Kola URSS ⁽³⁾	1,0	2,4	2
Rochas Fosfatadas do Marrocos ⁽³⁾	11,0	3,2	69
Rochas Fosfatadas de Israel ⁽³⁾	23,0
Rochas Fosfatadas do Togo ⁽³⁾	65,0
Rochas Fosfatadas do Senegal ⁽³⁾	75,0
Rochas Fosfatadas da Tunísia ⁽³⁾	30,0
Rochas Fosfatadas da África do Sul ⁽³⁾	3,0

10 Fonte: ⁽¹⁾ ALLOWAY (1990);

⁽²⁾ FORSTNER & WITTMANN (1981); ⁽³⁾ SAUERBECK (1984).

15 Comparando-se o Quadro 1 com as Tabelas 3 e 4 verifica-se que estes elementos também estão presentes em todos os fertilizantes e corretivos tanto no Estado de Minas Gerais quanto em nível mundial, ou seja,

não é exclusividade da Lama de Fosfatos terem estes elementos. Estes valores mostram a ampla possibilidade de uso da Lama de Fosfatos.

Segundo Malavolta (1980) e Lindsay (1979), os teores de cádmio admitidos como normais nas plantas variam entre 0,1 e 1 ppm; efeitos tóxicos para o homem têm sido observados quando o teor nas plantas consumidas excede 3 ppm. Grande parte do cádmio absorvido permanece nas raízes e a absorção é inibida por cálcio, manganês e zinco e fosfatos. A principal causa da toxidez pelo cádmio está associada à sua combinação com grupos tiólicos (SH) de enzimas e proteínas o que provoca desarranjos no metabolismo. Nos animais acumula-se nos rins, fígado e baço, provocando danos aos túbulos renais, inflamação na mucosa do nariz e enfisema pulmonar. Sendo a Lama de Fosfato rica em fósforo, cálcio, manganês e zinco, a própria Lama de Fosfato já seria limitante para a absorção deste elemento que, por sinal apresenta baixo teor.

Como se pode verificar, a adubação fosfatada inibe a absorção de cádmio e, como a Lama de Fosfatos é rica em fósforo, a aplicação da própria Lama de Fosfato inibirá a absorção do cádmio.

O teor de níquel nos solos é geralmente inferior a 100 ppm (MALAVOLTA, 1980) e, por outro lado, a correção de acidez do solo, que é uma prática necessária para ser conseguida boa produtividade, diminui a toxidez de níquel, em razão de precipitá-lo na forma de óxidos de baixa solubilidade. Pode se concluir que quantidade elevada da Lama de Fosfato pode ser aplicada no solo, em razão de serem mantidas, na solução do solo, baixas concentrações deste elemento em pH 5. A adubação

potássica também diminui a disponibilidade do níquel na solução do solo. A primeira menção sobre o efeito tóxico do níquel foi feita por Wolff (1913), trabalhando com aveia em solução nutritiva. Entretanto, pesquisas mais recente têm
5 mostrado que, tanto plantas quanto animais respondem positivamente a este elemento (Vanselow, 1966; Mishra & Kar, 1974; Hewitt, 1979 e Welch, 1981; em trabalhos com plantas e Nielsen & Mertz, 1984, trabalhando com animais). Estas pesquisas mostram que as plantas retiram este
10 elemento do solo, de maneira que a quantidade aplicada não permanece no solo acumulando-se ano após ano.

O conteúdo de Pb nos solos agrícolas varia entre 2 e 200 ppm, concentrando-se nas camadas superficiais. A maior parte de Pb acumula-se nas
15 raízes, caules e folhas e muito pouco nas sementes. A solubilidade dele é baixa e muito diminuída pela correção da acidez do solo além do fato de o Ca^{+2} competir eficientemente com o Pb^{+2} nos sítios de troca (LINDSAY, 1979; MALAVOLTA, 1980).

20 A literatura mundial (Malavolta, 1980; Lindsay, 1979; entre outros) atribuem ao cromo efeito estimulante para a produção de milho, na concentração de 0,5 ppm, na solução do solo. Além da maior parte do cromo não ser disponível devido formar compostos
25 insolúveis com os óxidos de ferro e alumínio, é também fortemente fixado pela matéria orgânica e pelas argilas. Além disso, as plantas absorvem e transportam pouco cromo. Provavelmente, em função destes problemas, até a presente data ainda não foi estabelecido o nível crítico para este
30 elemento no solo e, em assim sendo, não se pode determinar a quantidade máxima de fontes deste elemento poderiam ser aplicadas no solo.

O Quadro 2 apresenta os resultados obtidos para peso fresco (g planta⁻¹), área foliar (cm² planta⁻¹) e número de folhas (folhas planta⁻¹). Não houve diferença estatística entre o super-simples e a
5 Lama de Fosfato para uma mesma dose de P mostrando que a Lama de Fosfato, agronomicamente, é similar ao super-simples no fornecimento de P. A não aplicação de super-simples ou Lama de Fosfato apresentou a menor produtividade de alface comparativamente a aplicação destes materiais
10 para qualquer das doses utilizadas. Este resultado mostra que, para uma boa produtividade de alface é necessária a correção do solo, e que, agronomicamente, a Lama de Fosfato de móveis substitui o super-simples como fonte de P. Aumentando-se a dose utilizada, tanto de super-simples
15 quanto de Lama de Fosfato, houve tendência de diminuir a produtividade da alface, apresentando diferença estatística na maior dose utilizada. Estes resultados são coerentes porque para o cálculo da quantidade de P a ser aplicada, utiliza-se a análise de solo e a necessidade de cada
20 cultura em particular. No presente caso utilizou-se as recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, Quinta Aproximação (1999). Desta forma, a aplicação da quantidade necessária é suficiente para suprir bem as plantas e assim obter elevada produtividade. À
25 medida que a quantidade aplicada aumentou pode ter havido inibição de absorção de outros elementos essenciais. Deve-se enfatizar, entretanto, que, em nenhuma das doses aplicadas, ocorreram sintomas de fitotoxicidade. A ausência de aplicação do super-simples ou da Lama de Fosfato, por
30 seu turno, resultou em plantas com deficiências nutricionais para P.

Quadro 2. Peso fresco, área foliar e n° de folhas de alface cultivar Regina cultivada

em solo com aplicação de super-simples e Lama de Fosfato da Itatiaia móveis S.A.

Parâmetro	Material	Quantidade necessária				
		0	1	2	5	10
Peso fresco (g planta)	SS	98,76 c	281,87 a	263,75 a	261,25 a	236,25 b
	Lama de Fosfato	79,23 c	294,17 a	272,45 a	254,33 a	215,47 b
Área foliar cm ² planta	SS	887,32 c	5.172,27 a	5.137,30 ab	5.041,02 ab	4.667,15 b
	Lama de Fosfato	845,63 c	5.324,17 a	5.146,12	5.065,19 ab	432,11 b
Número de folhas planta	SS	16,5 c	45,6 a	44,2 ab	43,5 ab	40,5 b
	Lama de Fosfato	16,5 c	45,6 a	44,2 ab	43,5 ab	40,5 b

Médias seguidas por uma mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de metais pesados na parte aérea da alface, para todas as doses utilizadas no experimento, resultou em valores inferiores ao limite de leitura possível no espectrofotômetro. Pode-se assim concluir que a aplicação de super-simples ou da Lama de Fosfato de móveis, até dez vezes a quantidade necessária, não promoveu acréscimo de metais pesados nas plantas de alface.

Levando-se em consideração os trabalhos realizados e a discussão anteriormente promovida foi verificado que:

A Lama de Fosfatos de móveis por conter fósforo e micronutrientes, apresenta real potencial de uso agrícola como fertilizante, na composição de fertilizantes e/ou na confecção de fertilizantes organo-minerais;

A Lama de Fosfatos mostrou eficiência similar ao super-simples como fonte de fósforo para as plantas;

Para o cultivo da alface é necessária a utilização de uma fonte de fósforo sendo que as duas fontes utilizadas, o super-simples e a Lama de Fosfato de móveis, apresentaram o mesmo valor agrônômico e podem assim ser utilizados para tal propósito.

Comparativamente ao super-simples a Lama de Fosfato de móveis apresentou os mesmos resultados no que se refere à produtividade e atributos qualitativos da alface, cultivar Regina, podendo assim substituí-lo.

Tanto o super-simples quanto a Lama de Fosfato de móveis, utilizados no cultivo da alface, cultivar Regina, não promoveram aumento do teor de metais pesados na parte aérea das plantas, mesmo em doses elevadas, dez vezes acima das recomendações agrônômicas, mostrando serem estes materiais possíveis de utilização agrícola sem promover danos à qualidade alimentícia da alface bem como ao ambiente.

O conteúdo de elementos contaminantes presentes na lama de fosfato é inferior ao valor máximo permitido segundo a Instrução Normativa MAPA DAS 27 de 05 de junho de 2006.

Em função do acima exposto pode concluir que a Lama de Fosfatos pode ser utilizada para aplicação no solo, como fertilizante fosfatado, não apresentando potencial significativo para contaminar solo e/ou coleções hídricas.

O presente processo refere-se, portanto, ao uso da lama de fosfato, proveniente de resíduo gerado pelas fábricas de móveis de aço no tratamento das chapas metálicas, para a fabricação de fertilizante mineral misto, orgânico composto e/ou organomineral. Essa Lama de

fosfato é transportada para plataforma de secagem natural ou para a plataforma de secagem com estufa móvel. Uma parte menor vai servir de fonte de fósforo para cura de compostagem de cama de frango mais palha de café. Após a
5 secagem da Lama de Fosfato e da compostagem, são passados em um moinho de martelo com uma peneira 4,75 mm (ABNT 4) para homogeneização do lote. Em seguida a Lama de Fosfato é direcionada para a biocompostagem e/ou para galpão de matérias-primas para formulação de fertilizantes para serem
10 aplicados via solo. As formulações são preparadas agronomicamente para atingir o padrão N-P-K desejável. A lama é conduzida para misturador tipo betoneira, assim como os demais componentes da mistura.

Portanto, trata-se de um novo
15 processo de utilização de sub-produtos industriais na agricultura, e com finalidade sócio-ambiental.

20

25

ESTADO DA TÉCNICA

30

A Lama de Fosfato é um passivo ambiental composto de Lama de ETE + Borra de Tinta + Lama do tratamento superficial de chapa de aço, oriunda das indústrias moveleiras.

5 Os resíduos industriais e agroindustriais assumiram atualmente um grande passivo ambiental, mas com potencial de aproveitamento como fertilizante ou corretivo de solos. E devido esta grande quantidade de resíduos produzidos e a falta de recursos não
10 renováveis (especialmente fosfato) crescente, novas alternativas e opções devem ser exploradas.

Braile & Cavalcanti (1979) consideram que os poluentes com compostos orgânicos sintéticos e metais pesados como os mais preocupantes,
15 principalmente porque estes últimos vêm aumentando, em função da expansão da indústria, para atender as melhorias na qualidade de vida da população.

Os resíduos que possuem pH acima de 6,0 geralmente têm boa aceitação para aplicação no
20 solo, pelas suas propriedades de tamponamento que resultam em boa eficiência na correção da acidez e do pH do solo. Deve-se enfatizar, entretanto, que alguns fertilizantes possuem valores de pH muito diferentes do valor sugerido pela CETESB, exemplificando, o adubo fosfatado super-
25 simples apresenta pH em água (1:2,5) de 1,76; a uréia de

8,38 e o sulfato de amônio de 4,91. Estes materiais são fertilizantes clássicos e empregados mundialmente na produção vegetal e, se resíduos fossem, não atenderiam ao requisito de pH acima estipulado. Na verdade, os materiais para serem utilizados na agricultura devem apresentar concentrações de elementos e demais características que, em uma análise química com interpretação como resíduo, pela NBR 10.004, seriam considerados resíduos perigosos, pois podem fornecer elementos de maneira bastante efetiva.

Assim, a primeira consideração a fazer sobre a utilização de um resíduo na agricultura é verificar se os elementos nutrientes vegetais estão em concentração suficiente para serem utilizados. Evidentemente, no caso em particular, por efetivamente se tratar de resíduo deve ser estudados sobre possíveis efeitos contaminantes para o solo e, mesmo nesta condição devem ser comparados aos produtos tradicionalmente utilizados. O pH da Lama de Fosfato é aproximadamente 3,0.

Consideram-se metais pesados os elementos químicos pertencentes ao grupo de transição da tabela periódica e que apresentam peso atômico e densidade altos. São também denominados microelementos, elementos-traços e, quando atendem aos critérios de essencialidade, micronutrientes. Os metais pesados são muito estáveis na natureza, apresentando grande persistência, e são, conseqüentemente, acumulados no solo e, ou, em sistemas

biológicos, a partir dos níveis inferiores da cadeia alimentar (Bittell & Miller, 1974 E Lagerwerff, 1977).

Os metais pesados são provenientes de várias fontes, destacando-se, principalmente, os aerossóis urbano-industriais, os rejeitos líquidos e sólidos de animais, do homem, das minerações, da indústria, da agroindústria e os agrotóxicos (Braile & Cavalcanti, 1979). Os teores de metais pesados no solo que podem ser considerados perigosos para as plantas e, posteriormente, transmitidos na cadeia alimentar ainda não estão bem definidos. Uma série de estudos a respeito vem sendo conduzida ao longo dos anos, em diversos países. Rurves, citado por Braile & Cavalcanti (1979), desenvolveu uma série de experimentos, durante vários anos, envolvendo aumento nas concentrações dos elementos boro, cobre, cádmio e zinco, em solos, visando determinar os seus níveis fitotóxicos para aveia, cravo, rabanete e alface. Encontrou que um efeito fitotóxico nessas plantas é possível, quando são encontrados teores no solo superiores a 3 mg dm^{-3} de boro extraído em água, 30 mg dm^{-3} de cobre extraído em EDTA, 200 mg dm^{-3} de zinco extraído em ácido acético e 20 mg dm^{-3} de cádmio extraído em ácido acético.

A grande capacidade de adsorção

apresentada pelo solo faz com que ele se torne o local de destino da Lama de Fosfatos. Porém, estudos, caso a caso, devem ser conduzidos, pois se sua capacidade de adsorção for ultrapassada, pode ocorrer a degradação da qualidade do solo (CETESB, 1984).

De maneira geral, os metais pesados, após serem dispostos no solo, podem participar de reações: os solos possuem vários sítios de adsorção, com diferentes propriedades de ligação, além de ampla gama de complexos iônicos e não-iônicos, capazes de adsorver e mesmo precipitar metais (Cetesb, 1977). Harmsen (1979) relatou alguns sítios de adsorção com cargas negativas dos argilominerais; e reações de complexação com compostos orgânicos também ocorrem (Baes & Sharp, 1983; Amacher et al., 1986; King, 1988) e são importantes, pois a matéria orgânica é responsável por grande parte da CTC dos solos (McLellan & Rock, 1988). Os metais apresentam grande afinidade por ácidos húmicos, na seguinte ordem decrescente: cobre, chumbo, ferro, cobalto, cádmio, zinco e alumínio (Costa, 1990).

Vários países possuem normas que regem a disposição de resíduos sólidos sobre o solo. Nos Estados Unidos, por exemplo, a disposição é baseada na classe textural e na capacidade de troca catiônica do solo

(Elliot et al., 1986b). No Brasil esta questão ainda é polêmica e, assim, para o uso de resíduos principalmente na agricultura tem sido sugerido um estudo do resíduo para serem desenvolvidas as recomendações para seu uso.

5 No processo de fosfatização dos armários de aço não há a geração de compostos orgânicos naturais, nem sintéticos. Entretanto, a ocorrência de metais pesados deve ser cuidadosamente analisada, pois estes podem estar presentes, oriundos das matérias-primas
10 utilizadas no processo, e as quantidades podem restringir ou limitar seu uso agrícola ou as quantidades a serem usadas. A Lama de Fosfato não apresenta teores de metais pesados acima dos critérios definidos pela NBR 10.004. Os teores de P_2O_5 total é aproximadamente 9,0%; cálcio total
15 1,6% e zinco 0,5%.

Existe no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, o depósito da Patente de "UTILIZAÇÃO DE LAMA DE FOSFATO COMO FERTILIZANTES" (PI9401891-0 A2 de 14/06/1994) sendo que esta patente, na
20 data de 25/04/2000, teve o Despacho de Arquivamento - Art.36 § 1º da LPI, "Arquivado definitivamente o pedido de patente, uma vez que não houve manifestação do depositante quanto à exigência formulada".

25

Diferente do que é conhecido publicamente, a presente patente revela um novo uso de processos já conhecidos, por exemplo, o uso da Lama de Fosfato para a produção de fertilizante mineral misto, organomineral, fertilizante orgânico composto e/ou fonte de nutrientes para as plantas, especificamente o uso dos componentes fósforo (P), cálcio (Ca) e zinco (Zn), que pode ou não ser misturado a carbono orgânico (resíduos agroindustriais e/ou orgânicos urbanos) para se produzir os fertilizantes. O processo é caracterizado por utilizar a lama de fosfato e seus componentes como elemento de nutrição para as plantas.

Caso seja necessário e/ou requerido pode-se adicionar a lama de fosfato, outros minerais (N, K, B, entre outros), compostos e/ou substâncias bem como resíduos agroindustriais, orgânicos urbanos e/ou matéria orgânica. Este fator possibilita à formulação de diferentes fórmulas de fertilizantes, bem como a aplicação deste passivo ambiental, a lama de fosfato, como um insumo para o sistema de produção de alimentos. Pode ainda, ser adicionado a lama de fosfato, borras de óleos de soja e/ou algodão, entre outros.

Obs.: cabe salientar, que não é necessário a adição de matéria orgânica compostada ou não, bem como minerais, borras de óleos e/ou resíduos à lama de fosfato, para que a mesma possa ser utilizada como fonte de nutriente para as plantas. Os nutrientes da lama de fosfato por si só já estão na forma requerida pelas plantas, podendo ser utilizada *in natura* e/ou em associação com outros nutrientes.

Para que a lama de fosfato seja misturada a outros minerais, borras de óleos, substâncias,

resíduos e matérias orgânicas, a mesma deverá ser homogeneizada juntamente com o componente a ser adicionado e requerido, em um sistema do tipo betoneira, misturador, homogeneizador, entre outros.

5 Assim, é produto da presente invenção promover o uso da lama de fosfato para a produção de fertilizante mineral misto, organomineral, fertilizante orgânico composto e/ou como fonte de nutrientes para as plantas.

10 São vantagens da presente invenção:

1. a utilização de resíduos da indústria moveleira, ou seja, um passivo ambiental como alternativa para os sistemas de produção agrícola, ou seja,
15 como insumo agropecuário;

2. a não deposição e/ou lançamento de forma irracional e/ou não ambientalmente correto deste passivo ambiental;

3. a devida utilização da lama
20 de fosfato, desta forma aproveitando o potencial agrícola deste resíduo;

4. a utilização deste resíduo como fonte de nutrientes para as plantas.

25

30

A presente patente de invenção refere-se a um processo de uso da lama de fosfato (lama de ETE + borra de tinta + lama do tratamento superficial de chapa de aço), obtido das etapas de preparo e pintura dos móveis de aço oriundos das indústrias moveleiras para a fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral, fertilizante orgânico composto e/ou fonte de nutrientes para as plantas, ou seja, com aplicação agrícola. Mais precisamente, a presente invenção visa um novo processo de uso e aproveitamento do subproduto das indústrias moveleiras (lama de fosfato), na proporção de 1% a 50%, associado a resíduos agropecuários e agroindustriais para fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto para cultivos agrícolas através da técnica de compostagem físico-química-mecânica devido sua composição nutricional, especialmente a presença fósforo e zinco.

Apenas a título de exemplificação, mostraremos na tabela a seguir possíveis formulações de fertilizantes utilizando a lama de fosfato:

Tabela 05. Exemplos de formulações de fertilizantes utilizando a lama de fosfato em diferentes porcentagens.

Fertilizante	Componentes	Quantidades (%)
A	Lama de fosfato	30
	Ureia	10
	KCl	10
	Cama de frango	50
B	Lama de fosfato	60
	Ureia	20
	KCl	20
	Cama de frango	0
C	Lama de fosfato	5
	Ureia	10
	KCl	10
	Cama de frango	75
D	Lama de fosfato	50
	Ureia	0
	KCl	0
	Cama de frango	50

Obs.: Como descrito anteriormente, cabe ressaltar que a tabela 05 (cinco)

ilustra apenas a título de exemplo, formulações de fertilizantes utilizando diferentes porcentagens da lama de fosfato, não sendo estas as únicas possibilidades de uso deste resíduo. A utilização da lama de fosfato em
5 diferentes porcentagens em associação a outros minerais, compostos, substâncias, borras de óleos, matéria orgânica, e/ou outros resíduos produz uma infinita gama de produtos e/ou fertilizantes, podendo os mesmos atender a diferentes exigências nutricionais de diferentes culturas.

10 Como não há restrição quanto aos componentes que irão formar um determinado tipo de fertilizante, qualquer tipo de produto, substância e/ou molécula pode ser adicionado e/ou retirado da formulação, também os fatores de pH, umidade, temperatura, densidade e
15 pressão aos quais o processo de fabricação dos fertilizantes passam, não tem um padrão único. São variáveis que necessitam ser otimizadas no processo para cada tipo de formulação, composição e/ou necessidade.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA
INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE
5 MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO
COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS,
caracterizado por conjugação de substâncias como o
Fósforo, Zinco e de outros minerais presentes na lama
de fosfato (lama de ETE + borra de tinta + lama do
10 tratamento superficial de chapa de aço), obtido das
etapas de preparo e pintura dos móveis oriundos das
indústrias moveleiras, para a fabricação de
fertilizante mineral misto, organomineral e/ou
fertilizante orgânico composto através da técnica de
15 compostagem físico-química-mecânica como fonte de
nutrientes para as plantas;
2. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO,
ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU
20 FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS, UTILIZANDO COMO
MATÉRIA PRIMA RESÍDUOS DA INDÚSTRIA MOVELEIREIRA, MAIS
ESPECIFICAMENTE A LAMA DE FOSFATO EM DIFERENTES
PORCENTAGENS, caracterizado por utilização de resíduos
da indústria moveleira (lama de ETE + borra de tinta +
25 lama do tratamento superficial de chapa de aço),
obtido das etapas de preparo e pintura dos móveis
oriundos das indústrias moveleiras, podendo a lama de
fosfato ser ou não, conjugado e/ou misturado a
resíduos agropecuários e/ou borra de óleo (s) (soja,
30 algodão, entre outros) e/ou lixo orgânico urbano, para
a produção de fertilizante mineral misto,
organomineral, fertilizante orgânico composto e/ou
fonte de nutrientes para as plantas.

RESUMO

"PROCESSO DE USO DA LAMA DE FOSFATO, SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA MOVELEIRA, NA FABRICAÇÃO DE FERTILIZANTE MINERAL MISTO, ORGANOMINERAL, FERTILIZANTE ORGÂNICO COMPOSTO E/OU FONTE DE NUTRIENTES PARA AS PLANTAS". A presente patente de invenção refere-se a um processo de uso da lama de fosfato (lama de ETE + borra de tinta + lama do tratamento superficial de chapa de aço), obtido das etapas de preparo e pintura dos móveis oriundos das indústrias moveleiras para a fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto com aplicação agrícola a partir da técnica de compostagem físico-química-mecânica. Mais precisamente, a presente invenção visa um novo processo de uso e aproveitamento do subproduto das indústrias moveleiras (lama de fosfato), na proporção de 1% a 50%, associado a resíduos agropecuários e agroindustriais para fabricação de fertilizante mineral misto, organomineral e/ou fertilizante orgânico composto através da tecnologia de compostagem físico-química-mecânica para cultivo agrícola devido sua composição nutricional, especialmente pela presença fósforo e zinco em níveis representativos.



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1105944-3 A2



* B R P I 1 1 0 5 9 4 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 24/11/2011
(43) Data da Publicação: 10/09/2013
(RPI 2227)

(51) Int.Cl.:
B01D 5/00
B01D 3/02
C12G 3/12
F28B 1/02
F25B 39/04

(54) Título: PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE CACHAÇA

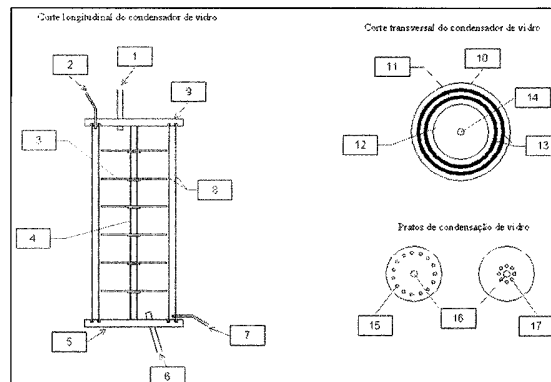
(73) Titular(es): Universidade Federal do Paraná

(72) Inventor(es): Brener Magnabosco Marra, Djair dos Santos Lima e Souza, Gustavo Ramos de Oliveira

(57) Resumo: "PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE A CACHAÇA".

O condensador de vidro pode ter diferentes dimensões, portanto, diferentes capacidades de condensação, conforme representação esquemática da figura 01, onde é possível observar os seguintes componentes e ou processos: a entrada de vapor alcoólico em (1) e entrada de água fria em (2), na sequência o vapor alcoólico entra em contato com os pratos de condensação de vidro (3), que por sua vez ficam encaixados no eixo central de vidro (4), em (5) observamos o tampo/base de cerâmica ou madeira com a saída de bebida destilada/cachaça (6) e em (7) a saída de água quente. O número (8) indica os tubos cilíndricos de vidro e em (9) e (10) tampo/base de cerâmica ou madeira. É também observado a área de circulação de água de condensação em (11) e os pratos de condensação de vidro em (12) assim como os tubos cilíndricos de vidro em (13), o furo de encaixe do eixo central de vidro (14), os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (15), o furo de encaixe dos pratos de condensação ao eixo central de vidro em (16) e os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (17).

Pela alta eficiência de condensação em função da grande superfície de contato, ocorre uma economia significativa de água de resfriamento.



**“PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA
OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS,
ESPECIALMENTE A CACHAÇA”**

5

Campo da Invenção

A presente invenção trata de um processo industrial de condensação durante a destilação de bebidas alcoólicas utilizando um condensador de vidro para obtenção de destilados alcoólicos isentos de íons metálicos, especialmente a cachaça.

Mais precisamente, a presente invenção visa à obtenção de um destilado isento
10 de íons metálicos através do uso de um condensador de vidro, que também apresenta um modelo original e o vidro como material de construção, ao contrário dos condensadores industriais convencionais construídos com metal (cobre, aço-inoxidável, etc) e que liberam íons metálicos (cobre, chumbo, arsênio, níquel, etc) na bebida final. O condensador de vidro não libera íons metálicos durante a condensação no processo de
15 destilação de bebidas alcoólicas, especialmente a cachaça.

Os componentes das bebidas alcoólicas destiladas, como a cachaça, classificados como secundários constituem um grupo de produtos minoritários oriundos do processo de fermentação e separados durante a destilação, tais como álcoois superiores, álcool metílico, ésteres, aldeídos, íons metálicos (cobre, níquel, chumbo, estanho, etc), e
20 outros, e são substâncias que podem contribuir não só na definição do aroma e sabor, mas na formação de aspectos toxicologicamente nocivos dos destilados em geral (Schaw et al., 2001; Aresta et al., 2001; Aquarone et al., 1983; Valsechi, 1960).

Entre as diversas marcas comerciais de bebidas destiladas, especialmente a cachaça, as quantidades verificadas desses compostos variam muito devido à condução da fermentação e destilação, ultrapassando, em alguns casos, os níveis permitidos pelo Decreto nº 42.644, de 5 de junho de 2002 do Ministério da Agricultura Pecuária e
5 Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2002). Tal variação, por conseguinte, faz surgir à necessidade de controle físico-químico do processo de fabricação da aguardente, especialmente os íons metálicos, que são considerados altamente tóxicos e cumulativos nos sistema biológicos (Aquino et al., 2006; Cerdán et al., 2002; Piggott et al., 2007).

A maior fonte de íons metálicos nas bebidas destiladas são os condensadores
10 utilizados durante o processo de destilação e que são fabricados especialmente em cobre, aço-carbono ou ainda aço-inoxidável (alto custo). Entretanto, além de serem fabricados com metais, as soldas metálicas nas juntas destes equipamentos são feitas com uma liga metálica que possui altos teores de diferentes metais pesados, ou seja, um altamente tóxicos. Portanto, quando a bebida destilada passa pelo condensador, num
15 processo de destilação industrial, recebe esta carga pesada de íons metálicos.

Com o objetivo de produzir bebidas, como a cachaça, com melhor rendimento e padrão de consumo, foram desenvolvidos estudos e análises, que demonstraram resposta positiva e significativa frente ao uso do condensador de vidro na obtenção de destilados isentos de metais pesados em escala industrial. Além disso, o modelo do condensador e
20 o material (vidro) utilizado na construção deste condensador não foram observados até o presente momento na literatura, portanto, entendemos que trata-se de uma inovação tecnológica.

Histórico da Invenção

O processo de fabricação de bebidas alcoólicas destiladas, especialmente a produção de aguardentes e/ou cachaças a bastante tempo vem sendo estudado e tem os seus princípios e fundamentos já bem esclarecidos. Neste sentido, a literatura científica tem demonstrado a presença de alguns metais pesados (Al, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Sn, Fe, Li, Mg, Mn, Hg, Ni, K, Na e Zn) na cachaça. Estes metais pesados podem ter uma origem do substrato utilizado na fermentação e/ou do método utilizado na fabricação da cachaça (Pinto et al., 2005).

Dentre os metais pesados, a presença de cobre (Cu) é importante durante o processo de produção da cachaça, desde que ele catalise reações onde componentes indesejáveis são removidos. Entretanto, a maioria dos processos de destilação são muito primitivos, o que não evita a presença de Cu no produto final. Dependendo da concentração, este metal pode causar vômitos, irritação gastrintestinal, diarreia, convulsões e sérias disfunções hepáticas. O cobre é o único metal cuja concentração é controlada pela legislação brasileira, que situa-se em um limite de 5mg/L. Zinco (Zn) em concentração maior que 5mg/L pode causar depressão do sistema imunológico e sintomas gástricos (Pinto et al., 2005). Os demais metais pesados não são controlados pela atual legislação brasileira de bebidas.

Por este motivo, uma concentração de metais pesados além do permitido pela legislação brasileira, entre 10 e 20% das frações inicial e final da destilação da cachaça são inapropriados para o consumo e portanto são descartados. Um dos fatores mais

determinante para a presença destes íons indesejáveis, no produto final, ou seja, na cachaça é a utilização dos antigos sistemas de condensação.

Foi pensando em uma maior qualidade do produto final assim como no não descarte de parte da produção da cachaça é que foi desenvolvido o “**PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE A CACHAÇA**”, podendo o mesmo processo ser utilizado na fabricação de qualquer outro tipo de bebida destilada.

10

Estado da Arte

Os processos de destilação atualmente existentes não são caracterizados pela isenção de metais pesados em sua composição, tais como cobre, níquel, chumbo e níquel. Existem ainda, condensadores que são fabricados em aço inox (paredes e tubos internos) e com fundo de cobre (BR MU 8502955-6 U de 2005) ou todo o condensador produzido em aço inox (BR MU 8501979-8 U de 2005) e destilaria de álcool etílico hidratado de vidro para fins didático (BR MU 6301401 U de 1983).

Com anteriormente destacado, estes íons metálicos, presentes em destilados, são os responsáveis por efeitos negativos (toxicológicos) da ingestão da bebida. O cobre e chumbo, sobretudo podem ser os maiores responsáveis por distúrbios fisiológicos provenientes do consumo de produtos de baixa qualidade e/ou em excesso (Bogden & Klevay, 2000; Pigott, 1999).

20

Buscando aperfeiçoar a produção de diversos tipos de bebidas destiladas, principalmente da cachaça, foi desenvolvido um condensador de vidro.

A aplicação do condensador de vidro na produção de destilados, principalmente de cachaça, surgiu em resposta a verificação de isenção de metais pesados na cachaça, ou seja, pelo fato destes metais não serem “arrastados” ou removidos pelo destilado durante a condensação da bebida.

Assim, objetivamente, a presente invenção consiste em submeter destilados; oriundos de coluna, ou destilada em coluna de retificação, ou em alambique, destilada em alambique de cobre e/ou aço inoxidável; em condensadores de vidro e obter bebidas isentas de metais pesados tóxicos.

Além disso, em função dos altos teores de metais pesados presentes na fração inicial (cabeça) da destilação em alambiques de cobre e/ou aço inoxidável, esta fração é descartada por motivo toxicológico. A utilização deste método pode possibilitar a isenção destes congêneres nesta fração inicial, tornando-a com teores adequados para consumo de acordo com a legislação de bebidas brasileiras. Portanto, o aproveitamento desta fração (cabeça), anteriormente descartada, pode ainda aumentar o rendimento industrial em até 20%. Além disso, a obtenção de destilados isentos de íons metálicos torna-se desnecessário o uso de filtros de troca catiônica ou similares usualmente utilizados nas indústrias de bebidas destiladas.

Descrição Resumida da Invenção

O condensador de vidro pode ter diferentes dimensões, portanto, diferentes capacidades de condensação e se posicionará ao lado do destilador, ou seja, o vapor alcoólico oriundo do destilador deslocará no tubo de vidro cilíndrico interno do
5 condensador que contém inúmeros pratos de condensação (grande superfície de contato para condensação), e será resfriado por água fria corrente (tubo cilíndrico externo), conforme representação esquemática da figura 01.

Pela alta eficiência de condensação em função da grande superfície de contato, ocorre uma economia significativa de água de resfriamento comparado aos outros
10 sistemas de condensação. Além disso, trata-se de um modelo industrial bem mais barato comparado aos modelos convencionais e, sobretudo dispensa recursos humanos especializados na fabricação e uso deste equipamento.

Não foi encontrado informações de inovação tecnológica na produção industrial de bebidas destiladas isentas de metais pesados, não foi encontrado condensadores de
15 vidro para produção industrial de bebidas destiladas e tampouco o modelo original do condensador de vidro. Assim como há aplicação e conjugação dos princípios e equipamentos já conhecidos, mas com resultados novos; como a condensação de bebidas destiladas isentas de metais pesados em condensador de vidro; é completamente diferente do que se encontra nos atuais métodos e técnicas de condensação durante a
20 destilação.

Citação das Figuras (caso houver)

A figura 01 ilustra o modelo do condensador de vidro e é apresentada com o intuito de melhorar o entendimento sobre a tecnologia desenvolvida.

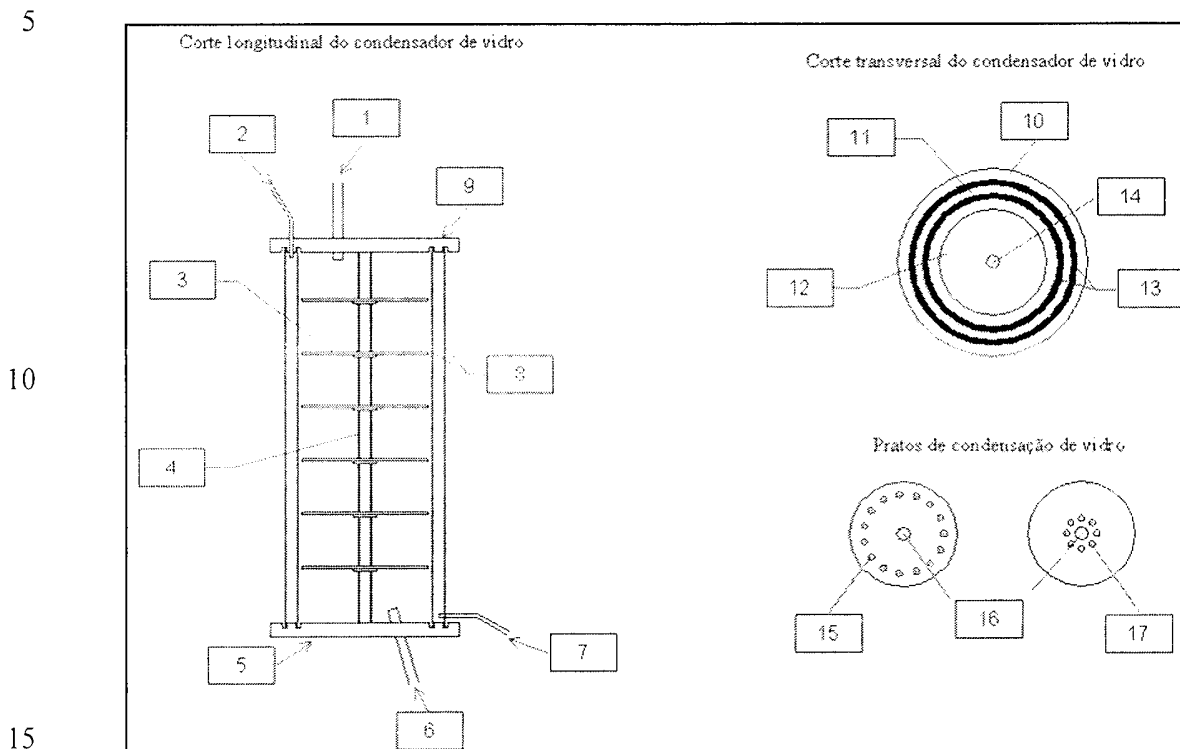


Figura 01. Modelo esquemático do condensador de vidro. A numeração indica os principais componentes do condensador de vidro.

20

Em um corte longitudinal do condensador de vidro podemos observar os seguintes componentes: a entrada de vapor alcoólico em (1) e entrada de água fria em (2), na sequência o vapor alcoólico entra em contato com os pratos de condensação de vidro (3), que por sua vez ficam encaixados no eixo central de vidro (4), em (5) observamos o tampo/base de cerâmica ou madeira com a saída de bebida destilada/cachaça (6) e em (7) a saída de água quente. O número (8) indica os tubos cilíndricos de vidro e em (9) e (10) tampo / base de cerâmica ou madeira. Em um corte transversal do condensador de vidro é observado a área de circulação de água de

25

condensação em (11) e os pratos de condensação de vidro em (12) assim como os tubos cilíndricos de vidro em (13), o furo de encaixe do eixo central de vidro (14), os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (15), o furo de encaixe dos pratos de condensação ao eixo central de vidro em (16) e os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (17).

Descrição Detalhada da Invenção

O condensador de vidro pode ter diferentes dimensões, portanto, diferentes capacidades de condensação. Dessa forma, a representação esquemática citada no tópico anterior pode ser diminuída ou ampliada de acordo com a necessidade de condensação da solução alcoólica.

O condensador de vidro se posicionará ao lado do destilador, ou seja, o vapor alcoólico oriundo do destilador deslocará no tubo de vidro cilíndrico interno do condensador que contém inúmeros pratos de condensação (grande superfície de contato para condensação), e será resfriado por água fria corrente (tubo cilíndrico externo), conforme representação esquemática.

Será possível observar os seguintes componentes e ou processos: a entrada de vapor alcoólico em (1) e entrada de água fria em (2), na sequência o vapor alcoólico entra em contato com os pratos de condensação de vidro (3), que por sua vez ficam encaixados no eixo central de vidro (4), em (5) observamos o tampo/base de cerâmica ou madeira com a saída de bebida destilada/cachaça (6) e em (7) a saída de água quente. O número (8) indica os tubos cilíndricos de vidro e em (9) e (10) tampo / base de cerâmica ou madeira. É também observado a área de circulação de água de condensação em (11) e os pratos de condensação de vidro em (12) assim como os tubos cilíndricos de

vidro em (13), o furo de encaixe do eixo central de vidro (14), os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (15), o furo de encaixe dos pratos de condensação ao eixo central de vidro em (16) e os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (17).

5 Pela alta eficiência de condensação em função da grande superfície de contato, ocorre uma economia significativa de água de resfriamento. Além disso, trata-se de um modelo industrial barato comparado aos modelos convencionais e, sobretudo dispensa recursos humanos especializados na fabricação e uso deste equipamento.

10 Não foi encontrado informações de inovação tecnológica na produção industrial de bebidas destiladas isentas de metais pesados, não foi encontrado condensadores de vidro para produção industrial de bebidas destiladas e tampouco o modelo original do condensador de vidro. Assim como há aplicação e conjugação dos princípios e equipamentos já conhecidos, mas com resultados novos; como a condensação de bebidas destiladas isentas de metais pesados em condensador de vidro;
15 é completamente diferente do que se encontra nos atuais métodos e técnicas de condensação durante a destilação.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE A CACHAÇA”), caracterizado pela

5 entrada de vapor alcoólico em (1) e entrada de água fria em (2), na sequência o vapor alcoólico entra em contato com os pratos de condensação de vidro (3), que por sua vez ficam encaixados no eixo central de vidro (4), em (5) observamos o tampo/base de cerâmica ou madeira com a saída de bebida destilada/cachaça (6) e em (7) a saída de água quente. O número (8) indica os tubos cilíndricos de vidro e em (9) e (10) tampo /

10 base de cerâmica ou madeira. É também observado a área de circulação de água de condensação em (11) e os pratos de condensação de vidro em (12) assim como os tubos cilíndricos de vidro em (13), o furo de encaixe do eixo central de vidro (14), os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (15), o furo de encaixe dos pratos de condensação ao eixo central de vidro em (16) e os furos de escape do vapor alcoólico

15 condensado em (17).

2. “PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE A CACHAÇA”), de acordo com a

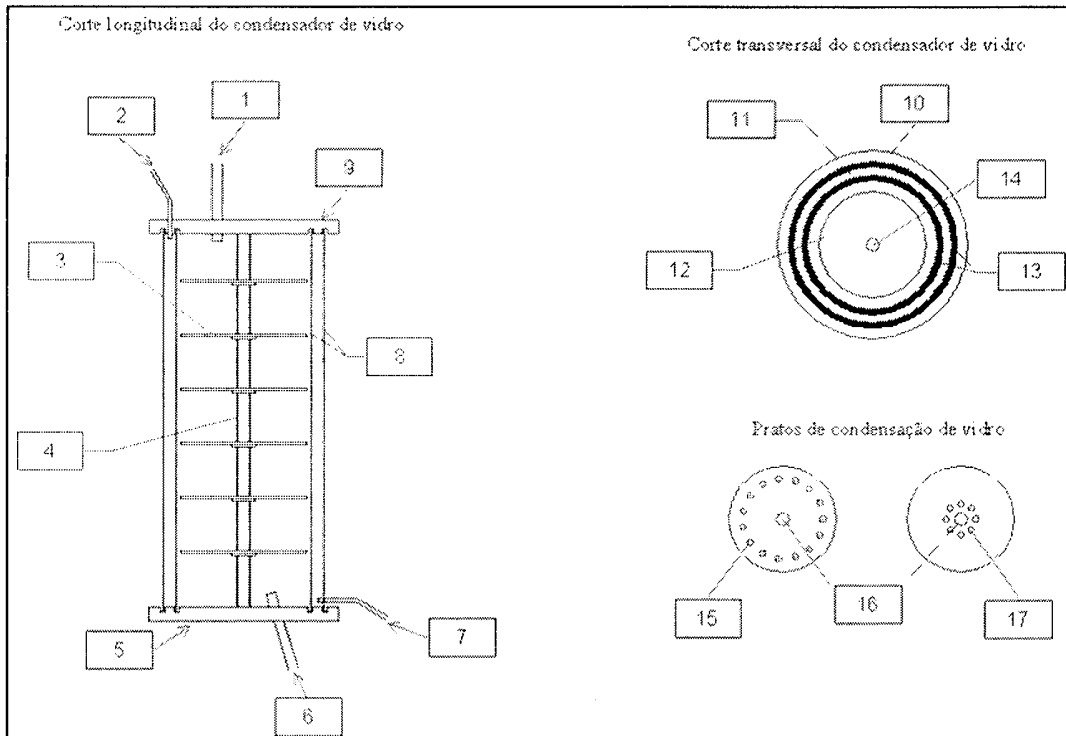
20 reivindicação deste documento, o condensador de vidro aqui caracterizado como sendo a melhor opção para o processo de obtenção de destilado alcoólico isento de metais pesados especialmente a cachaça.

3. “PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS, ESPECIALMENTE A CACHAÇA”), caracterizado por seus componentes, ou a maior parte destes, serem de um material neutro a corrosão provinda
- 5 de alcoóis, ou seja, o vidro.

RESUMO**“PROCESSO INDUSTRIAL DE USO DE CONDENSADOR DE VIDRO PARA
OBTENÇÃO DE DESTILADO ALCÓOLICO ISENTO DE METAIS PESADOS,
ESPECIALMENTE A CACHAÇA”**

5 O condensador de vidro pode ter diferentes dimensões, portanto, diferentes
capacidades de condensação, conforme representação esquemática da figura 01, onde é
possível observar os seguintes componentes e ou processos: a entrada de vapor
alcoólico em (1) e entrada de água fria em (2), na sequência o vapor alcoólico entra em
contato com os pratos de condensação de vidro (3), que por sua vez ficam encaixados
10 no eixo central de vidro (4), em (5) observamos o tampo/base de cerâmica ou madeira
com a saída de bebida destilada/cachaça (6) e em (7) a saída de água quente. O número
(8) indica os tubos cilíndricos de vidro e em (9) e (10) tampo / base de cerâmica ou
madeira. É também observado a área de circulação de água de condensação em (11) e os
pratos de condensação de vidro em (12) assim como os tubos cilíndricos de vidro em
15 (13), o furo de encaixe do eixo central de vidro (14), os furos de escape do vapor
alcoólico condensado em (15), o furo de encaixe dos pratos de condensação ao eixo
central de vidro em (16) e os furos de escape do vapor alcoólico condensado em (17).
Pela alta eficiência de condensação em função da grande superfície de contato, ocorre
uma economia significativa de água de resfriamento.

Figura 1



ANEXO – II

VIABILIDADE FINANCEIRA DO PROJETO:

1. PITCH
2. PLANO DE NEGÓCIOS

Processo Físico-Químico-Mecânico de Digestão e Peletização de Cama de Aviário

GUSTAVO RAMOS DE OLIVEIRA

E-mail: guraoliver@gmail.com

(61) 9943-6760 (61) 8109-5283

DESCRIÇÃO DO NEGOCIO

- Empresa focada no segmento de biotecnologia;
- Nasceu em 2009, a partir de trabalho de pesquisa desenvolvido na UFPR e Embrapa, apoiado pela Goiás Óleos (razão social da Fertivita);
- Iniciou operação em Agosto de 2010 e concluiu o primeiro ano com R\$ 300 Mil de faturamento com a venda de fertilizantes;
- Possui Planta Piloto/Unidade Vitrine em Formosa-GO, com capacidade de produção 5 toneladas/hora;
- Está implementando a 1ª Unidade licenciada em Toledo – PR (capacidade de 10 ton/hora);
- Fornece, na modalidade “Turn-Key”, plantas industriais com a Tecnologia Fertivita de Compostagem Acelerada e Peletização para investidores locais, desta forma transformando resíduos orgânicos em fertilizante de alto valor agregado.

TECNOLOGIA, PRODUTOS E SERVIÇOS

- Processo Industrial, Automatizado e Patenteado;
- Inédita tecnologia de compostagem: Fertivita (1:30 hr) x Convencional (30-180 dias);
- Inédita tecnologia de peletização da matéria orgânica compostada à parte mineral (NPK). Este fator facilita o uso do fertilizante por implementos agrícolas, tais como plantadeiras;
- Fertilizantes mais eficientes, livre de fitopatógenos, com maior produtividade na lavoura e com aproveitamento de resíduos agroindustriais;
- Atende as orientações da nova Lei de Resíduos Sólidos;
- O Processo Fertivita trata e transforma resíduos orgânicos da cadeia produtiva de aves e suínos, em fertilizante orgânico e organomineral de alto valor agregado, desta forma converte despesas + passivo ambiental → em receita + sustentabilidade;
- Licenciamento da Tecnologia Fertivita e Comercialização de fertilizantes orgânicos e organominerais.

MERCADO E CONCORRÊNCIA

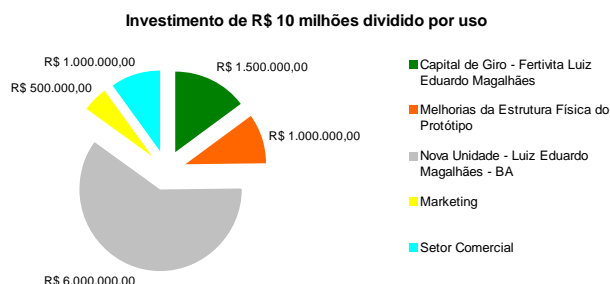
Mercado de Duas Facetas

- Planta Industrial: + de 700 Abatedouros, + de 500 mil Granjas e Investidores locais. Sendo os concorrentes, empresas que fazem compostagem no modelo convencional e aterros sanitários que recebem por tonelada tratada;
- Consumidor de fertilizantes: consumiu 24,5 milhões/ton/2010. A Fertivita delineou o seu Mercado Potencial a estabelecimentos agropecuários maiores de 1000 hectares, que possuem orientação técnica e utilizam fertilizantes, desta forma pelo último Censo Agropecuário do ano de 2006 são mais de 20 mil hectares (+ de 9 milhões/ton/ano). A Fertivita tem entre seus objetivos comercializar 350 mil/ton/ano (3,8% do seu Mercado Potencial).

ESTRATÉGIA COMERCIAL E DE MARKETING

- Mapear as grandes empresas geradoras de resíduos;
- Ofertar plantas industriais com a Tecnologia Fertivita de Compostagem Acelerada e Peletização, desta forma licenciando a tecnologia. Este modelo permite a abertura de novas fábricas sem que a Fertivita imobilize capital nesta etapa do empreendimento;
- Comercializar fertilizantes com outras fábricas de fertilizantes orgânicos e organominerais, e também pela venda direta aos consumidores através de força de venda técnica.

INVESTIMENTOS



PROJEÇÕES FINANCEIRAS

RESUMO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE VIABILIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE

Por Unidade Instalada	Análise de sensibilidade				
	Preço	-10%	0%	10%	0%
Quantidade = 75.000/ano	0%	-10%	0%	10%	10%
INVESTIMENTO TOTAL = R\$	17.670.074	75.000	75.000	67.500	75.000
82.500					
INFORMAÇÕES ANUAIS					
	ANO I	CENÁRIO I	CENÁRIO II	CENÁRIO III	CENÁRIO IV
RECEITA TOTAL	27.844.320	25.059.888	25.060.860	30.628.752	30.628.410
CUSTO TOTAL	22.350.035	22.238.658	20.384.954	22.461.412	24.315.141
CUSTO FIXO	1.954.931	1.927.087	1.927.096	1.982.775	1.982.772
CUSTO VARIÁVEL	20.395.104	20.311.571	18.457.858	20.478.637	22.332.369
DEPRECIÇÃO	514.257	514.257	514.257	514.257	514.257
LUCRO TRIBUTÁVEL	5.494.285	2.821.230	4.675.906	8.167.340	6.313.269
IRPJ + CSLL	1.844.057	935.218	1.565.808	2.752.896	2.122.511
LUCRO LÍQUIDO	3.650.228	1.886.012	3.110.098	5.414.444	4.190.758
CAPACIDADE DE PAGAMENTO (Líquida ou escritural)	4.164.485	2.400.269	3.624.355	5.928.701	4.705.015
PRAZO DE RETORNO DO INVESTIMENTO (PRI) - Anos	6,11	10,87	7,12	4,40	5,42
RENTABILIDADE ANO =	20,66%	10,67%	17,60%	30,64%	23,72%
LUCRATIVIDADE ANO =	13,11%	7,53%	12,41%	17,68%	13,68%
PONTO DE NIVELAMENTO	26,24	40,58%	29,19%	19,53%	23,90%
TAXA INTERNA DE RETORNO (TIR) =	24,62%	11,17%	20,68%	36,71%	28,44%
VALOR PRESENTE LÍQUIDO (VPL) = R\$	13.236.183	372.567	9.277.990	26.099.798	17.193.807
Obs: Taxa de remuneração do capital investido e de custo =	10,75%				

EQUIPE

Flávio Rogério do Silva, Empreendedor. Engenheiro Agrônomo. Empresário do Agronegócio e da Construção Civil.

Gustavo Ramos de Oliveira, Empreendedor. Biólogo. Mestre em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS. Doutorando em Processos Biotecnológicos pela UFPR.

José Ricardo da Silva, Empreendedor. Advogado. Consultor Financeiro de Tecnologias. Empresário do Agronegócio.

Maria Fátima Grossi de Sa, Empreendedora. Biomédica. Mestre em Biologia pela UnB. Doutora em Ciências pela Universidade de Paris. Tem três pós-doutorados fora do Brasil.

Paulo Cortez, Empreendedor. Advogado. Contador. Consultor Financeiro e Fiscal. Empresário do Agronegócio. empresa a partir de 2009.

Processo Físico-Químico-Mecânico de Digestão e Peletização de Cama de Aviário

GUSTAVO RAMOS DE OLIVEIRA

E-mail: guraoliver@gmail.com

(61) 9943-6760 (61) 8109-5283

1. Sumário Executivo

Descrição do Negócio: a Fervita Fertilizante Organomineral foi fundada há oito anos com a razão social Goiás Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda e atuava no setor de produção e comercialização de óleos vegetais de soja e algodão. Há dois anos teve início o projeto de pesquisa com resíduos da avicultura e suinocultura, objetivando transformar resíduos, considerados um passivo ambiental altamente negativo, em fertilizante organomineral e orgânico de alto valor comercial. Com as novas oportunidades de licenciamento da tecnologia patenteada, a empresa constituiu em 2011 a Holding Fervita, que tem como atribuição a gestão das demais empresas licenciadas para utilizar a tecnologia Fervita. A empresa tem como **missão** inovar, produzir e comercializar fertilizantes organominerais e orgânicos utilizando como matéria-prima, resíduos agroindustriais atuando como uma tecnologia catalisadora em renovação ambiental e da matriz agroenergética.

Visão da Empresa: a Fervita busca atender uma parcela do crescente mercado de fertilizantes e a necessidade por novas tecnologias eficientes no tratamento de resíduos sólidos, para tanto busca transformar resíduos da cadeia produtiva, que até então eram considerados um passivo ambiental altamente negativo, em fertilizante organomineral e orgânico de alto valor agregado, promovendo a sustentabilidade e novos negócios à cadeia produtiva de aves e suínos. A empresa acredita no potencial do Brasil para o agronegócio e projeta o seu futuro no desenvolvimento sustentável deste setor.

Produtos, Serviços e Tecnologia: a tecnologia Fervita acelera a compostagem de matéria orgânica para 1 hora e 30 minutos, sendo o processo convencional de 30 a 180 dias, e também peletiza no mesmo grão de fertilizante a matéria orgânica + NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) + Micronutrientes, este fator é importante para a utilização do fertilizante por equipamentos agrícolas. Os produtos obtidos com a Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização são fertilizantes organominerais e orgânicos com características agrônomicas melhoradas, que pode ser empregado na agricultura de pequenas, médias e/ou de grandes propriedades. Com a tecnologia Fervita, as granjas de aves e suínos poderão dar uma destinação ambiental/economicamente correta para um subproduto da sua cadeia produtiva (os esterco), ao mesmo tempo, os abatedouros de animais passarão a ter disponível, uma tecnologia com a capacidade de processamento e higienização dos resíduos de vísceras e lodos. O que existe atualmente são algumas tecnologias que empregam microorganismos no processamento dos resíduos, como por exemplo, fungos que podem ser utilizados para acelerar o processo de compostagem, porém os resultados são bastante inferiores do que aqueles obtidos com a tecnologia Fervita e o tempo para obtenção do produto, no processo convencional é de 30 a 180 dias.

Mercado e Concorrência dos Fertilizantes: o mercado atual de fertilizantes no Brasil é de 24,5 milhões de toneladas/ano (ANDA, 2010) sendo o setor de fertilizantes uma questão estratégica para o país que importa 60% do que consome de fertilizantes, pela sua condição de maior importador mundial deste insumo e pela sua economia ser baseado no agronegócio, responsável por 37% do PIB de 2009. Como estratégia, a Fervita delineou

o seu Mercado Potencial a estabelecimentos agropecuários maiores do que 1000 hectares, com orientação técnica e que utilizem fertilizantes, obtendo desta forma o número de 20.308 clientes alvo.

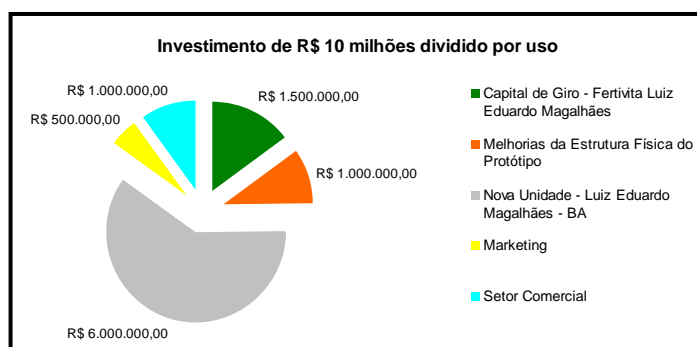
Estratégia Comercial e Marketing: como estratégia comercial, a Fertivita projeta licenciar fábricas com a Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização para os abatedouros de animais e/ou associações e/ou cooperativas e/ou investidores locais. Estas Unidades de tratamento de resíduos passam a ter como produto um fertilizante orgânico e/ou organomineral e este produto será comercializado no mercado. Sendo os seguintes pontos estratégicos:

- Mapear as grandes empresas geradoras de resíduos;
- Ofertar plantas industriais com a Tecnologia Fertivita de Compostagem Acelerada e Peletização;
- Comercialização de fertilizantes, que poderá ser comercializado diretamente com outras fábricas de fertilizantes orgânicos e organominerais, e também pela venda direta aos consumidores através de força de venda técnica.

As maiores empresas do setor de fertilizantes são a Heringer (17,5%), Vale (15,2%) e Bunge Fertilizantes, estas três empresas juntas somam mais de 50% do mercado de fertilizantes no Brasil e são elas, juntamente com a Petrobras, as maiores empresas fornecedoras internas de fertilizantes básicos e intermediários, que são utilizados na produção das fórmulas comerciais vendidas ao consumidor final. Adicionalmente, estas Companhias oferecem serviços de valor agregado a seus clientes, tais como programas de análise de solo, demonstrações e palestras técnicas, suporte pré e pós-venda, e orientação técnica e especializada.

A Fertivita julga como sendo essencial a sua participação em feiras e eventos agropecuários, também a realização de propagandas em sistemas de comunicação, para tal abordagem se faz necessário a contratação de uma empresa que já esteja segmentada no ramo de desenvolvimento de estratégias para o agronegócio, e a “abertura de campo” como é dito no meio agropecuário, onde um vendedor vinculado a uma empresa que representa a marca trabalha e faz a divulgação pessoalmente junto a produtores formadores de opinião ou um vendedor contratado pela Fertivita faz esta divulgação. Justifica-se também a contratação de um Diretor Comercial com o perfil de experiência em posição de gerência e/ou diretoria comercializando insumos agropecuários tais como fertilizantes, inoculantes e afins. Vivência em liderança em projetos corporativos, departamentais, gestão de equipes, relacionamentos de alto nível com o mercado de revendedores e distribuidores.

Investimento Pretendido: a Fertivita busca o investidor para capitalizar o negócio. O investimento será utilizado como: capital de giro; na melhoria da capacidade de produção e das instalações civis de escritório e mobiliário da Unidade Vitrine de Formosa; Construção da Nova Unidade – Luiz Eduardo Magalhães –BA e para o desenvolvimento do setor comercial e de marketing da Fertivita. Para tanto serão necessários R\$ 10 milhões.



Projeções Financeiras

RESUMO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE VIABILIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE

		Análise de sensibilidade				
		-10%	0%	10%	0%	
INVESTIMENTO TOTAL = R\$	17.670.074					
INFORMAÇÕES ANUAIS		ANO I	CENÁRIO I	CENÁRIO II	CENÁRIO III	CENÁRIO IV
RECEITA TOTAL		27.844.320	25.059.888	25.060.860	30.628.752	30.628.410
CUSTO TOTAL		22.350.035	22.238.658	20.384.954	22.461.412	24.315.141
CUSTO FIXO		1.954.931	1.927.087	1.927.096	1.982.775	1.982.772
CUSTO VARIÁVEL		20.395.104	20.311.571	18.457.858	20.478.637	22.332.369
DEPRECIÇÃO		514.257	514.257	514.257	514.257	514.257
LUCRO TRIBUTÁVEL		5.494.285	2.821.230	4.675.906	8.167.340	6.313.269
IRPJ + CSLL		1.844.057	935.218	1.565.808	2.752.896	2.122.511
LUCRO LÍQUIDO		3.650.228	1.886.012	3.110.098	5.414.444	4.190.758
CAPACIDADE DE PAGAMENTO (Líquida ou escritural)		4.164.485	2.400.269	3.624.355	5.928.701	4.705.015
PRAZO DE RETORNO DO INVESTIMENTO (PRI) - Anos		6,11	10,87	7,12	4,40	5,42
RENTABILIDADE ANO =		20,66%	10,67%	17,60%	30,64%	23,72%
LUCRATIVIDADE ANO =		13,11%	7,53%	12,41%	17,68%	13,68%
PONTO DE NIVELAMENTO		26,24	40,58%	29,19%	19,53%	23,90%
TAXA INTERNA DE RETORNO (TIR) =		24,62%	11,17%	20,68%	36,71%	28,44%
VALOR PRESENTE LÍQUIDO (VPL) = R\$		13.236.183	372.567	9.277.990	26.099.798	17.193.807

Obs: Taxa de remuneração do capital investido e de custeio = 10,75%

Equipe: a empresa é constituída por sócios com experiência em pesquisa/tecnologia e na área empresarial.

Flávio Rogério do Silva, Empreendedor. Engenheiro Agrônomo. Empresário do Agronegócio e da Construção Civil.

Teve ingresso na Fervita a 2 anos passando a fazer parte do Capital Societário da empresa a partir de 2009;

Gustavo Ramos de Oliveira, Diretor de Prospecção de Novos Negócios. Empreendedor. Biólogo. Mestre em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS. Doutorando em Processos Biotecnológicos pela UFPR, tem três prêmios como pesquisador. Diretor da empresa DIAGENE kits diagnósticos, empresa esta que atua no mercado de produção de tecnologia Brasileira de Kits de Diagnóstico de interesse para a agricultura Brasileira e mundial. Possui quatro artigos científicos publicados em revistas internacionais e duas patentes. Teve ingresso na Fervita como consultor técnico a 2 anos passando a fazer parte do Capital Societário da empresa a partir de 2011;

José Ricardo da Silva, Advogado. Consultor Financeiro e de Tecnologias. Empresário do Agronegócio. Teve ingresso na Fervita a 2 anos passando a fazer parte do Capital Societário da empresa a partir de 2009;

Maria Fátima Grossi de Sa, Vice-Diretora de Tecnologia. Biomédica. Mestre em Biologia pela UnB. Doutora em Ciências pela Universidade de Paris. Tem três pós-doutorados fora do Brasil. Atualmente é Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Diretora Presidente da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, Diretora de Tecnologia da empresa DIAGENE kits diagnósticos, empresa esta que atua no mercado de produção de tecnologia Brasileira de Kits de Diagnóstico de interesse para a agricultura Brasileira e mundial, Professora da UCB, Professora Colaboradora da UFRGS, UFPR, UFRN, UnB, Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior da CAPES. Possui mais de 110 artigos científicos publicados em revistas internacionais, 13 capítulos de livros e nove patentes. Teve ingresso na Fervita como consultora técnica a 2 anos passando a fazer parte do Capital Societário da empresa a partir de 2010;

Paulo Cortez, Advogado. Contador. Consultor Financeiro e Fiscal. Empresário do Agronegócio. Teve ingresso na Fervita a 2 anos passando a fazer parte do Capital Societário da empresa a partir de 2009;

2. O Produto/Serviço

2.1 Características: com a implementação da Tecnologia Fertivita de Compostagem Acelerada e Peletização é possível o Brasil diminuir sensivelmente sua dependência dos fertilizantes dos mercados externos e transformar um passivo ambiental em um negócio sustentável e altamente rentável. Sendo duas as opções de ação da empresa:

1ª comercialização de fertilizantes organominerais e/ou orgânicos melhorados e com preço competitivo;

2ª e o licenciamento da Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização.

Sendo os seguintes pontos estratégicos:

- Processo Industrial, Automatizado e Patenteado;
- Inédita tecnologia de compostagem: Fertivita (1:30 hr) x Convencional (30-180 dias);
- Inédita tecnologia de peletização da matéria orgânica compostada à parte mineral (NPK). Este fator facilita o uso do fertilizante por implementos agrícolas, tais como plantadeiras;
- Fertilizantes mais eficientes, livre de fitopatógenos, com maior produtividade na lavoura e com aproveitamento de resíduos agroindustriais;
- Atende as orientações da nova Lei de Resíduos Sólidos;
- O Processo Fertivita trata e transforma resíduos orgânicos da cadeia produtiva de aves e suínos, em fertilizante orgânico e organomineral de alto valor agregado, desta forma converte despesas + passivo ambiental em receita + sustentabilidade;
- E o licenciamento da Tecnologia Fertivita.

2.2 Diferencial Tecnológico: a tecnologia Fertivita de compostagem é inovadora e única nos seguintes pontos:

- Diminuição do tempo de compostagem de 30-180 dias (processo convencional) para 1 hora e 30 minutos;
- Peletização da parte orgânica compostada a mineral, este fator é imprescindível para a devida aplicação nas grandes culturas, tais como soja, milho, feijão, e todas que dependem de implementos agrícolas como plantadeiras;
- Diminuição do uso de água. No processo de compostagem Fertivita não é utilizado água, a mesma só é utilizada pela estrutura física e por alguns maquinários;
- Como os fertilizantes organominerais Fertivita unem as características positivas das matérias orgânicas compostadas com as dos minerais faz deste, um produto diferenciado positivamente, pois restaura os solos mantendo a alta produtividade requerida pelo sistema agropecuário mundial. A literatura científica relata até 30% de aumento da produtividade quando fertilizantes organominerais são utilizados sistematicamente nas culturas e resultados obtidos em plantios comerciais com os fertilizantes Fertivita demonstram já no primeiro ano de uso, um aumento de 17% na produção de feijão e 20% para soja e milho;
- Não há lançamento de gases (exemplo: metano e CO₂) envolvidos no aquecimento do efeito estufa como ocorre na compostagem convencional;
- Elimina fitopatógenos e sementes de plantas daninhas que naturalmente estão presentes nas matérias orgânicas, tais como nematóides que são um grande problema para os solos Brasileiros, principalmente

pela dificuldade de ser controlado após infestação dos solos. Sendo este fator essencial para a liberação comercial de fertilizantes organominerais;

- E como foi desenvolvido um processo industrial automatizado as Unidades Industriais com a tecnologia Fervita terão capacidade de produzir de 75 mil toneladas de fertilizante organomineral por ano.

Atualmente o que temos no mercado são os fertilizantes minerais, mais utilizados no Brasil e no mundo, que são finitos e acarretam, a longo prazo, problemas para o solo (acidificação, desertificação, acaba com a microbiota necessária para o bom desenvolvimento dos vegetais, perda da capacidade de retenção de água, etc). Outro produto são os fertilizantes orgânicos provindos do processo convencional, caracterizado como método ultrapassado, e os fertilizantes organominerais não peletizados, ou seja, a parte orgânica e a mineral não estão juntas no mesmo grão e desta forma, acarreta uma deformidade na cultura e perda de produção.

Com o diferencial tecnológico, inovador e sustentável o Negócio Fervita vem se destacando e acaba de ter o seu Plano de Negócios premiado pela Federação das Indústrias do Estado do Paraná – FIEP, sendo mais um resultado do reconhecimento da sociedade pelos serviços e produtos que agregam valor econômico e social ao País.

2.3 Pesquisa e Desenvolvimento: toda empresa deve-se atentar para as mudanças que estão constantemente ocorrendo. E uma forma de preparar-se para o mercado é buscando inovação e novos produtos. Neste sentido, a equipe de pesquisadores da Fervita trabalha no aprimoramento dos produtos já comercializados e também no desenvolvimento de novos produtos e novas tecnologias. Atualmente dois novos projetos de pesquisa estão em andamento, visando desenvolver uma linha totalmente orgânica e biológica de fertilizantes, podendo assim atender um mercado que cresce 100% ao ano (mercado de produtos orgânicos).

3. O Mercado

3.1 Mercado primário

1. Clientes (Planta Industrial – licenciamento da tecnologia)

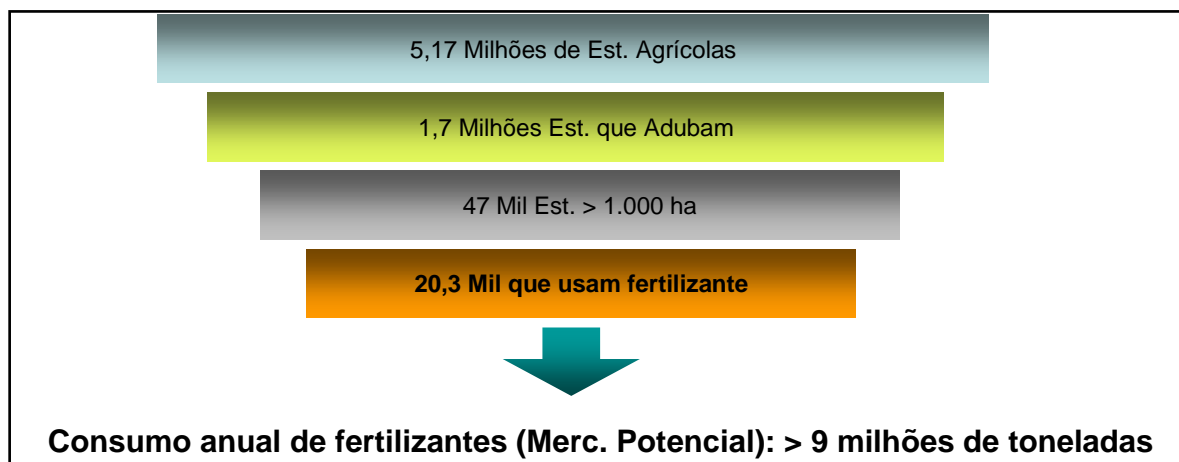
- ❖ Número de abatedouros segundo o MAPA 2010:
 - 180 de aves (+ 550 produção de ovos férteis);
 - 327 de ruminantes, equídeos e ovinos;
 - Suínos (não tem dados).
- ❖ Número de granjas segundo o Censo Agropecuário de 2006 do IBGE:
 - De aves e suínos = 576 109.
- ❖ Investidores Locais, Associações e/ou Cooperativas;

3.1.1 Concorrentes:

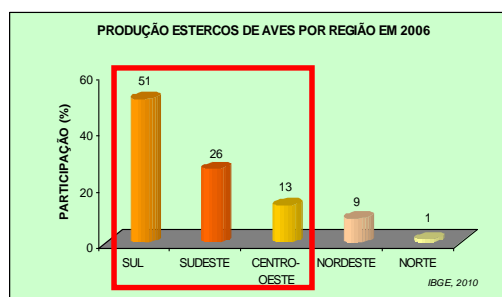
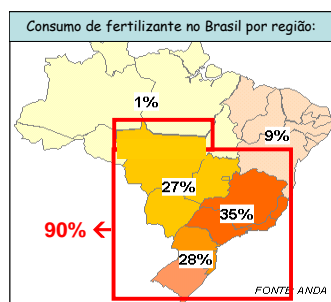
- Empresas que fazem compostagem tradicional (30 a 180 dias);
- Aterros sanitários (não aderentes à obrigação legal).

3.2 Mercado secundário

3.2.1 Clientes: Quem serão os clientes para a compra de fertilizantes? Como estratégia, a Fervita delineou o seu Mercado Potencial a estabelecimentos agropecuários maiores do que 1000 hectares, com orientação técnica e que utilizem fertilizantes, obtendo desta forma o número de 20.308 clientes alvo (IBGE, 2006).



Onde estão localizados? Uma característica do modelo de negócio proposto neste projeto é que o mercado consumidor fica próximo às regiões que mais produzem a matéria-prima principal dos fertilizantes Fervita, os esterços de aves e suínos, conforme demonstrado nos gráficos abaixo.



Quanto os clientes compram por ano? Atualmente o consumo de fertilizante no Brasil chega a 24,5 milhões de toneladas (ANDA, 2010). Sendo o Mercado Potencial Fervita um consumidor de mais de 9 milhões de toneladas/ano.

Quais são os fatores que influenciam na decisão de compra? Os fatores que mais importantes na venda de fertilizantes são: disponibilidade de crédito (este fator está diretamente ligado a liberação cadastral do cliente, bem como a financiamentos por parte do governo); qualidade do produto e preço de venda competitivo com o mercado. Mais fatores como prazo de entrega e atendimento pré e pós-venda também são importantes.

Dentro das condições de qualidade e preço, estes clientes estariam dispostos a comprar mais uma marca? E por que? Em um primeiro momento a Fervita definiu seus clientes, como sendo aqueles, que buscam alternativas mais produtivas e sustentáveis e é este cliente que será priorizado. O cliente de fertilizante no Brasil é constantemente “massacrado” pelas oscilações mercadológicas que o setor sofre, e passa por um momento de mudança de paradigmas em relação ao sistema atual de uso indiscriminado deste insumo agropecuário. Desta forma, este pode ser analisado como um bom momento para implementarmos este produto diferenciado.

3.2.2 Concorrentes: Quem são os principais concorrentes e o porte? As maiores empresas do setor são a Heringer (17,5%), Vale (15,2%) e Bunge Fertilizantes, estas três empresas juntas somam mais de 50% do mercado de fertilizantes no Brasil e são elas, juntamente com a Petrobras, as maiores empresas fornecedoras internas de fertilizantes básicos e intermediários, que são utilizados na produção das fórmulas comerciais vendidas ao consumidor final. Adicionalmente, estas Companhias oferecem serviços de valor agregado a seus clientes, tais como programas de análise de solo, demonstrações e palestras técnicas, suporte pré e pós-venda, e orientação técnica e especializada.

Onde estão localizadas? Atualmente as fábricas de fertilizantes se localizam próximas aos grandes centros de consumo deste insumo, um fator facilitador do frete, geralmente nas proximidades de cidades que concentram sua economia no setor agropecuário, como por exemplo, em Paranaguá – PR e Catalão – GO, entre inúmeras outras cidades.

Qual o preço de venda mínimo e máximo praticado pelo seu concorrente? O preço de venda da fórmula 4-14-8 por exemplo, varia de R\$ 650,00 a tonelada na entressafra (3-4 meses/ano) a R\$ 850,00 na época dos grandes plantios (4-5 meses/ano), que geralmente coincide com o período de início das chuvas de cada região, sendo o valor médio da tonelada negociado por aproximadamente R\$ 750,00. Já o fertilizante orgânico é comercializado entre R\$ 250,00 a R\$ 320,00 a tonelada.

Quais são os prazos de venda? O prazo neste setor é oferecido a clientes pré-cadastrados pelas empresas e são acompanhados de um acréscimo de 1 a 2% de juros/mês, em até 4 meses.

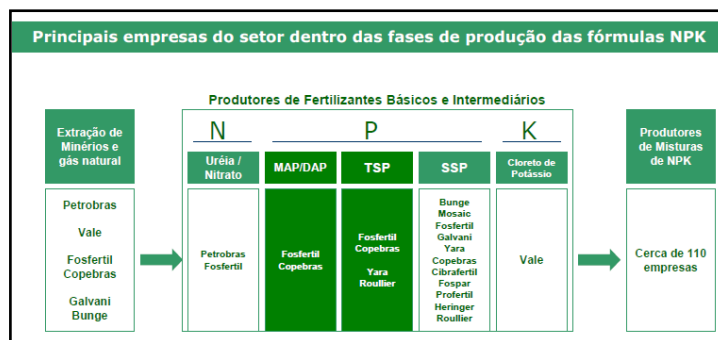
Qual é o sistema de vendas utilizado? As fábricas de fertilizantes repassam o produto para casas agropecuárias que vão fazer as vendas de varejo; a grandes compras e representam interesses de cooperados e/ou lojas cooperativas; ou diretamente a médios e grandes agropecuaristas. Também são montadas lojas de revendas da própria fabricante, como é o caso dos Adubos Araguaia, onde técnicos agrícolas prestam serviços de pré e pós-venda. Existem também empresas e/ou consultores especializados em “abrir o mercado”, ou seja, ir até os clientes formadores de opinião e apresentar o produto.

Quais são os pontos fortes das empresas concorrentes? As empresas que já estão estabelecidas no mercado contam com a confiança do consumidor que já vem a 40 anos utilizando as mesmas marcas de fertilizantes e já sabem o quanto vão colher (sem interferência das condições climáticas) se seguirem as recomendações do fabricante. Geralmente são os clientes que procuram as empresas com a intenção de comprar o produto.

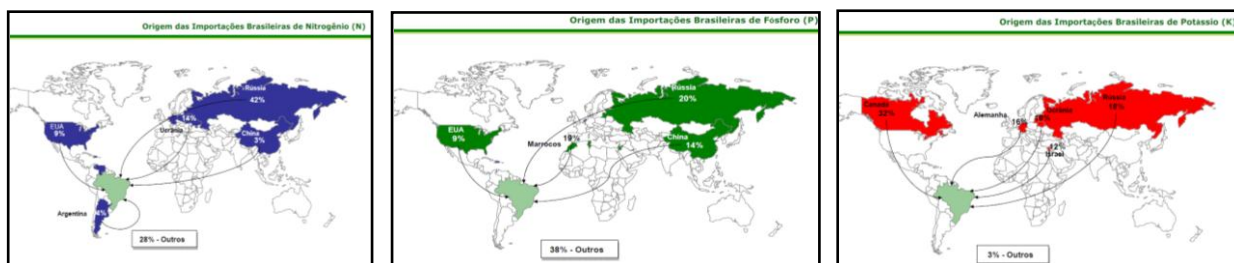
Quais são os pontos fracos? O maior ponto fraco das fábricas de fertilizantes minerais é a falta de inovação e de aperfeiçoamento dos produtos já existentes. O fertilizante mineral ao mesmo tempo em que fornece nutrientes para as plantas acidifica os solos, acarretando a dependência de doses de fertilizantes cada vez maiores, este ciclo promove no solo um processo conhecido e muito estudado chamado de desertificação, ou seja, morte de microorganismos essenciais para a manutenção da fertilidade do solo e conseqüentemente menor

desenvolvimento das plantas. Atualmente até 30% de cada quilo de fertilizante mineral é sílica (areia) que é adicionada para promover a diluição adequada dos minerais.

3.2.3 Fornecedores: Quem serão os principais fornecedores? Da matéria orgânica que compõe 50% da matéria-prima utilizada serão granjas de aves e/ou suínos. Já da parte mineral serão empresas como a Petrobras, Heringer, Vale e Bunge Fertilizantes, sendo que a maior parte é importada. Fonte da figura abaixo: site da Fosfértil, 2011.



Nos mapas abaixo mostrados apontam os países exportadores dos minerais (NPK):



Fonte: Site da Fosfértil, 2011.

Onde estão localizadas? As empresas fornecedoras de matérias-primas estão localizadas próximas aos grandes portos brasileiros, como por exemplo, no Porto de Paranaguá – PR e próximo às jazidas de minerais Brasileiras.

Quais são os prazos de pagamentos e formas de cobranças? Os pagamentos variam de acordo com a negociação, à vista tem-se o melhor preço ou a prazo, 40% entrada + 30% em 30 dias + 30% em 60 dias. As primeiras compras devem ser realizadas a vista e com cadastro previamente aprovado.

Exigem lote mínimo? Sim, é exigida a compra de lotes mínimos, mais existem empresas que trabalham com diferentes tamanhos de lotes, bem como a possibilidade de filiação a Associação de Misturadores de Fertilizantes onde são comercializadas menores quantidades de matéria-prima.

Qual o prazo médio de entrega? Geralmente o prazo médio de entrega fica entre 5 e 7 dias, podendo durante o período mais alto das vendas alcançar 20 dias para a entrega de algum dos minerais.

3.2.4 Participação no Mercado: As empresas Heringer (17,5%), Vale (15,2%) e Bunge Fertilizantes, estas três empresas juntas somam quase 50% do mercado de fertilizantes no Brasil e são elas, juntamente com a Petrobras,

as maiores fornecedoras dos minerais básicos e intermediários que compõem as fórmulas dos fertilizantes minerais e organominerais. No item 3.3, a figura mostra todas as empresas fornecedoras de matérias primas.

4. Capacidade Empresarial

4.1 A Empresa: na atual conjuntura inicial da Fervita, as funções de direção e tomadas de decisões são partilhadas entre os sócios, sendo algumas funções acumuladas por aquele mais apto a ocupá-las. Desta forma não ocorre a oneração nos estágios iniciais de implantação do negócio.

4.1.1 Definição da Empresa: a Fervita como empresa produtora de fertilizantes iniciou a comercialização de seus produtos nos últimos seis meses do ano de 2010. Apesar de ainda estar no estágio inicial mostra os primeiros indicativos de seu grande potencial em produzir e comercializar fertilizantes.

4.1.2 Missão: a Fervita tem como **missão** inovar, produzir e comercializar fertilizantes organominerais e orgânicos utilizando como matéria-prima, resíduos agroindustriais atuando como uma tecnologia catalisadora em renovação ambiental e da matriz agroenergética.

4.1.3 Parceiros: a Fervita teve importantes parceiros na etapa de validação do produto gerado pela tecnologia de compostagem acelerada Fervita. Foram eles, a Dra. Maria Fátima Grossi de Sa (pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e o Dr. Brenner Magnabosco Marra (professor da Universidade Federal do Paraná). Atualmente estuda parceria com a Universidade Federal de Viçosa para o desenvolvimento de novos projetos e novos produtos.

5. Estratégia do Negócio

<p>D E N T R O</p> <p style="text-align: center;">↑</p> <p>D A</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>F E R T I V I T A</p>	<p>Forças:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Desenvolveu tecnologia inédita de compostagem acelerada da matéria orgânica de 1:30 hr X o processo tradicional de 30 a 180 dias; •Desenvolveu tecnologia, de baixo custo, de retirada da umidade presente em resíduos de suínos; •Capacidade de converter resíduo de aves, suíno e lixo orgânico urbano em fertilizante organomineral agronomicamente competitivo e de alto valor agregado; •Desenvolveu a inédita tecnologia de peletização da parte mineral à orgânica. Este fator é imprescindível para aplicação do fertilizante organomineral de forma uniforme na lavoura por plantadeiras podendo, desta forma, ser utilizado pelas grandes culturas, tais como soja, milho, feijão, etc.; •Pelas características do fertilizante obtido pelo processo, o produtor consegue uma maior produtividade da lavoura, conseqüentemente uma maior lucratividade; •A tecnologia é geradora de Créditos de Carbono; •E a tecnologia Fervita pode diminuir a dependência Brasileira pelos fertilizantes minerais. 	<p>Fraquezas:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Necessidade de investimento alto em estrutura física e maquinário; •Necessidade de um capital de giro relativamente alto; •A empresa ainda não estar em um estágio mais avançado do negócio; •O produto é desconhecido pelo mercado.
<p>F O R A</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>D A</p> <p style="text-align: center;">↑</p> <p>F E R T I V I T A</p>	<p>Oportunidades:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Aumento da demanda por fertilizantes; •Aumento da demanda por fertilizantes organominerais e orgânicos; •Diminuição do tempo de vida útil das reservas de minerais utilizados na produção dos fertilizantes; •Constante aumento dos preços das matérias-primas dos fertilizantes; •Grande produção de resíduos de aves, suínos e lixo orgânico urbano, que são matérias-prima de baixo custo para a Tecnologia Fervita; •Criação de uma legislação específica para o controle sanitário dos resíduos de aves e suínos no Brasil. Esta legislação já está em tramitação pelo Congresso Nacional e vem de encontro com a Tecnologia Fervita, no que se diz respeito a necessidade de uma tecnologia apropriada capaz de promover o devido fim aos resíduos agroindustriais de aves, suínos e lixo orgânico urbano; •E a criação de uma legislação que preconiza a utilização de matrizes energéticas alternativas para a agropecuária, como os resíduos agroindustriais. 	<p>Ameaças:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Grandes modificações na estrutura comercial do agronegócio brasileiro culminando na extinção da agropecuária; •Investimentos maciços por parte das grandes empresas produtoras de fertilizantes em tecnologias de produção de fertilizantes organominerais; •Práticas comerciais praticadas pelas grandes empresas para retirar um produto do mercado, como por exemplo, oferecer porcentagem da venda como comissão ao responsável pela compra; •E a não comercialização do fertilizante produzido.

Como fazer com que as fraquezas tornem-se forças e as ameaças criem oportunidades?

- A necessidade de investimento alto em estrutura física e maquinário pode ser controlada através do licenciamento da tecnologia para investidores, que farão a capitalização necessária para a construção da Planta Industrial;
- A necessidade de um alto Capital de Giro pode ser sensivelmente reduzida e direcionada como custo de investimento do investidor. Também é possível buscar empréstimos junto ao BNDS;
- A empresa ainda não estar em um estágio mais avançado do negócio apesar ser um fator negativo pode constituir-se em benefícios do ponto de vista organizacional, onde toda a estrutura será projetada a fim de se obter a máxima eficiência administrativa e dentro dos modelos atuais de Gestão Empresarial, sem “vícios administrativos” que em geral são mais dispendiosos para serem removidos do sistema, do que a aplicação de Gestão desde o início do empreendimento;
- Da mesma forma, no caso do produto ser desconhecido pelo mercado pode ter o seu potencial desenvolvido a partir das qualidades do mesmo, não sendo necessárias medidas corretivas paralelas, que demandam tempo e recursos financeiros elevados. Para se trabalhar com novos produtos será necessária a contratação de um Diretor Comercial com ampla experiência e qualificação para o cargo.

São nas ameaças que surgem as melhores oportunidades, e é com este pensamento que a Fervita trabalha para melhorar o seu “horizonte” estudando o setor e buscando soluções.

- Apesar de não ser um cenário com grandes probabilidades de ocorrer, se faz necessário citar grandes modificações na estrutura comercial do agronegócio brasileiro culminando na extinção da agropecuária. Este fator estaria ligado a grandes perturbações climáticas e independem de medidas preventivas por parte da Fervita;
- Outro fator de ameaça pode ser investimentos maciços por parte das grandes empresas produtoras de fertilizantes em tecnologias de produção de fertilizantes organominerais. Para tanto, estas empresas teriam que desenvolver uma nova tecnologia mais eficiente e que seja diferente da patente da Fervita de compostagem e peletização, para que esta tecnologia seja desenvolvida, mesmo que aja disponibilidade financeira, se faz necessário um amplo quadro de profissionais especializados, um período de tempo e posteriormente de três a seis anos para conseguir o registro da tecnologia desenvolvida junto ao INPI, sendo este o tempo de espera atual para análise de um processo;
- Existe ainda, uma ameaça que está relacionada a empresas com práticas comerciais agressivas, tendo como interesse a retirada do produto concorrente do mercado, como por exemplo, oferecer porcentagem da venda como comissão ao responsável pela compra. Talvez, este seja um dos maiores problemas que pode vir a ser enfrentado pelo negócio, podendo ser trabalhado previamente através de orientação à equipe de venda, onde seja mantido o foco na qualidade superior do produto, redução da margem de lucro e até mesmo a prática de cobrir a oferta na comissão sobre a compra;
- Como um último ponto de ameaça, pode ser apontado a não comercialização do fertilizante produzido. Este fator estaria diretamente relacionado ao item tratado no parágrafo anterior, e também a uma equipe de venda não preparada para assumir o desafio de se colocar um novo produto no mercado, por isso é importantíssimo ao se contratar os vendedores já ter estabelecido previamente o perfil desejado, ou seja, experiência em vendas de insumos agropecuários (fertilizantes), conhecimento regional e boa “entrada” junto aos agropecuaristas onde irá atuar.

Sendo observados os fatores acima mencionados, que podem influenciar no sucesso do empreendimento, e agindo de forma a antecipar os desafios, o Empreendimento Fervita estará cercado de forças e oportunidades no seu horizonte próximo.

5.1 O Posicionamento Estratégico perante o Mercado: a Fervita busca atender uma parcela do crescente mercado de fertilizantes, para tanto buscou transformar resíduos da cadeia produtiva, que até então eram considerados um passivo ambiental altamente negativo, em fertilizante organomineral de alto valor agregado ao mesmo tempo em que promove a sustentabilidade e novos negócios para a cadeia produtiva de aves e suínos.

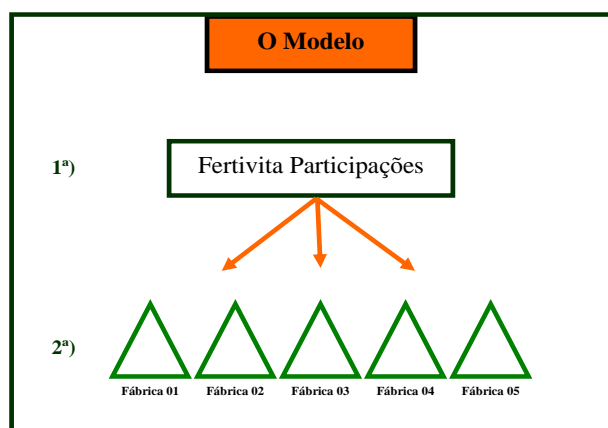
5.2 Objetivos para os próximos 5 anos:

- Licenciamento do uso da Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização para investidores, alcançando cinco novas fábricas instaladas e em funcionamento;

- Tratar e higienizar 350 mil/toneladas/ano de resíduos;
- Alcançar 3,8% do seu Mercado Potencial de fertilizantes.

5.3 Estratégias: para alcançar 3,8% do mercado em 5 anos a Fertivita tem como opções:

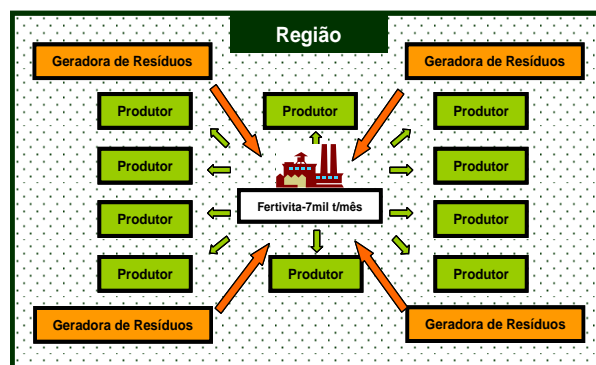
- Aporte financeiro de investimento para a construção de 5 fábricas próprias, através de financiamentos junto às instituições financeiras;
- Aporte financeiro de investidores locais, que serão sócios parceiros ao adquirir parte das quotas de uma unidade fabril, cabendo a Fertivita Participações (Holding) repassar os projetos para implementação do investimento, bem como o uso e exploração da Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização na produção de fertilizantes e a gestão da unidade industrial juntamente com o parceiro local.



Localidades com maior aptidão para receber investimentos Fertivita: Regiões onde existem indústrias de beneficiamento de aves e/ou suínos. Estas indústrias, geralmente estão sediadas próximas aos centros de produção de grãos, que é o grande mercado consumidor de fertilizantes no Brasil. Este modelo vem se confirmando como promissora visto que a primeira unidade fabril já foi comercializada e encontra-se em construção na cidade de Toledo – PR. Também no Paraná, em Apucarana, uma segunda unidade está sendo negociada. No Tocantins, Piauí e em Buritis – MG estão sendo negociadas unidades, neste mesmo modelo.

Exemplo de regiões:

- Toledo – PR,
- Apucarana – PR,
- Palotina – PR,
- Buritis – MG,
- Rio Verde – GO,
- Luiz Eduardo Magalhães – BA
- Chapecó - SC.




5.4 Como conquistar seus Clientes Potenciais: para chegar até o cliente, como estratégia a divulgação do produto e seus resultados, bem como depoimentos dos produtores formadores de opinião sobre o produto serão trabalhados. Este trabalho será desempenhado pelos engenheiros agrônomos e técnicos contratados com o perfil

de vendedor e com conhecimento da região onde irão trabalhar. O ponto forte do produto é a sua qualidade, inovação, potencial de melhorias de resultados de produtividade, e fertilizantes registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com todas as licenças e garantias necessárias para comercialização. Os aspectos listados facilitam a abertura do mercado e o acesso ao cliente potencial (que são produtores que buscam um produto que aumente a produtividade da sua lavoura ao mesmo tempo em que reestrutura o seu solo já degradado pela sistemática utilização de fertilizantes minerais) este cliente, também busca tecnologias que sejam economicamente viáveis, para uma precisa avaliação da estratégia de colocação do produto no mercado será contratado um Diretor Comercial que atenda o perfil desejado.

Como a tecnologia Fertivita possibilita trabalhar com resíduos de aves e suínos, que têm um baixo valor comercial, o custo de produção do fertilizante é reduzido em comparação ao fertilizante mineral, desta forma o produto ganha na qualidade e tem um custo que permite trabalhar o preço de venda.

Neste momento cabe salientar que o fertilizante Fertivita contém:

Matéria Orgânica Compostada	+	Macronutrientes	+	Micronutrientes
<ol style="list-style-type: none"> 1. Carbono Orgânico 2. Ác. Fúlvicos 3. Ác. Húmicos 4. CTC 5. Cap. reter água (117% seu peso) 6. Reestruturação do solo 7. Repovoamento por microorganismos benéficos p/ plantas 8. Liberação dos nutrientes anteriormente indisponíveis 		<ol style="list-style-type: none"> 1. Nitrogênio (N) 2. Fósforo (P) 3. Potássio (K) 4. Cálcio (Ca) 5. Enxofre (S) 		<ol style="list-style-type: none"> 1. Ac. Bórico (B) 2. Magnésio (Mg) 3. Zinco (Zn)
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> LIVRE DE FITOPATÓGENOS E SEMENTES DE PLANTAS DANINHAS </div>				
				

Enquanto os fertilizantes minerais possuem em suas fórmulas apenas os macronutrientes N, P, K destacados na figura acima.

6. Plano de Marketing

Juntamente com o Diretor Comercial contratado, a Fertivita estabelecerá:

Os métodos de comercialização. A empresa divulgará sua tecnologia e produto alcançado, através de uma equipe de vendedores, com conhecimento em agropecuária, que será contratada para fazer o atendimento a médios e grandes produtores e a abertura de mercado.

Diferenciais do produto/serviço para o cliente. Como discutido anteriormente o produto tem uma qualidade superior quando comparado com os fertilizantes tradicionais (minerais). Estes resultados são também validados pela literatura científica, que destaca o valor potencial dos fertilizantes organominerais e orgânicos quando comparado ao mineral apenas. Outro aspecto positivo do Fertivita é sua peletização, ou seja, no mesmo grão tem matéria orgânica compostada, livre de fitopatógenos e de sementes de plantas daninhas; macronutrientes e micronutrientes.

Canais de distribuição e estratégias de promoção/comunicação e publicidade. Para distribuição dos fertilizantes Fertivita, será realizada a abertura de mercado com a equipe de vendas e poderão ser estabelecidos acordos comerciais com fábricas de fertilizantes orgânicos e organominerais. Estas fábricas ainda trabalham no sistema convencional (ultrapassado) de compostagem (30-180 dias) e não têm a peletização da matéria orgânica à parte mineral, por tanto terão uma grande melhoria no fertilizante comercializado, cabendo apenas comprarem da Fertivita, colocar nas suas embalagens e revender. Para atender a demanda de médios e grandes clientes, uma equipe devidamente treinada e capacitada divulgará o produto pontualmente. Estes clientes previamente selecionados terão um perfil característico: donos ou responsáveis de estabelecimentos agropecuários maiores do que 1000 hectares, com orientação técnica e que utilizem fertilizantes, este geralmente são clientes formadores de opinião, que procuram um fertilizante diferenciado e novas soluções. Para divulgação da marca, a presença da Fertivita em feiras e eventos agropecuários é julgada como necessária.

6.1 Estratégia de Venda: com o cliente previamente definido, ou seja, cliente que busca um novo produto com características melhoradas e maior produtividade a venda terá como destaque as características do produto:

1. É um organomineral;
2. Matéria orgânica + NPK + micro no mesmo grão;
3. Maior uniformidade no plantio;
4. Plantas mais sadia;
5. Aumento da produtividade;
6. Maior custo/benefício;
7. Isento de agentes fitopatológicos, pragas e plantas daninha;
8. Uso facilitado: farelado ou peletizado;
9. Produto Brasileiro;
10. Apelo ecológico.

6.2 Diferencial Competitivo do Produto: o ponto mais característico da Fertivita é a inovação, sua tecnologia produziu um produto inovador e com qualidade superior daqueles encontrados no mercado. Levar um produto a um mercado crescente, o de produtos orgânicos, e um produto que aumenta a produtividade das lavouras, um produto que foi concebido para ser sustentável.

6.3 Distribuição: como as fábricas licenciadas com a tecnologia Fertivita ficarão próximas aos centros consumidores de fertilizantes, a distribuição do produto será facilitada em relação ao frete. Hoje trabalha-se com o forma de garantir uma maior satisfação do cliente, por exemplo com a contratação da empresa indicada pelo cliente para se transportar a carga, outra possibilidade é a Fertivita cadastrar várias empresas transportadoras e indicar opções de empresas para os clientes. O importante na logística é o produto comprado chegar no tempo e no local combinado, assim o cliente estará disposto a comprar novamente.

6.4 Política de Preços: como preço de venda a Fertivita estipulou: $o\ custo + \% \text{ do vendedor} + 20\ a\ 30\% = \text{preço total de venda}$. Esta estimativa de rentabilidade (20-30%) permite a Fertivita trabalhar com os seus produtos que têm qualidade superior, quando comparado com seus concorrentes, no mesmo preço ou até mesmo com um valor de venda inferior aos concorrentes. A margem de rentabilidade também pode ser modificada em situações especiais como estoques elevados, grandes vendas em períodos não tão “confortáveis” de comercialização (entressafra).

6.5 Projeções de vendas, por fábrica:

RESUMO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE VIABILIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE

		Análise de sensibilidade				
		Preço	-10%	0%	10%	0%
INVESTIMENTO TOTAL = R\$	75.000	75.000	67.500	75.000	82.500	
	17.670.074					
INFORMAÇÕES ANUAIS		ANO I	CENÁRIO I	CENÁRIO II	CENÁRIO III	CENÁRIO IV
RECEITA TOTAL		27.844.320	25.059.888	25.060.860	30.628.752	30.628.410
CUSTO TOTAL		22.350.035	22.238.658	20.384.954	22.461.412	24.315.141
CUSTO FIXO		1.954.931	1.927.087	1.927.096	1.982.775	1.982.772
CUSTO VARIÁVEL		20.395.104	20.311.571	18.457.858	20.478.637	22.332.369
DEPRECIÇÃO		514.257	514.257	514.257	514.257	514.257
LUCRO TRIBUTÁVEL		5.494.285	2.821.230	4.675.906	8.167.340	6.313.269
IRPJ + CSLL		1.844.057	935.218	1.565.808	2.752.896	2.122.511
LUCRO LÍQUIDO		3.650.228	1.886.012	3.110.098	5.414.444	4.190.758
CAPACIDADE DE PAGAMENTO (Líquida ou escritural)		4.164.485	2.400.269	3.624.355	5.928.701	4.705.015
PRAZO DE RETORNO DO INVESTIMENTO (PRI) - Anos		6,11	10,87	7,12	4,40	5,42
RENTABILIDADE ANO =		20,66%	10,67%	17,60%	30,64%	23,72%
LUCRATIVIDADE ANO =		13,11%	7,53%	12,41%	17,68%	13,68%
PONTO DE NIVELAMENTO		26,24	40,58%	29,19%	19,53%	23,90%
TAXA INTERNA DE RETORNO (TIR) =		24,62%	11,17%	20,68%	36,71%	28,44%
VALOR PRESENTE LÍQUIDO (VPL) = R\$		13.236.183	372.567	9.277.990	26.099.798	17.193.807
Obs: Taxa de remuneração do capital investido e de custeio =		10,75%				

6.6 Serviço de Pós-venda e Garantia: todos os lotes de fertilizantes são previamente analisados em laboratório credenciados pelo MAPA, isto garante a uniformidade e quantidade estipulada de cada componente que forma o produto final a ser comercializado, a Fertivita contará também com laboratório próprio onde análises periódicas serão realizadas, aferindo assim a procedência das matérias-primas e do produto final. A Fertivita também disponibilizará uma equipe técnica qualificada para o atendimento *in loco*, ou seja, técnicos agropecuários que poderão atender o cliente e sanar eventuais dúvidas. No site da empresa estará disponível um canal para contatos.

7. Planejamento e Desenvolvimento do Projeto

Quanto tempo será necessário até que a empresa possa efetivamente começar a vender? Neste sentido temos duas situações distintas: na 1ª situação a empresa já existe, produz e vende fertilizantes (Unidade Protótipo de Formosa-GO), portanto encontra-se funcionando. Também já se encontra em fase de construção, com maquinário já adquirido e com previsão de entrada em funcionamento para janeiro de 2012 a Unidade Fertivita Toledo - PR; na 2ª situação - negócio Fertivita, para cinco fábricas instaladas em cinco anos, onde se faz necessário um investimento (financeiro e de tempo) na implementação das unidades, neste caso para a montagem de cada indústria são calculados de 5-6 meses. Tendo em vista a meta de cinco novas unidades, a Fertivita conseguiu em 2011 implementar uma nova unidade, desta forma faltam quatro novas fábricas para completar o objetivo, sendo que já estão sendo negociadas três novas fábricas.

7.1 Estágio Atual: a Fertivita encontra-se em fase de tecnologia e produto desenvolvidos, sendo comercializado em seu protótipo, que é a Unidade Protótipo de Formosa-GO. Até o momento todos os investimentos realizados foram de capital próprio dos associados, tendo a empresa total liquidez e patrimônio de aproximadamente R\$ 5 milhões. Também encontra-se em estágio avançado de implementação a Fertivita Toledo – PR, com previsão de entrar em funcionamento em janeiro de 2012. Atualmente a Fertivita se prepara para ampliação dos negócios e captação de recursos financeiros que irão provir a efetivação do seu projeto maior (a implementação das fábricas de tratamentos de resíduos e desta forma alcançar a venda de fertilizantes, 3,8% do Mercado Potencial Fertivita em 5 anos). Este processo é demorado e bastante laborioso, devido principalmente a proporção dos investimentos e seriedade com a qual deve ser tratado.

7.2 Cronograma para implementação da Tecnologia Fertivita: cada etapa = 15-20 dias de execução. Este investimento será realizado pelo investidor local, objetivando a produção de fertilizante orgânico e/ou organomineral.

2.17. QUADRO DE USOS E FONTES - INVESTIMENTOS TOTAIS

R\$ 1,00 Julho/2010

DISCRIMINAÇÃO		A Realizar									
		Total	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V	Etapa VI	Etapa VII	Etapa VIII	Etapa XI
U	Terreno (1)	160.000	160.000	-	-	-	-	-	-	-	-
	Obras Cíveis	3.051.337	163.753	223.325	320.752	292.224	484.054	588.756	489.910	299.091	189.472
	Instalações	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	Máquinas e Equipamentos	3.782.877	-	1.260.959	-	1.260.959	-	1.260.959	-	-	-
	Móveis e Utensílios	16.077	-	-	-	-	-	-	-	-	16.077
	Veículos	61.541	-	-	-	-	-	-	-	-	61.541
O	Outros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Elaboração de projetos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	- Engenharia	150.000	150.000	-	-	-	-	-	-	-	-
S	- Econômico	56.000	56.000	-	-	-	-	-	-	-	-
	Investimentos Financeiros	2.619.895	-	-	-	-	-	-	-	-	2.619.895
	Capital de Giro	2.619.895	-	-	-	-	-	-	-	-	2.619.895
Total de Usos		9.897.726	529.753	1.484.284	320.752	1.553.183	484.054	1.849.715	489.910	299.091	2.886.984

7.3 Gestão das Contingências: as primeiras dificuldades enfrentadas pelo projeto serão durante a execução do projeto de construção da estrutura física, e como solução será contratada uma empresa especializada na construção de estruturas e maquinários industriais, assim como para a montagem industrial. A Fertivita já estudou o mercado e encontrou empresas competentes que darão o suporte necessário para o bom andamento das obras. Um segundo problema poderá ser o treinamento da equipe de produção, como solução, técnicos ministrarão cursos operacionais para os funcionários das unidades *in loco*, ou seja, na própria fábrica. O terceiro problema poderá ocorrer no início da comercialização, onde um novo produto tem que ser apresentado e adquirido, para tanto, um Diretor Comercial será contratado para dar o suporte necessário e andamento ao processo. Todo novo produto enfrenta desafios, cabe a empresa conquistar o cliente, para tanto existem ferramentas de marketing e será a metodologia que a Fertivita vai empregar.

8. Plano Financeiro

8.1 Investimento Inicial: Quanto será necessário para iniciar o negócio? a Fervita busca o investidor para capitalizar o negócio. O investimento será utilizado como: capital de giro; na melhoria da capacidade de produção e das instalações civis de escritório e mobiliário da Unidade Vitrine de Formosa; Construção da Nova Unidade – Luiz Eduardo Magalhães –BA e para o desenvolvimento do setor comercial e de marketing da Fervita. Para tanto serão necessários R\$ 10 milhões.

Existe disponibilidade de recursos para isto? Com o intuito de implementar o negócio, a Fervita está disposta a abrir seu capital societário. Com esta ação será possível, sem financiamentos bancários, dar início aos trabalhos de propostos neste plano de negócios. Também é possível, através do modelo de negócio proposto neste documento, a venda de porcentagens das novas unidades à investidores locais, alcançar a musculatura financeira necessária. Neste modelo não se faz necessário a abertura do capital social da empresa gestora (a Fervita Holding).

De onde virão os recursos para o crescimento do negócio? Com o amadurecimento do negócio as próprias fábricas serão responsáveis pelo crescimento da empresa. Poderá ser destinado parte dos lucros, 10% por exemplo, para ser reinvestido na construção de novas fábricas. Como alternativa pode ser criado um sistema de franquias onde as granjas de aves e/ou suínos adquiram a licença da tecnologia Fervita, produzam e comercializem o seu próprio fertilizante pagando royalties a Fervita.

Receita Bruta
Serviços de Implantação
Capacitação
Manutenção
Royalties
Venda de Fertilizantes

8.2 Receitas, Custos e Despesas e Ponto de Equilíbrio: Qual o mínimo de vendas necessário para que o negócio seja viável?

Cenários propostos para uma fábrica:

RESUMO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE VIABILIDADE E ANÁLISE DE SENSIBILIDADE

		Análise de sensibilidade				
		Preço	-10%	0%	10%	0%
Quantidade = 75.000t/ano		0%	-10%	0%	10%	
75.000		75.000	67.500	75.000	82.500	
INVESTIMENTO TOTAL = R\$		17.670.074				
INFORMAÇÕES ANUAIS		ANO I	CENÁRIO I	CENÁRIO II	CENÁRIO III	CENÁRIO IV
RECEITA TOTAL		27.844.320	25.059.888	25.060.860	30.628.752	30.628.410
CUSTO TOTAL		22.350.035	22.238.658	20.384.954	22.461.412	24.315.141
CUSTO FIXO		1.954.931	1.927.087	1.927.096	1.982.775	1.982.772
CUSTO VARIÁVEL		20.395.104	20.311.571	18.457.858	20.478.637	22.332.369
DEPRECIÇÃO		514.257	514.257	514.257	514.257	514.257
LUCRO TRIBUTÁVEL		5.494.285	2.821.230	4.675.906	8.167.340	6.313.269
IRPJ + CSLL		1.844.057	935.218	1.565.808	2.752.896	2.122.511
LUCRO LÍQUIDO		3.650.228	1.886.012	3.110.098	5.414.444	4.190.758
CAPACIDADE DE PAGAMENTO (Líquida ou escritural)		4.164.485	2.400.269	3.624.355	5.928.701	4.705.015
PRAZO DE RETORNO DO INVESTIMENTO (PRI) - Anos		6,11	10,87	7,12	4,40	5,42
RENTABILIDADE ANO =		20,66%	10,67%	17,60%	30,64%	23,72%
LUCRATIVIDADE ANO =		13,11%	7,53%	12,41%	17,68%	13,68%
PONTO DE NIVELAMENTO		26,24	40,58%	29,19%	19,53%	23,90%
TAXA INTERNA DE RETORNO (TIR) =		24,62%	11,17%	20,68%	36,71%	28,44%
VALOR PRESENTE LÍQUIDO (VPL) = R\$		13.236.183	372.567	9.277.990	26.099.798	17.193.807
Obs: Taxa de remuneração do capital investido e de custeio =		10,75%				

8.3 Fluxo de caixa: O volume de vendas que a empresa julga atingir torna o negócio atrativo?

Pelos resultados projetados na tabela acima apresentada os valores começam a ficar bastante interessantes já a partir do segundo ano.

Análises pormenorizadas serão oportunamente apresentadas com o andamento das negociações.

8.5 Balanço Patrimonial

Atualmente o balanço patrimonial (2010) da Fertivita está calculado em R\$ 5 milhões, não estando incluso neste cálculo o valor da patente do processo de compostagem desenvolvido. A patente tem o valor diretamente proporcional ao valor gerado pelo produto e este terá seu real valor dimensionado, com a sua comercialização. Novos negócios estão sendo fechados e a Fertivita projeta para o final de 2011 um balanço patrimonial de R\$ 10 milhões, com a construção da 1ª Unidade do Paraná localizada na cidade de Toledo.

9. Saídas do investimento:

A empresa entende como alternativas para a saída do investidor do negócio, as seguintes possibilidades:

- Recompra de ações;
- Abertura de capital no BOVESPA+;
- Venda estratégica a produtores de fertilizantes e empresas que já realizem processo de compostagem.

Logos de potenciais compradores:



Parecer técnico sobre o Negócio Fertivita:

“O Fertivita é produto de nova tecnologia brasileira para o cenário global. Várias vantagens agrônômicas, industriais e bioprocessuais já foram citadas. A qualidade homogênea do produto final, a exclusão de fitopatógenos potenciais presentes em matérias orgânicas oriundas de esterco e camas, o tempo de compostagem e o espaço de processamento industrial e armazenamento extraordinariamente reduzido, a homogeneidade do bioprocessamento industrial automatizado e o controle absoluto da qualidade, além de evitar o lançamento de gases (exemplo: metano e CO₂) envolvidos no aquecimento do efeito estufa como ocorre na compostagem convencional são fatores de atratividade ao investimento e garantia de retorno econômico direto pela venda do fertilizante e indireta pelos ganhos ambientais (venda de crédito carbono). Enquanto que pelo método de fermentação aeróbica e anaeróbica da convencional compostagem (exemplo dos processos químicos envolvidos: hidrólise, acidogênese, acetanogênese, metanogênese, etc) essencialmente artesanal, são necessários cerca de seis meses para se obter o ponto ótimo de humificação, compostagem, relação carbono/nitrogênio e outros parâmetros conforme a literatura científica e as normas legais (MAPA, 2002). A tecnologia Fertivita proporciona fantástica economia de tempo e alto controle de qualidade conforme citado logo acima. Em apenas uma hora e trinta minutos obtém-se o resultados semelhantes ou melhores na qualidade do produto final, entretanto com o controle de qualidade de todas as etapas e evitando desprender gases contribuintes do efeito estufa. A redução do tempo de processamento é sempre um investimento rentável. O empreendimento em tela dará oportunidade de expansão, com demanda e clientela já garantidas otimizando a utilização de recursos humanos e materiais, com instalações adequadas e oferecendo produto diferenciado e de excelente qualidade. A Capacidade de Pagamento, positiva durante todo o período previsto, é uma garantia a mais para o sucesso do empreendimento. Tendo em vista todos os dados econômicos financeiros apresentados, bem como os aspectos sociais e ambientais de interesse da sociedade brasileira, além da geração de empregos, concluímos pela viabilidade econômico-financeira do presente empreendimento, desde que cuidados sejam tomados em relação a gestão de qualidade.”

Brasília, 31 de agosto de 2010.

Joaquim Raimundo de Lima Filho

Economista - CORECON-DF 4620

Telefone: (61) 9989-4336

Palavras ao Investidor:

É com imensa satisfação que a Fervita preparou e apresenta este Plano de Negócios. Documento este, que reflete a nossa vontade, desafios e conquistas da Fervita para os próximos 5 anos. Com a Tecnologia de Compostagem Acelerada e Peletização, os resíduos agroindustriais poderão a partir da implementação das Unidades de Tratamento ser convertidos rapidamente a um fertilizante de qualidade superior e de alto valor agregado, ou seja, transforma um passivo ambiental em receita + sustentabilidade.

Brasília, 04 de novembro de 2011.

Gustavo Ramos de Oliveira

Pesquisador

(61)9943-6760 (61)8109-5283

guraoliver@gmail.com

ANEXO – III

ARTIGOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS À TESE:

1. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*).
2. Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer.
3. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*)

Gustavo R Oliveira^{3,7}, Maria CM Silva³, Wagner A Lucena^{2,3,5}, Erich YT Nakasu³, Alexandre AP Firmino^{3,5}, Magda A Beneventi³, Djair SL Souza¹, José E Gomes Jr^{1,3}, José DA de Souza Jr^{1,3}, Daniel J Rigden⁴, Hudson B Ramos¹, Carlos R Soccol⁷ and Maria F Grossi-de-Sa^{3,5,6*}

Abstract

Background: The cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) is a serious insect-pest in the Americas, particularly in Brazil. The use of chemical or biological insect control is not effective against the cotton boll weevil because of its endophytic life style. Therefore, the use of biotechnological tools to produce insect-resistant transgenic plants represents an important strategy to reduce the damage to cotton plants caused by the boll weevil. The present study focuses on the identification of novel molecules that show improved toxicity against the cotton boll weevil. *In vitro* directed molecular evolution through DNA shuffling and phage display screening was applied to enhance the insecticidal activity of variants of the Cry8Ka1 protein of *Bacillus thuringiensis*.

Results: Bioassays carried out with *A. grandis* larvae revealed that the LC₅₀ of the screened mutant Cry8Ka5 toxin was 3.15-fold higher than the wild-type Cry8Ka1 toxin. Homology modelling of Cry8Ka1 and the Cry8Ka5 mutant suggested that both proteins retained the typical three-domain Cry family structure. The mutated residues were located mostly in loops and appeared unlikely to interfere with molecular stability.

Conclusions: The improved toxicity of the Cry8Ka5 mutant obtained in this study will allow the generation of a transgenic cotton event with improved potential to control *A. grandis*.

Keywords: *Anthonomus grandis*, *Bacillus thuringiensis*, Cotton, DNA shuffling, Phage display, Molecular modeling

Background

Anthonomus grandis (Coleoptera: Curculionidae), commonly known as the cotton boll weevil, is the most harmful cotton-feeding insect-pest in the Americas [1-4]. Even in cotton fields where the insect has been considered eradicated (e.g. Mississippi State USA), the growers must maintain a continued vigil because of the tremendous ability of the boll weevil to return to previous controlled regions from time to time to re-infest. Millions of dollars in insecticides were spent by growers to have areas eradicated. In not eradicated areas, yield losses to boll weevil exceeded until 10 percent in certain years and the growers had to apply 8-12 boll weevil sprays per field [5]. These repeated treatments are necessary, because only adult boll weevils feed on tender

cotton terminals, on pollen from flower buds and on fruits. The larvae are protected inside the boll, which makes difficult the contact with chemical pesticides. Recently presented during forum Brazil' 2010/11, cotton area production is estimated at 1.2 million of hectares the highest since the early 1990's [6]. However, especially in Brazil, boll weevil is considered a key pest in cotton fields and despite of pest management and several insecticide sprays, an efficient boll weevil control does not exist. As an alternative to chemicals, the use of transgenic plants resistant to *A. grandis* presents a potential solution to the problem posed by insect-pests [7]. The development of genetically modified (GM) crops expressing Cry toxins has been widely researched due to the toxic effect of these molecules against insect-pests (lepidopterans, coleopterans and dipterans) and nematodes which attack and thereby affect the productivity of crops such as cotton [8]. These toxins are harmless to vertebrates and plants due their high

* Correspondence: fatimasa@cenargen.embrapa.br

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

specificity to the insect target. Since 1996, several insect-resistant GM cotton events have been used commercially throughout the world, including Bollgard[®] (expressing the *cry1Ac* protein) and Bollgard II[®] (expressing the *cry1Ac* + *cry2Ab* proteins) from Monsanto, Widestrike[®] (expressing the *cry1Ac* + *cry1F* proteins) from Dow Agrosciences and VipCot[®] (expressing *Vip3A* protein) from Syngenta/Deltapines. This technology has been used to control lepidopterans, allowing an increase in productivity, reductions in production costs, human intoxication and environmental damage due to a reduction in chemical pesticide application [9]. At the moment, however, none of the commercially available GM cotton events are effective against the cotton boll weevil, which is the most harmful cotton insect-pest in Latin America. Cry proteins are included in parasporal crystalline structures produced by *Bacillus thuringiensis* during sporulation [10,11]. Several hypothesis about the insecticidal mechanism of action of Cry toxins have been discussed in previous studies [12,13], including the pore formation model [8,13,14] and the signal transduction model [15]. More recently, Guo et al [16] proposed a plausible model for the initiation of Cry toxin domain disassembly before membrane penetration and pore formation. After ingestion, the crystals are solubilised and activated by insect midgut proteases. According to Bravo and Soberon [8], the binding of toxins to specific cadherin-like receptors triggers the oligomerization of toxin monomers. Directed by an aminopeptidase-N receptor, the oligomer is inserted into the cell membrane and forms a pore. Those pores are responsible for a net influx of ions and water, leading to disturbances in osmotic balance, cell lysis, midgut damage and insect death [8]. In the intracellular signalling model [15], the binding of toxins to the cadherin-like receptor triggers an Mg²⁺-dependent cAMP signalling pathway that promotes cell death. In both models, the affinity for cadherin receptors has been reported as the main step that determines specificity. Mutations in those receptors have been reported to be the cause of resistance acquisition [8]. Moreover, Broderick et al [17] suggested that the cry toxin activity is also dependent on the microorganisms of the insect midgut. Molecular strategies that involve structural and biochemical studies of Cry toxins, as well as the isolation and characterisation of new *cry* genes, are necessary to help elucidate the mechanisms of action of Cry toxins and also to select molecules that have the potential for improved toxicity and specificity [14].

In this context, DNA shuffling, as described by Stemmer [18] and following modifications reported by Zhao and Arnold [19], is the most commonly used technique to promote *in vitro* directed molecular evolution. In this technique, the introduction of random mutations into

the nucleotide sequences results in a pool of mutants from which proteins with improved function can be selected. Considering the biotechnological context, this technique has been used as a tool to generate libraries that contain variant genes encoding engineered proteins, which can subsequently be selected according to their potential agricultural or pharmaceutical use [20,21]. In a previous study reported by our group, a recombinant toxin produced by the *cryIIa12* gene exhibited moderate toxicity towards first instar larvae from both the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (50% mortality with 5 µg.mL⁻¹) and the coleopteran cotton boll weevil (50% mortality with 230 µg. mL⁻¹) [22]. More recently, *cryIIa12synth* (a *cryIIa12* synthetic gene containing plant codon usage) was used in an approach applying DNA shuffling coupled with the phage display technique, which involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for the facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target [23]. Our data showed that this strategy was able to efficiently generate genetic diversity, and the screening of the combinatorial library for *cryIIa12synth* variants resulted in the identification of novel molecules with improved entomotoxicity towards the sugarcane giant borer larvae, *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae), an activity not exhibited by the wild-type protein encoded by the original *cryIIa12* gene [24].

In a parallel manner, our team isolated a new gene classified as *cry8Ka1* (GenBank accession no. FJ422558) from a Bt strain that showed moderate toxicity to the cotton boll weevil [25]. The entomotoxicity of recombinant Cry8Ka1 protein expressed in *E. coli* bioassayed against *A. grandis* larvae was confirmed [25,4].

In the present study, the *cry8Ka1* gene was used in the combined DNA shuffling and phage display techniques to create novel Cry mutant toxins with improved activity towards the coleopteran *A. grandis*. Around 10⁵ Cry8Ka1 variants were generated, and the combinatorial library and screened phage selection allowed the isolation of new Cry toxins that exhibit improved toxicity against the boll weevil insect-pest. Among the screened Cry variants, Cry8Ka5 was selected for its high toxicity and potential use as a biotechnology tool for the generation of transgenic cotton plants. Analyses from theoretical models created for Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxin and comparison with other Cry toxin structures revealed that essential structural features are conserved.

2. Methods

2.1 Preparation of *A. grandis* Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs)

Neonate *A. grandis* larvae were obtained from colonies grown at the Embrapa Genetic Resources and

Biotechnology Centre (Brasilia, Brazil) using an artificial diet [25]. The BBMV s were prepared from midguts of boll weevil larvae by Mg/EGTA precipitation and differential centrifugation [26]. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Two hundred midguts were centrifuged at $2500 \times g$ for 5 min at 4°C, and the pellet was washed twice with MET buffer. The concentration of BBMV s proteins was determined by the Bradford assay [27] using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve. The aliquots were stored to -80°C until use.

2.2 cry8Ka1 gene amplification

A *cry8Ka1* gene was previously isolated by our team from a collection of *Bacillus thuringiensis* at the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology [25] was chosen for further studies because the encoded toxin had the potential to control the cotton boll weevil (*A. grandis*). First, the *cry8Ka1* gene (2001 bp), corresponding only to the active part of the toxin, was PCR-amplified from the original plasmid using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and the Cry8Ka1sfiF (5'CCCGGCCAGGCGGCCGACCACGCGTATCGA 3') and Cry8Ka1sfiR (5'CCCGGCCGCGCTGGCCGTTCAAGGAACCGTT 3') primers, which introduced an *Sfi* I restriction site (underlined). The PCR program included the following steps: a denaturation step, consisting of 1 cycle at 95°C for 5 min; 29 cycles consisting of a denaturation step of 40 s at 95°C; a hybridisation step of 40 s at 45°C; an elongation step of 40 s at 72°C; and finally, a step consisting of 2 min at 72°C. The PCR amplification product was analysed by 1% agarose (w/v) gel electrophoresis, and the DNA (approximately 2000 bp) was excised and gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101).

2.3 Generation of a combinatorial library using DNA shuffling and phage display

The *Sfi* I-digested, PCR-amplified *cry8Ka1* gene was used as the starting material for the DNA-shuffling procedure [18,19]. First, 10 µg of the purified *cry8Ka1* gene was randomly digested in a mixture containing 70 U of DNase I enzyme (Invitrogen) in DNase I buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.6, containing 1 mM MnCl₂ and 0.1 mg/mL BSA). The digestion reaction was performed at 15°C for 20 min and interrupted by the addition of 5 µL of 0.5 M EDTA. The digestion product was analysed by 2.5% agarose (w/v) gel electrophoresis and the 30-50-bp fragments were jointly purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE). Ten microliters of purified product were obtained by performing a PCR without primers in a 25-µL final volume containing 2.5

µM of each dNTP, 0.5 mM MgSO₄, and 2.5 U of Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) in the supplied 1X buffer. A PCR program consisting of the following steps was used: 95°C for 2 min; 43 cycles of 95°C for 1 min; 44°C for 1 min and 72°C for 1 min (with a 5-s increase in extension time per cycle); and 7 min at 72°C. To reassemble the variant genes, the product of the primer-less PCR (7.6 µL) was used as template for a second PCR using the Cry8Ka1SfiF and Cry8Ka1SfiR primers. The PCR mixture had a final volume of 500 µL and contained 0.2 mM of each dNTP, 2 mM MgSO₄, 800 nM of each primer and 25 U of *Taq* (Phonotria)/Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) (1:1 mixture) in the supplied 1X Platinum *Taq* buffer. The conditions for the second PCR were as follows: 2 min at 95°C; 10 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 45°C and 1 min at 72°C; 14 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 43°C and 42 s at 72°C (with a 20-s increase per cycle); and finally, 7 min at 72°C. All assembly reactions were performed in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf). The amplified shuffled product of approximately 2000 bp was analysed on a 1% agarose (w/v) gel, the single band of approximately 2000 bp was excised and the DNA was gel-purified using the GeneClean® II Kit (BIO 101). This product was digested using the *Sfi* I enzyme, and the variant genes (0.9 µg) were ligated into the pComb3X phagemid (3.6 µg) [28], which was also linearised using the *Sfi* I site. For a single reaction, T4 DNA ligase (Invitrogen) (12 U) and 5X ligase buffer were mixed to obtain a 200µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised and dissolved in 15 µL of water and subsequently fractionated into five aliquots. Each aliquot (3 µL) was used to transform 60 µL of the electrocompetent XL1-Blue® strain of *Escherichia coli* (Stratagene), and the following procedures were carried out as first described by Barbas III et al. [29] using the same modifications that were previously reported in [24].

2.4 Selection of the Cry8Ka1 toxin variants that bind to A. grandis BBMV s (biopanning)

The biopanning procedure for screening the combinatorial library and selecting specific *cry8Ka1* toxin variants fused to phage particles was performed as described by Barbas III et al. [29] with modifications recently reported by Craveiro et al. [24]. At each round, wells in microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4°C. After five rounds of selection, the clones from the cycle that exhibited the highest number of colony-forming units (cfus) were isolated and analysed to verify the integrity of the inserted *cry8ka1* variant genes via colony PCR using the Cry8Ka1sfiF and Cry8Ka1sfiR primers (described above). The clones that presented amplicons

around 2000 bp in length were further used for the expression of Cry8Ka1 variant proteins.

2.5 Expression of Cry8Ka (parental and variant gene toxins) in fusion phage particles

First, the parental *cry8Ka1* gene and several variants exhibiting size integrity (approximately 2000 bp) were expressed on the surface of M13 phage and analysed by immunodetection (Dot blot) exactly as reported in a previous study using the *cry11a12* gene and variants by Craveiro et al. [24].

2.6 Subcloning of cry8Ka1 and selected variant genes into vectors for expression in E. coli bacteria

To confirm that toxins expressed by phage fusion exhibited correct folding and activity, *cry8Ka1* and *cry8Ka5* variant genes were subcloned into the pET101/D TOPO (Invitrogen) plasmid according to the manufacturer's instructions. The CRY8PETF (5' CACCATGCGA-CACCTTCTACATCTG 3') and CRY8PETR (5' CTAA-GAAGCGTAGTCCGGAAC 3') primers were used to insert recombinant sites into genes. The pET101-based expression constructions, Cry8Ka1PET101 and Cry8Ka5PET01, were used to transform *E. coli* cells of the BL21 (DE3) strain according to the manufacturer's instructions. One colony of the bacteria carrying each construct was cultivated at 37°C in 5 mL of Luria Bertani (LB) medium containing ampicillin (100 µg mL⁻¹) (i.e., LB selective medium), under vigorous agitation (200 rpm) until an OD_{600nm} of 0.6 was reached. This pre-inoculum suspension was used to inoculate 2 L of fresh LB selective medium, which was agitated for 6 h after induction by the addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM. Before induction, an aliquot of the culture cells was collected and reserved. Typically, cells were harvested by centrifugation (3000 × g, 10 min), and the pellet was resuspended using 1 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer. Thereafter, the cell suspension was lysed by sonication and stored at -80°C until use. Final purification of His6X-tagged mature Cry8Ka1 and variant toxins was performed using affinity chromatography on 5 mL batches of Ni-NTA (QIAGEN) solid phase. The column equilibrium and chromatography conditions were performed according to the manufacturer's instructions. The eluted fractions were collected, dialysed against water and then lyophilised.

2.7 Western blotting analysis

The purified recombinant proteins were analysed using SDS-PAGE [30]. Typically, a 12% gel was loaded with 5 µg of each expressed protein (Cry8Ka1 and its selected mutants). After electrophoresis, the proteins in the gel were visualised by Coomassie Blue R-250 staining. For Western blotting, the protein samples were transferred

onto a HYBOND™-C EXTRA nitrocellulose membrane using a Trans-blot Semi-dry Transfer Cell (BioRad®). The solution used to block the membrane consisted of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5). Thereafter, the membrane was incubated with anti-His-AP conjugate (Invitrogen®) (1:2000 dilution in TBS) for 2 h at room temperature. After the membrane was washed three times using TBS-T (0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma®) added to TBS), the immune reactive bands were detected by immersing the blot according to the manufacturer's instructions using an alkaline phosphatase conjugate substrate® kit (BioRad®).

2.8 Quantification of the expressed toxins (ELISA)

To quantify proteins expressed by *E. coli* (as described in 2.6), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed using the polyclonal rabbit anti-Cry8Ka1 antibody, which was previously produced and purified by our team (not shown). The concentration of purified proteins was first determined according to Bradford method [27]. For a standard curve, a serial dilution was performed using purified Cry8Ka1 toxin (4 ng to 0.0019 ng) in wells of a microtiter plate. The wells of the plate were protein immobilised for 24 h at 4°C and then blocked using a solution containing 3% (w/v) BSA in TBS-T buffer for 4 h at room temperature. Following the washes, the polyclonal anti-Cry8Ka1 antibody (diluted 1:10000 in TBS-T containing 1% BSA) was deposited and incubated for 16 h at 4°C. After washes, samples were incubated with anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to peroxidase (Bio-Rad) (diluted 1:1000) for 2 h at room temperature. The TMB Peroxidase EIA Substrate Kit® (BioRad) was used for detection according to the manufacturer's instructions, and the reaction was stopped with 1 N H₂SO₄. The absorbance was measured at 405 nm using Benchmark Plus (BioRad). The assays were carried out in triplicate.

2.9 Bioassays of Cry8Ka1 and variants using A. grandis larvae

To assess the toxicity of Cry8Ka1 and its variants against neonate *A. grandis* larvae the bioassays were performed in two different situations. In the first bioassays for fast screening of variants indicating toxicity, fusion phage-expressed Cry8ka1 and variants were utilized in artificial diet (10¹¹ pfu mL⁻¹ of phage-expressed). Later bioassays were repeated using expressed in bacteria and purified Cry8ka1 and variants (0, 3, 6, 9 and 12 µg/mL) showing significant toxicity in preliminary screening. In both, bioassays were carried out in six-well cell culture plates filled with artificial diet [18% (w/v) Agar, 2.72% (w/v) Brewer's yeast, 4.48% (w/v) Soybean protein, 2.72% (w/v) Wheat germ, 18% (w/v) Pharmamedia®,

0.1% (w/v) Sorbic Acid, 0.9% (w/v) Ascorbic Acid, 2.72% (w/v) Glucose, 0.9% (w/v) Nipagin, 0.05% (w/v) Mineral salts, 0.45% (w/v) vitamin mixture] and phage-expressed (first bioassay) or Cry8Ka1 or variants (detected in dot blot analyses, data not shown)(second bioassay). Twelve larvae were placed in each well and the plate was incubated for seven days at 27°C (± 1) with 80% relative humidity and a 14-h photoperiod. An artificial diet containing no additional Cry proteins was used as the negative control. Each treatment was carried out in triplicate and the bioassay was repeated to until six different dates. After seven days, the number of surviving larvae was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by ANOVA and Tukey's means comparison analysis using the SigmaStat[®] software vs. 3.1 (Systat Inc., San Jose, California, 2004). The LC50 (lethal concentration required to kill 50% of insects) obtained from bioassays performed using bacteria-expressed proteins was calculated by Probit analysis [31] using the Polo-Pc software (LeOra Software).

2.10 DNA sequence analysis

The nucleotide sequences of the *cry8Ka1* variant genes encoding toxins active against *A. grandis* larvae (according to bioassay analyses) were determined using a 3130xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). To obtain the complete nucleotide sequences, several primers were used. 1) Primers designed to determine the N-terminal and C-terminal sequences were as follows: PCOMBF (5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3') and PCOMBR (5'-CGTTTGCCATCTTTTCATAAT-3'). 2) Primers designed to obtain the intermediate sequences were as follows: Cry8INTERF (5'-CATATG CACAAGCTGCGAATT-3'), Cry8INTERR (5'-GCTTC CGGCTCGTATGTTGTGT-3'), Cry8ka5INTERF (5'-AGCGGATTTGGGCAATTCAG-3') and Cry8ka5INTERR (5'-TAACAGCTGGAATTTGAGGA-3'). The sequences were analysed using the BLASTn and BLASTp algorithms [32], which are available on the NCBI homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. In order to assemble the sequenced fragments and to identify the position of the mutated residues, multiple sequence alignment programs were used, including the STADEN PACKAGE (available at <http://staden.sourceforge.net/>) [33] and CLUSTALW (available at <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) [34].

2.11 Molecular analysis and homology modelling

Proteins showing homology to Cry8Ka1 were found in the nr database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST with default parameters [32]. The resulting sequence set was aligned using Muscle [35]. Suitable templates for Cry8Ka1 model

building were found using a FASTA search of sequences in the Protein Data Bank [36] at the European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/fasta33>.

After manual refinement of the sequence alignment, homology models of Cry8Ka1 (667 amino acid residues) and mutant Cry8Ka5 (649 amino acid residues) were created using MODELLER, Version 9.8 [37]. The Cry8Ea1 [16] (PDB entry 3EB7) toxin structures was used as template for construction of the structural model. In the final alignment, Cry8Ka1 shared 34.7% sequence identity with the template. Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. Because of the low sequence similarity between target and template, a rigorous iterative modelling protocol was adopted in which 50 models were constructed and analysed. These models were analysed for packing and for stereochemical properties using PROCHECK [38]. Possible misalignments were highlighted by DOPE (Discrete Optimised Protein Energy; a statical potential used to assess homology models, running within the MODELLER environment) peaks, and variations in alignment of these regions were examined. When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK and DOPE scores was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated using PyMOL 1.3 [39] (available at <http://www.pymol.org/>).

3. Results

3.1 DNA shuffling and combinatorial library construction

To generate variants by applying the DNA shuffling procedure, the *cry8Ka1* nucleotide sequence (2001 bp) was PCR-amplified from the original vector and fragmented using DNase I. The resulting fragments in the 30-50 bp range were jointly purified and recombined to form reassembled genes using two consecutive PCR progressive programs. Using agarose gel electrophoresis, the DNA shuffling product was visualised as a single band of around 2000 bp that represented a population of *cry8Ka1* variant genes (Figure 1).

Both the DNA that contained the population of gene variants (DNA shuffling products) and also the PCR-amplified *cry8Ka1* gene were excised from gel, purified and then cloned into the pCOMB3X phagemid, resulting in pCOMB*cry8Ka1* and pCOMB*cry8Ka1*var constructs. The pCOMB*cry8Ka1*var construct was used to generate a combinatorial phage-display library of *cry8Ka1* variants containing 1.0×10^5 cfu/mL.

3.2 Screening of *cry8Ka1* combinatorial library towards BBMVs *A. grandis*

To select the clones expressing Cry8ka1 variants that bind specifically to the *A. grandis* midgut, the phage-

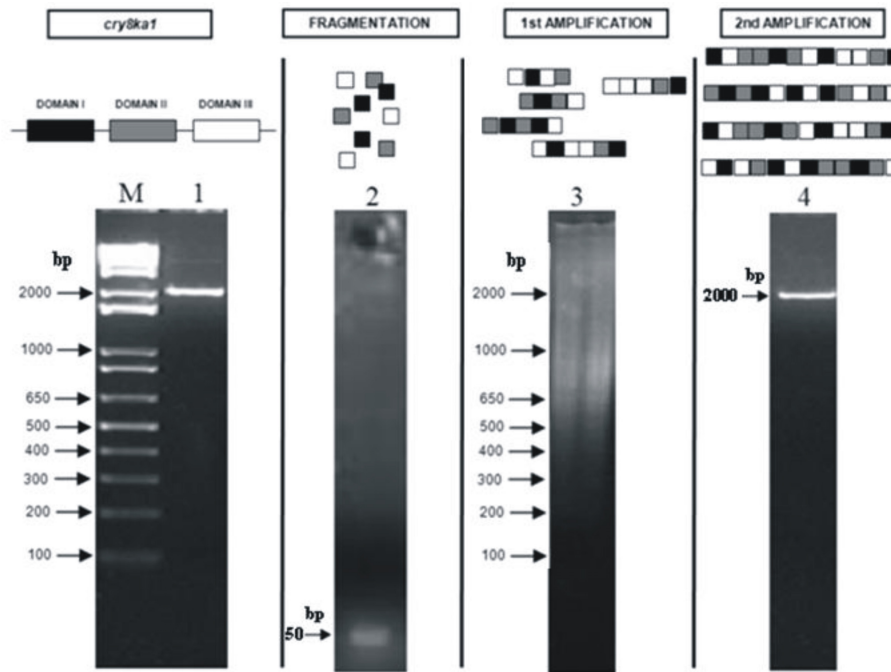


Figure 1 Illustration of the DNA shuffling steps. The DNA shuffling product was analyzed on 2.5% agarose gel electrophoresis. **Lane M:** 1Kb-plus ladder (Invitrogen); **lane 1:** *cry8ka1* gene amplification containing only the region correspondent to mature toxin (Domains I, II and III - 2001 bp); **lane 2:** DNase I digestion product resulting to fragments of 50 bp; **lane 3:** Reassembled PCR product using as template fragments containing 50 bp (obtained jointly and gel purified) and no primers added to reaction; **lane 4:** PCR amplification containing pool of variants (around 2000 bp) to reassembled genes.

display combinatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The fifth round was chosen because it yielded phage showing the highest binding specificity to *A. grandis* BBMVs (Figure 2). Two hundred randomly chosen clones from the fifth round exhibited amplicons corresponding to the original gene size of around 2000 bp (data not shown). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the haemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *A. grandis*.

3.3. Evaluation of toxicity of the Cry variants in bioassays

To assess the LC_{50} , neonate *A. grandis* larvae were incubated with purified Cry8Ka1 and Cry8Ka5 toxins expressed by the *E. coli* BL21 (DE3) strain (Figure 3).

Bioassays were conducted to evaluate the activity of Cry8Ka1 variants compared to the wild-type Cry8Ka1 toxin when incubated with neonate *A. grandis* larvae. The larvae mortality rate (Table 1) indicated no significant difference between treatment with a diet

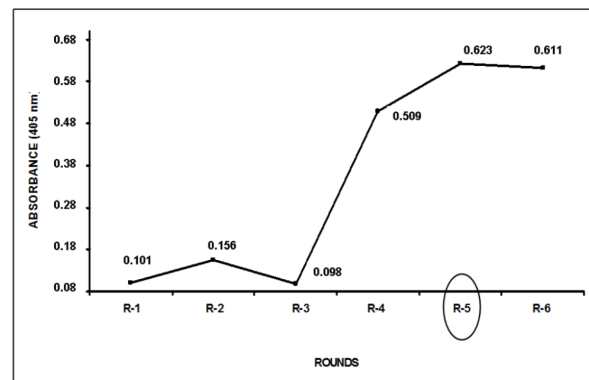


Figure 2 Biopanning screening of the *cry8ka1* Phage display combinatorial library for interactions of Cry8Ka1 variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from cotton boll weevil larvae (*A. grandis*). The absorbance indicated in the graph shows the phage-infected, which was related to the quantity of bacterial colonies obtained from each round of biopanning. Based in the data, the fifth round of biopanning was chosen as cycle of the enrichment of recombinant phages displaying Cry8Ka1 variants specifically bound to *A. grandis* BBMVs. The points of the curve indicate the absorbance at 405 nm (reading of phage) in each round.

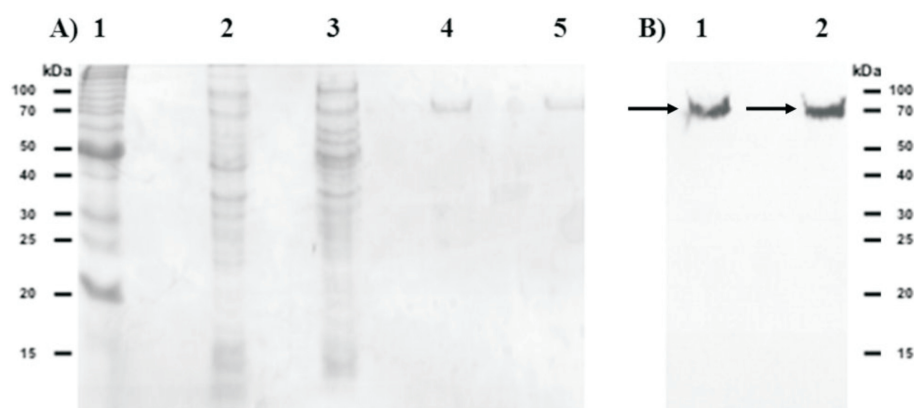


Figure 3 SDS-PAGE electrophoresis and Western blot analysis of Cry8Ka1 and Cry8Ka5 expressed in *E. coli* cells. The original and variant recombinant Cry8K toxins were fractionated by SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane and probed with monoclonal Anti-His[®] antibody **A)** Lane 1, BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); lane 2, proteins from non-induced cells (supernatant); lane 3, proteins expressed after induction with 0.5 mM IPTG-(supernatant); lane 4 and 5, Cry8Ka5 and Cry8Ka1 recombinant toxins, respectively, purified by using affinity chromatography as described in material and methods. **B)** Western immunoblot analysis. Lane 1 and 2 the arrows indicate Cry8Ka5 and Cry8Ka1 recombinant toxins, both with approximate molecular weights of 70 kDa.

supplemented with Cry8Ka1 protein, a diet supplemented with M13 helper phage or a diet with no protein supplementation (negative control) at the concentration tested. On the other hand, two (Cry8Ka3 and Cry8Ka5) out of the thirty Cry8Ka1 variants tested had a statistically significant effect on *A. grandis* compared to controls. The analysis of variance was significant for the mortality rates of these two variants. Based on these results, the Cry8Ka5 toxin was selected for additional characterisation (Figure 4A). The LC₅₀ for the recombinant Cry8Ka5 protein was significantly lower (2.83 µg/mL) than that of Cry8Ka1 (8.93 µg/mL) (Figure 4B and 4C), indicating improved toxicity (three times higher) for the

novel toxin (Cry8Ka5) selected from the combinatorial library of Cry8Ka1 variants (Figure 4C).

3.4 Structural analysis of Cry8Ka1 variant toxins

Firstly, the presence of genetic variability in the *cry8Ka1* combinatorial library was determined using nucleotide sequence analysis (data not shown) of 30 clones isolated from the pool of variants that was obtained at the fifth round of biopanning, which was chosen as the cycle containing the highest enrichment of specific phage.

The selected *cry8Ka5* gene (1947 bp) encoded a protein of 649 amino acid residues. Sequence comparisons among the parental *cry8Ka1* gene (2001 bp) and the variant genes identified numerous nucleotide substitutions (Figure 5). However, most of these nucleotide substitutions were silent mutations. *In silico* amino acid sequence translation revealed just six changed residues that were located in positions distributed throughout the three typical domains of Cry toxins, using the Cry8Ka1 and Cry8Ka5 comparison as indicated (Figure 6). One substitution was observed in domain I (R82Q; within the α3 helix), two substitutions (Y260C and P321A) were observed in domain II and three substitutions (R508G, K538E and E594N) were observed in domain III. In addition to residue substitution, a deletion of 16 residues in the N-terminal part of the Cry8Ka5 protein was observed, and this deletion was responsible for the reduced size of the mutant as compared to Cry8Ka1 (not shown). Additional sequence analyses revealed that the five conserved blocks in the primary structure that were previously defined in typical Cry toxins [10,16,40] were retained in both the Cry8Ka1 parental molecule and the shuffled Cry8Ka5. According

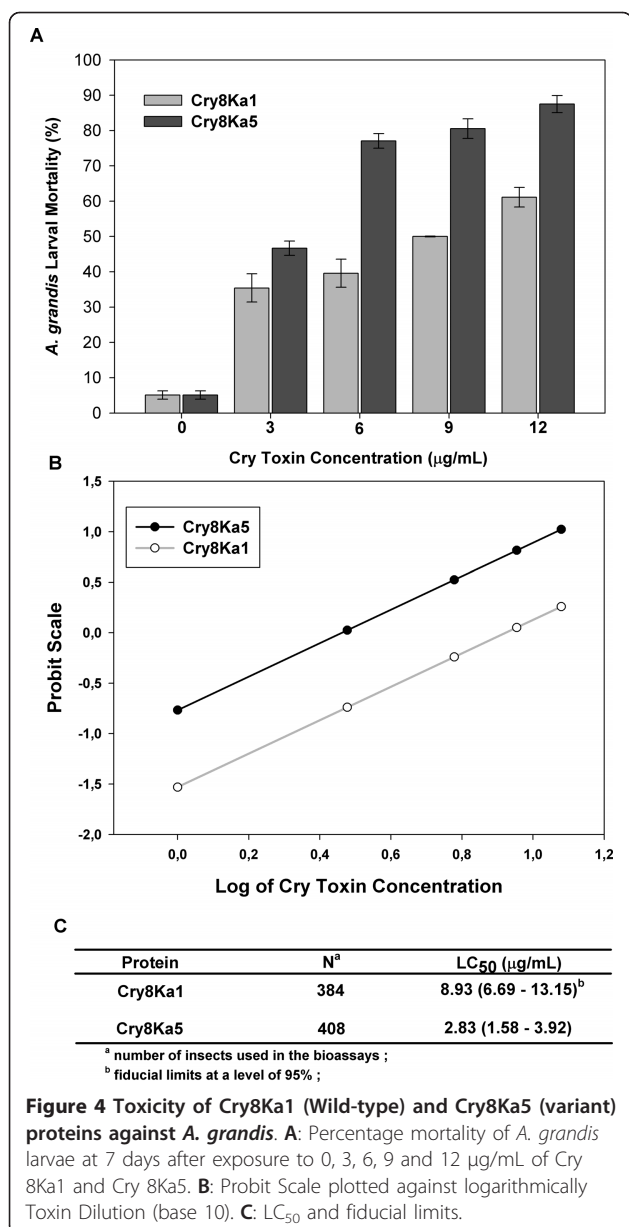
Table 1 Bioassay showing larvicidal activity including Cry8Ka1 toxin, the others toxins encoded by the seven selected gene variants and VCSM13 Phage (as negative control) using *A. grandis* larvae

Treatment	N	Lethality Mean (%) ± SD	SEM
VCSM13 Phage (Control)	6	20.55 ± 2.50 b ¹	1.02
Cry8Ka1 (Wild-type)	5	29.33 ± 5.47 a,b	2.44
Cry8Ka2	5	36.66 ± 5.77 a,b	2.58
Cry8Ka3	5	49.33 ± 6.30 a	2.81
Cry8Ka4	6	33.88 ± 11.95 a,b	4.88
Cry8Ka5	4	50.00 ± 11.54 a	5.77
Cry8Ka6	6	32.77 ± 15.22 a,b	6.21
Cry8Ka7	6	44.44 ± 19.16 a,b	7.82
Cry8Ka8	5	45.99 ± 17.50 a,b	7.82

10 µg/ml of expressed phage were used in every treatment

N, number of bioassays (12 larvae/replicate); SD, standard deviation; SEM, Standard Error Mean.

¹ Results indicated with the same letter have no statistical difference between treatments (p < 0,05).



to multiple sequence alignments (Figure 7), the Cry8Ka toxins studied here had all of the highly conserved residues (highlighted in green colour) except for residue R, which was substituted to S in position 271. There seems to be no obvious functional consequence of this substitution.

In addition, molecular homology analyses performed using three-dimensional models constructed in this study showed identical folding to Cry8Ka5 such that Cry toxins were included in the group of three-domain Cry toxins. The structural alignments using Cry8Ka1 and Cry8Ka5 protein sequences indicated the three best results showing 34.7; 35.4 and 35.7% of identity with Cry8Ea1 (3EB7.pdb) [16], Cry3Aa (1DLC.pdb) [41] and

Cry3Bb1 (1JI6.pdb) [42], respectively. Our proposed model for Cry8Ka toxins was obtained from structural alignments submitted to Modeller (as detailed in Materials and Methods) and is illustrated in Figure 6. The final Cry8Ka1 and Cry8Ka5 structural models were chosen based on similar and uniform distribution of amino acids in a Ramachandran plot (93% favourable residues, 6.2% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for Cry8Ka1 and 92.6% favourable residues, 6.6% residues in allowed locations; 0.8% unfavourable residues for the shuffled Cry8Ka5) and on DOPE analysis. The DOPE residue-by-residue energy profiles for the final models (not shown) suggested that the models were of high quality.

The Cry8Ka1 and Cry8Ka5 mutant models had the same backbone structure and differed only in the mutated side chains. Due to the very low sequence identity found in the N- and C-termini when compared to the template, these regions were not modelled. As shown in Figure 6, the Cry8Ka toxin model presents the three conserved domains (I, II and III) typical of Cry toxins. The positions of residues replaced in the shuffling process can be better seen in Figures 6b-d, in which the individual domain structures are illustrated. All mutations are localised at the surface and exposed to the solvent. In the Cry8Ka1 model, domain I consists of residues 1-238, domain II contains residues 239-450 and domain III includes residues 451-594.

4. Discussion

In this work, the *cry8Ka1* gene was used as a substrate for DNA shuffling. This gene was isolated from the *B. thuringiensis* S811 strain [25] and codes for a 668 residue protein with the conserved three domain structural architecture typical of Cry toxins. The Cry8Ka1 toxin has been shown to be moderately toxic to *A. grandis*, and our research focused on the molecular improvement of the Cry8Ka1 toxin. The challenge was to introduce changes in the primary structure and thereby achieve improved insecticidal activity.

The combined strategy using DNA shuffling and phage display techniques resulted in a combinatorial library containing 10⁵ variants. The efficiency of the DNA shuffling approach to improve specificity and to broaden the spectrum of insects controlled by Bt toxins was first mentioned in experiments using the *cry1Ca* gene. Screening of a *cry1Ca*-shuffled library for activity against *Spodoptera frugiperda* revealed a Bt toxin variant showing 3.8-fold higher LC₅₀ when compared to the wild-type. In other experiments, Cry1Ca variants tested against *S. exigua* showed 6.7-fold higher activity than wild-type Cry1Ca. In addition, the same variants were active against both *Heliothis zea* and *S. exigua* [20].

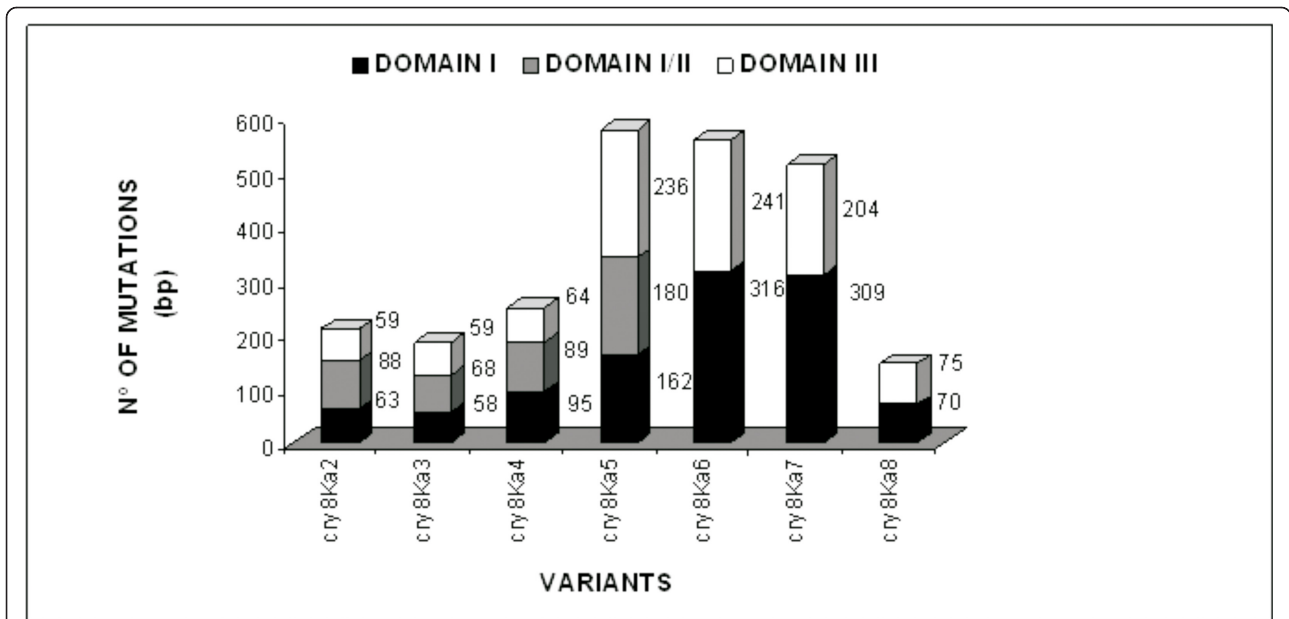


Figure 5 Graphic representation indicates number of substitutions in the nucleotide sequences, distributed among the three domains for that seven selected *cry8Ka1* variants. The sequences of variants named *cry8Ka2*, *cry8Ka3*, *cry8Ka4*, *cry8Ka5*, *cry8Ka6*, *cry8Ka7* and *cry8Ka8* were fully sequenced and aligned using *cry8Ka1*. In black color, indicate domain I, in gray color, domain II and white color, domain III. In each variant a large number of nucleotide mutations was observed. The *cry8Ka5* variant contained 578 nucleotide substitutions in total.

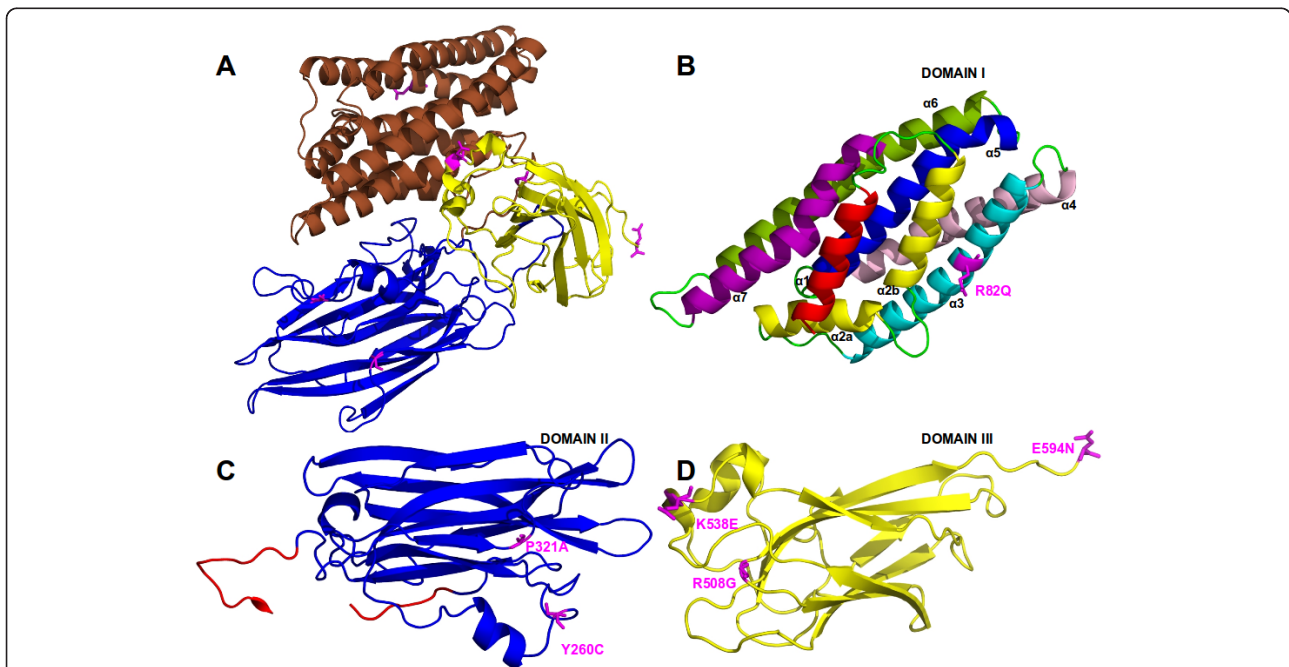
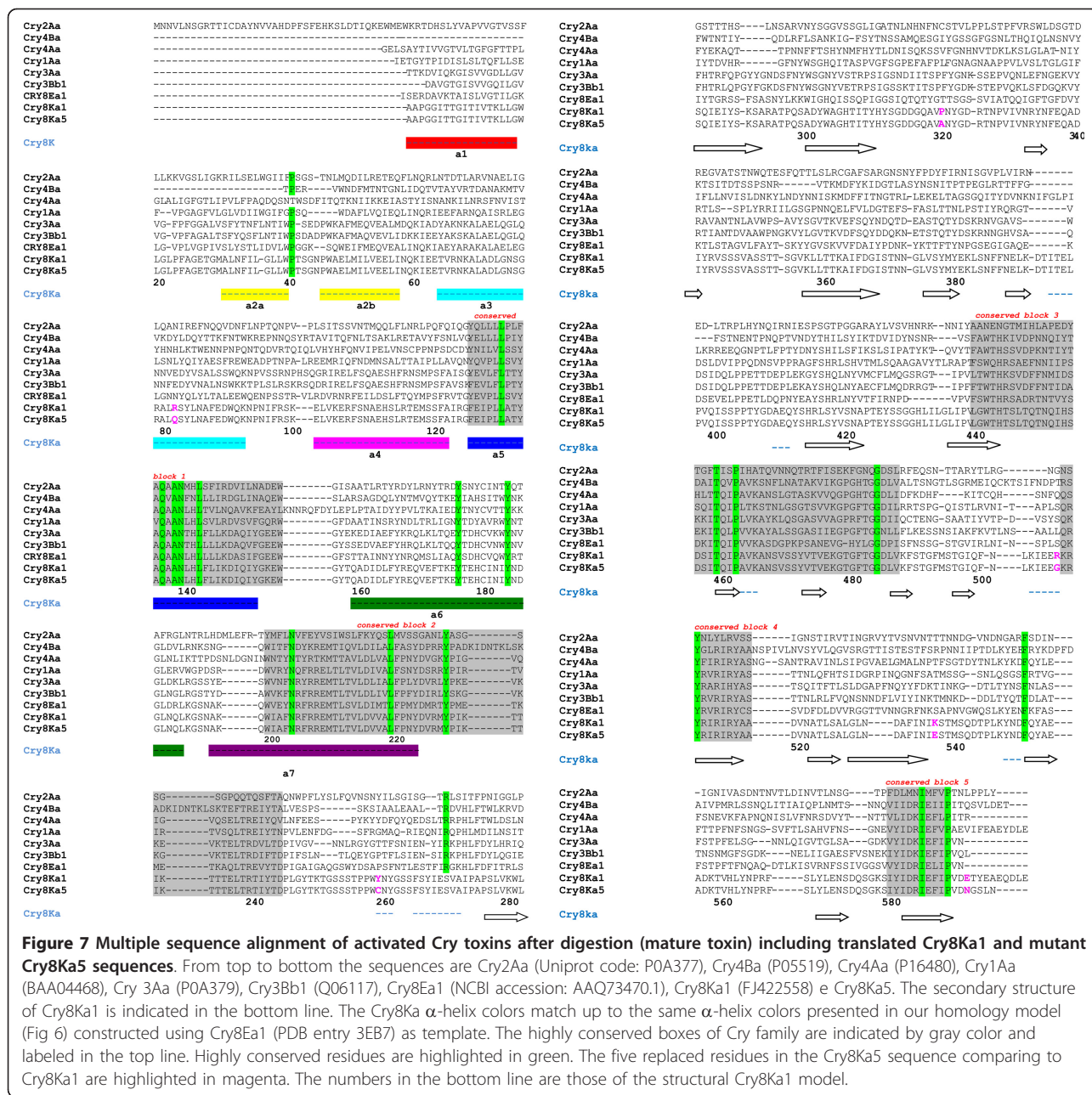


Figure 6 Ribbon diagrams of the Cry8Ka1 structural model produced with PyMOL [39] and indicating the positions of the amino acid substitutions obtained in Cry8Ka5 toxin. A: The whole molecule showing the three domains (Domain I in brown color, II in blue color and III in yellow color). Cry8Ka5 substituted residues are highlighted in magenta color. In B, Domain I, composed of eight α -helices, is shown. The position of the R82Q mutation is indicated on helix α_3 (also indicated in Fig 7). In C, the anti-parallel β -sheets of domain II, indicating two substituted residues in Cry8Ka5 toxin: Cys and Ala in positions 260 and 321, respectively. In D, the jelly-roll β -sheets of Domain III, and the three other mutated residues: Gly at position 508, Glu at 538 and Asn at 594.



When screening genes for naturally occurring genetic variability or for artificially generated variability as performed in this study, the major concern is the choice of an optimal selection system that guarantees efficient screening of mutants containing the desired characteristics. The technique of displaying molecules on the phage surface [43-45] has been widely applied to select antibody chains, to identify receptor ligands, to define enzyme substrates, and to select anticoagulant activities and proteinase inhibitors [46-49]. In addition, phage display systems have proven to be a useful tool for studying toxins with binding domains such as Cry toxins

[24]. In the present study, we applied phage display methodology using M13 filamentous phage; we chose to couple this strategy to DNA shuffling because Cry toxins are AB-type toxins, which have been shown to be suitable targets for directed evolution [50,14]. As discussed in a previous study from our group [24], similar studies have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. In this study, the bioassays using Cry8ka5 recombinant protein confirmed the molecule's effectiveness and emphasised the need to establish better conditions to help overcome constraints to successfully express Cry protein variants

with the M13 phage display system. The mortality found from negative control in the first screening bioassays was due the M13 phage system. The bioassays using boll weevil artificial diet as here described represent a routine in our researches aimed to investigate the potential of novel molecules against boll weevil larvae. However, it is clear that for biotechnology purpose, e.g. production of insect-resistant plants, further tests must be conducted using boll weevils in presence of the genetic modified plants containing the selected variant genes. In the present work the selected Cry8Ka5 mutant toxin with improved activity against the insect target had six residue substitutions distributed throughout the three domains and a shorter N-terminal end than the wild-type Cry8Ka1. Because the selected mutant toxin was 3.1 times more active than the parental Cry8Ka1 toxin and 81.3 times more active than the Cry1Ia12 toxin [25], we concluded that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil.

We modelled the three-dimensional structures of the Cry8Ka1 toxin and the Cry8Ka5 mutant toxin by using the three-dimensional crystal structure of activated Cry8Ea1 (3EB7.pdb) toxin [16] as templates for homology modelling. Cry8 and Cry3-type toxins are active against a number of coleopteran pests; however, Cry8Ea1 showed specific toxicity against *Holotrichia parallela* (Scarabaeidae) [16]. Although Cry coleopteran toxins have not been as extensively studied as Cry1A, it has been shown that, as for Cry1A lepidopteran-specific toxins, the pore formation activity of Cry3 toxins depends on the formation of an oligomeric pre-pore structure after the interaction of protoxins with BBMV midgut cells from the Colorado potato beetle [51]. One previously reported theory is that the helix bundle in domain I is directly responsible for membrane penetration and pore formation after Cry toxins bind the specific receptors on the surface of the insect midgut [16]. In support of this theory, our Cry8Ka toxin models confirmed the presence of a seven-helix bundle, as has been generally described, and we also visualised the helix $\alpha 2$ separated in two helices (Figure 7), which is conserved among Cry toxin structures [16]. According to previous authors, the $\alpha 2$ helix break could be related to the mobility of the lid on the helix bundle during correct receptor recognition. At that moment, the lid comprising helix $\alpha 2b$ and loop $\alpha 2b$ - $\alpha 3$ must be removed from the top of the helix bundle to release the helical hairpin $\alpha 4$ - $\alpha 5$. Based on mutagenesis studies, the same authors discussed the significance of the conserved Pro-41 residue (residue number correspondent to primary structure of the Cry8Ka toxins - Figure 7) in maintaining the stability of Cry8Ea1. According to a more recent model

proposed for the initiation of Cry toxin domain disassembly, Pro-41 could be the key in facilitating the lid-opening starting from a stable conformation [16]. Based on these structural analyses, we suggest that the DNA shuffling strategy applied here was able to generate mutations without causing conformational changes that could affect the stability of a new toxin. Regarding the involvement of the domains II and III in the Cry toxin mechanism, a combination of site-directed mutagenesis and membrane binding studies [52] showed that the exposed loops of domain II on Cry3A are involved in receptor binding and that mutations can affect binding, resulting in increased or decreased toxicity. Loop 1 and loop 3 in domain II of Cry3A are directly involved in receptor binding. In addition, the same authors suggested that the loop III region might play a role in irreversible binding or membrane insertion. One of the mutations created by the cry8Ka1 gene shuffling procedure is localised in loop 3 of domain II in Cry8Ka5. However, neither of the two mutations in domain II of Cry8Ka5 is located in these loops.

Our results indicated that most structural features of the highly conserved residues are present in the Cry8Ka modelled structures. Given that our experiments to determine the specific receptors for Cry8Ka1 toxins are currently in development, the use of the molecular modelling results to explain how differences in toxicity could be caused by the specific residues changes is somewhat speculative. A cDNA library constructed using intestinal material from cotton boll weevil larvae will be used to screen receptor proteins. We hope that studies involving receptor-toxin interactions will allow us to elucidate the binding differences and increased toxicity related to the replaced residues in the three domains of the Cry8Ka5 mutant.

5. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated that the strategy of combining DNA shuffling and phage display was able to effectively select novel toxins that are more highly active against the cotton boll weevil. With its improved toxicity against the cotton boll weevil, a major cotton insect-pest, the *cry8Ka5* gene has the potential to be used in plant transformation experiments to produce genetically modified cotton plants that are *A. grandis*-resistant. Our modelling studies show conservation of core residues in the Cry8Ka5 toxin structure, suggesting that the mutations altering activity should not affect molecular stability.

6. Acknowledgments

The present work was performed by grants from Brazilian government (CNPq, CAPES and EMBRAPA). The authors thank: Dr. Andréa Maranhão, (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage display approaches.

Author details

¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, Brasil. ²Embrapa Algodão - Campina Grande, PB, Brasil. ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB- Final W5 Norte -Brasília, DF, Brasil. ⁴Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK. ⁵Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. ⁶Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB, Brasília, DF, Brasil. ⁷Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos-UFPB, Curitiba, PR, Brasil.

Authors' contributions

GRO have carried out all experiments involving in vitro directed molecular evolution studies, and also carried out experiments aiming overexpression of recombinant proteins and its application into bioassays; MCMS carried out design and biopanning experiments, molecular modeling studies and involved in drafting the manuscript; WAL participated of constructions of structural models and drafted the manuscript; EYTN contributed to molecular characterization of the selected molecules; AAPF participated of sequence analysis, protein modeling, and have been involved in drafting the manuscript; MAB carried out the immunoassays; DSLS contributed to analysis and interpretation of data; JEGJ carried out BBMV proteins preparation and participated to Phage display experiments; JDASJ participated in the design of the study, sequence analysis, vector construction for bacterial expression, drafting the manuscript and performed the statistical analysis DJR has been participated in the molecular structural studies and involved in revising of the manuscript critically; HBR participated of DNA shuffling experiments and bioassays; CRS coordinated studies and obtain recombinant protein expression; MFGS coordination of the research group carried out all design experiments and data analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 5 April 2011 Accepted: 9 September 2011
Published: 9 September 2011

References

1. Silvie P, Leroy T: *Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro.Cascavel: COODETEC* 2001.
2. Scataglini MA, Lanteri AA, Confalonieri VA: Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica* 2006, **126**:353-362.
3. Martins WFS, Ayres CFJ, Lucena WA: Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cotton pest in the new World. *Genet Mol Res* 2007, **6**(1):23-32.
4. Nakasu EYT, Firmino AAP, Dias SC, Rocha LT, Ramos HB, Oliveira GR, Lucena WA, Carlini CR, Grossi-de-Sa MF: Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. *J Invertebr Pathol* 2010, **104**(3):227-230.
5. Layton B: **Boll weevil eradication effort.**[<http://deltafarmpress.com/boll-weevil-eradication-effort/>].
6. Johnson J, Kiawu J, MacDonald S, Meyer L, Rosera E, Skelly C: **THE UNITED STATES AND WORLD COTTON OUTLOOK.**[http://www.usda.gov/oce/forum/2011_Speeches/2011-Cotton.pdf].
7. James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA; Executive Summary; 2008.
8. Bravo A, Soberón M: How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 2008, **26**(10):573-579.
9. James C: *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* Ithaca: ISAAA; Executive Summary; 2009.
10. Höfte H, Whiteley HR: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989, **53**:242-255.
11. Silva-Werneck JO, Ellar DJ: Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol* 2008, **98**:320-328.
12. Pigott CR, Ellar DJ: Role of Receptors In *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:255-281.
13. Soberon M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A: Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science* 2007, **e318**(5856):1640-1642.
14. Fernández LE, Gómez I, Pacheco S, Arenas I, Gilla SS, Bravo A, Soberón M: Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides* 2008, **29**:324-329.
15. Zhang X, Candau M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr: A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:9897-9902.
16. Guo SY, Ye S, Song FP, Zhang J, Wei L, Shu CL: Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J Struct Biol* 2009, **168**:259-266.
17. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J: Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci* 2006, **103**:15196-15199.
18. Stemmer WPC: Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Lett Nat* 1994, **370**:389-391.
19. Zhao H, Arnold FH: Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:1307-1308.
20. Lassner M, Bedbrook J: Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**:152-156.
21. Rosic NN, Huang W, Johnston WA, James J, Devos JJ, Gillam EMJ: Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling. *Gene* 2007, **395**:40-48.
22. Grossi-de-Sa MF, Magalhães MTQ, Silva MS, Silva SMB, Dias SC, Nakasu EYT, Brunetta PSF, Oliveira GR, Oliveira-Neto OB, Oliveira RS, Soares LHB, Ayub MAZ, Siqueira HAA, Figueira ELZ: Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a CryIIa-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol* 2007, **40**:773-782.
23. Willats WGT: Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 2002, **50**:837-854.
24. Craveiro KIC, Gomes Júnior JE, Silva MCM, Macedo LLP, Lucena WA, Silva MS, Antonino de Souza JD Júnior, Oliveira GR, Magalhães MTQ, Santiago AD, Grossi-de-Sa MF: Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. *J Biotechnol* 2010, **145**:215-221.
25. Grossi-de-Sa MF, Oliveira GR, Silva MCM, Rocha TL, Magalhães MTQ: Molécula de ácido nucléico isolada, construção gênica, vetor, célula transgênica, método para obtenção de uma célula e de uma planta transgênica, polipeptídeo isolado e purificado, composição pesticida biodegradável, método para o controle de uma praga, método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga. *INPI Patent 012090001018* 2009.
26. Wolfsberger M, Luethy P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, Giordana B, Hanozet GM: Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol* 1987, **86**:301-308.
27. Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
28. Andris-Widhopf J, Rader C, Steinberger P, Fuller R, Barbas CF III: Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. *J Immunol Methods* 2000, **242**:159-181.
29. Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ: *Phage Display: A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
30. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970, **227**:680-685.
31. Finney DJ: *Probit Analysis* Cambridge: Cambridge University Press; 1971.
32. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
33. Staden R: The Staden Sequence Analysis Package. *Mol Biotechnol* 1996, **5**:233-241.
34. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
35. Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
36. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(1):235-242.
37. Sali A, Blundell TL: Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J Mol Biol* 1993, **234**:779-815.

38. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM: **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *J Appl Crystallogr* 1993, **26**:283-291.
39. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.** Schrödinger, LLC.
40. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **62**:775-806.
41. Li J, Carrol J, Ellar DJ: **Crystal structure of insecticidal α -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution.** *Nature* 1991, **353**:815-821.
42. Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L: **Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*.** *Acta Crystallogr Sect D* 2001, **57**:1101-1109.
43. Kasman LM, Lukowiak AA, Garczynski SF, McNall RJ, Youngman P, Adang MJ: **Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:2995-3003.
44. Vilchez S, Jacoby J, Ellar DJ: **Display of Biologically Functional Insecticidal Toxin on the Surface of λ Phage.** *Appl Env Microbiol* 2004, **70**:6587-6594.
45. Pacheco S, Gómez I, Sato R, Bravo A, Soberón M: **Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage.** *J Invertebr Pathol* 2006, **92**:45-49.
46. Barbas CF III, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA: **Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem.** *Proc Natl Acad Sci* 1992, **89**:4457-4461.
47. Wang CI, Yang Q, Craik CS: **Isolation of a high affinity inhibitor of urokinase-type plasminogen activator by phage display of ecotin.** *J Biol Chem* 1995, **270**:12250-12256.
48. Kiczak L, Kasztura M, Koscielska-Kasprzak K, Dadlez M, Otlewski J: **Selection of potent chymotrypsin and elastase inhibitors from M13 phage library of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI).** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1550**:153-63.
49. Maun RH, Eigenbrot C, Lazarus RA: **Engineering Exosite Peptides for Complete Inhibition of Factor VIIa Using a Protease Switch with Substrate Phage.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21823-21830.
50. Ishikawa H, Hoshino Y, Kawahara T, Kitajima M, Kitami M, Watanabe A, Bravo A, Soberon M, Honda A, Katsuro Yaoi K, Sato R: **A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*.** *Mol Biotechnol* 2007, **36**:90-101.
51. Rausell C, García-Robles I, Sánchez J, Muñoz-Garay C, Martínez-Ramírez AC, Real MD, Bravo A: **Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say).** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1660**:99-105.
52. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH: **Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop.** *FEES Lett* 2000, **473**:227-232.

doi:10.1186/1472-6750-11-85

Cite this article as: Oliveira et al.: Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *BMC Biotechnology* 2011 11:85.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer

Kilvia I.C. Craveiro^{a,b,c}, José Edilson Gomes Júnior^{a,b}, Maria Cristina M. Silva^a, Leonardo L.P. Macedo^{a,d}, Wagner A. Lucena^{a,e,f}, Marília S. Silva^g, José Dijair Antonino de Souza Júnior^{a,b}, Gustavo R. Oliveira^{a,e,i}, Mariana T. Quezado de Magalhães^{a,e}, Antônio D. Santiago^h, Maria Fatima Grossi-de-Sa^{a,d,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^c Embrapa Transferência de Tecnologia, PqEB-Final Av. W5 Norte, CEP 70770-901, Brasília, DF, Brazil

^d Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916-Av. W5 Norte, CEP 70790-160, Brasília, DF, Brazil

^e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43421, CP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^f Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz 1143, Centenário, CP 174, Campina Grande, PB, Brazil

^g Embrapa Cerrados, BR 020 Km 18, CP 08223, CEP 73310-970, Planaltina, DF, Brazil

^h Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar 3250, Jardins, CP 44, CEP 49025-040, Aracaju, SE, Brazil

ⁱ Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2009

Received in revised form 3 November 2009

Accepted 12 November 2009

Keywords:

Telchin licus licus

Bacillus thuringiensis

Saccharum officinarum

Brush Border Midgut Vesicles

Phage-display

Molecular modelling

ABSTRACT

Sugarcane giant borer (*Telchin licus licus*) is a serious sugarcane pest in Americas whose endophytic lifestyle hampers effective chemical and biological controls. Therefore, development of alternative control methods is extremely important. Envisaging development of transgenic plants resistant to this pest, we investigated the effect of the *Bacillus thuringiensis* Cry protein Cry1Ia12synth (truncated protein lacking C-terminus with plant codon usage) and variants against *T. l. licus*. *cry1Ia12synth* gene was used to generate mutated variants, which were screened for toxicity toward *T. l. licus*. For that purpose, an innovative technique combining *cry* gene shuffling with phage-display was used to build a combinatorial library comprising 1.97×10^5 Cry1Ia12synth variants. Screening of this library for variants binding to *T. l. licus* Brush Border Midgut Vesicles led to the identification of hundreds of clones, out of which 30 were randomly chosen for toxicity testing. Bioassays revealed four variants exhibiting activity against *T. l. licus* as compared to the non-toxic Cry1Ia12synth. Eight single substitutions sites were found in these active variants. Based on theoretical molecular modelling, the probable implications of these mutations are discussed. Therefore, we have four genes encoding Cry1Ia12synth variants active against *T. l. licus* promising for future development of resistant transgenic sugarcane lines.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite technological advances, sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) culture still faces several phytosanitary problems and plant predators. Sugarcane giant borer, *Telchin licus licus* (Drury, 1773) (Lepidoptera: Castniidae), is one of the most important insect pests of the sugarcane crop, occurring in several countries of the Americas (Mendonça et al., 1996). The *T. l. licus* caterpillar develops inside the sugarcane stem, survives from one season to the next and causes significant annual economical losses (Mendonça, 1982). This endophytic lifestyle hampers the effectiveness of chemical,

mechanical and biological control methods. The damage caused by this insect pest involves destruction of the basal internodes, reduction of sucrose, and formation of galleries that may compromise the entire diameter of the stem. This facilitates secondary infections by other insects and even more frequently by microorganisms (Mendonça et al., 1996). Therefore, the search for new alternatives for the control of this pest is of great importance for sugarcane producers.

In this context, a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) encoded entomotoxic protein (Cry) has been investigated for potential control of sugarcane giant borer neonate larvae. *Bt* is an aerobic, gram-positive bacterium that synthesizes crystalline inclusions during its sporulation that are composed of one or more Cry toxins and/or Cyt toxins (Höfte and Whiteley, 1989; Silva-Werneck and Ellar, 2008). Cry toxins are presently classified into 58 types (Cry1–Cry58) and many sub-types (e.g. Cry1Aa and Cry1Ba) based on their amino acid sequence similarity. They are active against a limited number of

* Corresponding author at: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB-Final W5 Norte s/n, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil.
Tel.: +55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi-de-Sa).

susceptible insect species (including lepidopterans, coleopterans and dipterans) and also against nematodes (Bravo and Soberón, 2008). A major group of Cry toxins is the three-domain (3D)-Cry family, members of which share similarities in sequence and structure. At least two different hypotheses have been proposed to explain the mode of action of these toxins, one relating to formation of pores in the target insect midgut and the other involving signal transduction. For both models, the first step is similar, i.e. the crystals are ingested by the larvae and solubilised in the midgut into protoxins. These are cleaved by midgut proteases to give rise to an active 60 kDa 3D-Cry toxin. The activated toxin binds to a cadherin receptor that is located in the midgut microvilli (Bravo and Soberón, 2008). The pore formation model suggests that this interaction with a cadherin receptor facilitates the proteolytic removal of the Cry α 1-helix, triggering toxin oligomerisation that results in pore formation, causing larval death. In contrast, the signal transduction model proposes that binding of monomeric toxin to a cadherin receptor activates an adenyl cyclase/protein kinase A magnesium-dependent signalling pathway, resulting in cell lysis (Bravo and Soberón, 2008; Zhang et al., 2006).

The spectrum of insects controlled by *Bt* can be broadened by directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling (Lassner and Bedbrook, 2001). DNA shuffling coupled with the phage-display technique has been valuable for the generation of genetic diversity and for selection of variants showing binding affinity to specific protein targets. DNA shuffling is an *in vitro* recombination method that uses small homologous DNA sequence fragments as substrates for PCR reactions, aiming to produce populations of gene variants (Stemmer, 1994; Zhao and Arnold, 1997). This technique has been used for several applications in different fields, including the generation of new molecules conferring resistance to insect pests (Patten et al., 1997). The phage-display approach involves the presentation of peptide and protein libraries on the surface of phage particles for facilitated selection of proteins with high affinity and specificity for a determined target (Willats, 2002).

In a previous study, it was reported that Cry11a12 protein exhibits considerable toxicity against the lepidopteran fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), indicating a potential for activity against other lepidopteran species (Grossi-de-Sa et al., 2007). Since the *cry11a12* gene was isolated by our research group and our bank of *cry* genes is still under construction, the *cry11a12* gene was therefore used to initiate the prospection and development of Cry toxins against *T. l. licus*. For this purpose, the nucleotide sequence of the original *cry11a12* gene was first changed to accommodate plant codon usage, resulting in *cry11a12synth*. Considering that Cry11a12synth is not toxic to *T. l. licus*, the aim of this work was to use the *cry11a12synth* gene to generate and select protein variants with toxicity towards *T. l. licus*. Then, DNA shuffling coupled with phage-display was used to generate a *cry11a12synth* combinatorial library. Screening of this combinatorial library for *cry11a12synth* variants that bind to Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) of *T. l. licus* resulted in the identification of new *cry11a12synth* molecules with entomotoxicity towards sugarcane giant borer larvae.

2. Materials and methods

2.1. Midgut dissection

T. l. licus second and third instar larvae, available in the field solely during part of sugarcane season, were collected in a sugarcane plantation in Maceió, AL, Brazil. The larval midguts were extracted and transferred to a microcentrifuge tube with MET buffer (300 mM mannitol, 5 mM EGTA, 17 mM Tris, pH 7.5) containing 1 mM PMSF. Then, midguts were centrifuged at 2500 \times g for 5 min at 4 °C, the pellet was washed twice with MET buffer. The

resulting pellet, enriched with midguts, was stored at –80 °C until use.

2.2. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMVs)

Preparation of BBMVs from the dissected midguts of *T. l. licus* larvae was performed by using the precipitation method described by Wolfersberger et al. (1987). The concentration of BBMVs proteins was determined by the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as the standard for the calibration curve.

2.3. *cry11a12synth* gene

Previously, the *B. thuringiensis* S811 Brazilian strain, obtained from the collection of EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology, was used to isolate the *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) (GenBank accession no. AY788868). For the present work, the original *cry11a12* nucleotide sequence coding solely for the truncated toxin (lacking the C-terminus, i.e. consisting of the N-terminus and the domains I–III) was changed in order to accommodate plant genetic codon usage and named *cry11a12synth*. The *cry11a12synth* gene (1944 bp) was synthesized by Epoch Biolabs, Texas, US and cloned into the pBluescript II vector (Stratagene). The resulting sequence of *cry11a12synth* gene was deposited in the NCBI gene databank under accession number FJ938022.

2.4. DNA shuffling

First, the *cry11a12synth* gene was excised from the pBluescript II harbouring vector by digestion at 37 °C for 16 h under the following conditions: 5 μ g plasmid DNA, 10 U *Not* I (Promega), 20 U *Sal* I (New England Biolabs), 1 \times Buffer D (Promega), 10 μ g/mL BSA, in a 20 μ L final volume. The digestion products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis and the fragment corresponding to the *cry11a12synth* insert (1944 bp) was excised and purified from the agarose gel using the GeneClean II Kit (Bio 101). Then, 10 μ g of the purified *cry11a12synth* gene was digested with 12.5 U of DNase I (Invitrogen) at 15 °C for 15 min and then interrupted by addition of 5 μ L of 0.5 M EDTA. Resulting fragments of 30–50 bp were jointly purified from a 2.5% agarose gel by using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Ten microlitres of the pool of purified fragments was used as template in a PCR without primers in a 25 μ L final volume containing 0.4 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄ and 2.5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 5 \times Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity buffer. The conditions of the primerless PCR were: 2 min 95 °C; 44 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with a 5 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 7 min at 72 °C. The products of the primerless PCR (1.5 μ L) were used as template for a second PCR, containing the forward primer Cry11a12synthFOR (5'-CCCGG-CCCAGGCGGCCATGAACTCAAGAAC-3') and the reverse primer Cry11a12synthREV (5'-CCGGCCGGCCTGGCCTTCGTAAGTAACTTC-3'). Both primers encode a *Sfi* I site, which is adequate for later cloning into the pCOMB3X phagemid (Andris-Widhopf et al., 2000). The second PCR, performed in a 100 μ L final volume, contained 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 0.8 μ M each primer, 5 U *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) and 5 U Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), in 1 \times Platinum *Taq* Buffer. The conditions for the second PCR were: 2 min 95 °C; 10 cycles: 30 s 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C; followed by 14 cycles: 1 min 95 °C, 1 min 42 °C and 1 min 72 °C (with 20 s increase in extension time per cycle); with a final step of extension for 10 min at 72 °C. The second PCR product corresponding to the DNA shuffling product was analysed by 1% agarose gel electrophoresis

and the only band of approximately 1944 bp, corresponding to a population of *cry11a12synth* variants, was excised and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101).

2.5. Phage display combinatorial library construction

The DNA shuffling product and the pCOMB3X phagemid were both digested with the restriction enzyme *Sfi* I. The resulting digestion products were separated by agarose gel electrophoresis and purified with the GeneClean II Kit (Bio 101). The purified DNA shuffling product (1 µg) was ligated into the pCOMB3X phagemid (3.5 µg) in a reaction containing 18 U T4 DNA Ligase (Invitrogen) in 200 µL final volume. The ligation product was dialysed, lyophilised, dissolved in 15 µL H₂O and then fractionated into five aliquots. Each aliquot containing 3 µL was used to transform 60 µL *E. coli* XL1-Blue electrocompetent cells (Stratagene). The procedure was repeated five times and the product of all the bacterial transformations, harbouring the phagemids encoding *cry11a12synth* gene variants, were cultivated for 1 h at 37 °C in SB medium (1% MOPS, 2% yeast extract, 3% tryptone, pH 7.0) containing carbenicillin at 20 µg/mL and tetracycline at 10 µg/mL. Afterwards, carbenicillin was added to 30 µg/mL and the cultivation proceeded for 1 h at 37 °C. M13 fusion phages were then produced by the sequential addition of pre-warmed SB medium at 37 °C, carbenicillin to 38 µg/mL, tetracycline to 7.75 µg/mL and 10¹² plaque-forming units (pfu)/mL of helper phage (VCSM13 Stratagene). The culture was incubated for 2 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. After adding 70 µg/mL kanamycin, the culture was incubated for 16 h at 37 °C under agitation at 250 rpm. The resulting M13 phages consisted of fusions between protein III of the phage capsid coding region and the *cry11a12synth* gene. In order to determine the library titre, an aliquot of the original culture was plated on selective LB-agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH 7.0, containing 1.4% agar and 100 µg/mL carbenicillin). After incubation at 37 °C for 16 h, the number of plaques was counted and used to calculate the library titre.

2.6. Selection of the *cry11a12synth* gene variants (biopanning)

The biopanning procedure was performed as described by Rader et al. (2001), with some modifications. Briefly, at each round, wells in a microtitre plate were coated with BBMV preparation (100 µg) and incubated 16 h at 4 °C. After coating, fusion phages in solution were added and incubated for 2 h at 37 °C. Several washing cycles were performed with PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄ and 1.2 mM KH₂PO₄) containing 0.1% Tween 20. The retained M13 fusion phages were eluted (in 0.2 M glycine, pH 2.2) and used for transfection into *E. coli* cells, to be amplified for further selection rounds. In order to determine the titre of the phage specifically bound to BBMVs that were recovered in each selection cycle, an aliquot of the eluted phage was diluted 100 times and plated onto SB-agar containing 100 µg/mL carbenicillin. The biopanning cycle exhibiting the highest number of colony-forming units (cfus) was taken as the “cycle of enrichment of specifically bound phages”. In this study, the biopanning procedure consisted of five rounds. The clones isolated from the enriched cycles were analysed to verify the integrity of the inserted *cry11a12synth* variant genes via colony PCR, using primers *Cry11a12synth*FOR and *Cry11a12synth*REV. The clones that presented amplicons around 1944 bp in length were further used for expression of *Cry11a12synth* variant proteins.

2.7. Expression of *Cry11a12synth* variants in fusion phage

The *cry11a12synth* variants exhibiting size integrity (1944 bp) and the DNA shuffling parental gene *cry11a12synth* were expressed on the surface of M13 phage. Bacteria harbouring the fusion phage

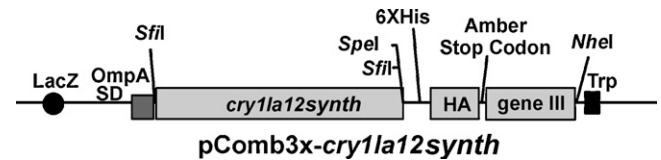


Fig. 1. Schematic representation of the expression cassette of the pCOMB3X-*cry11a12synth* phagemid construct, for expression of the protein *Cry11a12synth* displayed on the surface of filamentous M13 phage. Similar constructs containing shuffled *cry11a12synth* inserts were built to display the *Cry11a12synth* variants on the surface of M13 phage particles. LacZ: LacZ inducible operon. SD: One ribosome binding sites (Shine Dalgarno) give rise to separate polypeptides that are directed by the *pelB* signal peptide to the periplasm. OmpA: Signal peptide. *Sfi*I, *Spe*I and *Nhe*I: Restriction sites. *cry11a12synth*: *cry* gene expressed as a fusion with M13 phage protein III (encoded by the virus). 6XHis: Six histidine-tag coding sequence. HA: Epitope for immunodetection by hemagglutinin antibodies. Amber Stop Codon: TAG stop codon that allows production of free and fusion heterologous proteins. gene III: Coding region of M13 phage Protein III. Trp: Transcription termination. Schematic figure adapted from Scott and Barbas (2001).

were cultivated in SB medium containing 100 µg/mL carbenicillin, 5 µg/mL tetracycline and 100 µg/mL kanamycin for 16 h at 37 °C under stirring (250 rpm). The culture supernatant was collected, precipitated with PEG-NaCl (20% Polyethylene-Glycol 8000, 15% NaCl) for 30 min at 4 °C and then centrifuged at 4300 × *g*. The precipitate was dissolved in TBS (5 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5), centrifuged, and the supernatant (containing the fusion phages) was collected and stored at 4 °C until use. Dot blot analysis by immunodetection of the hemagglutinin (HA) epitope (present in the pCOMB3X phagemid – Fig. 1) fused to the variant proteins was used to evaluate the presence or absence of the *cry11a12synth* variant fusion genes expressed on the phage. The concentration of the recombinant *Cry11a12synth* variant proteins was quantified by ELISA, using a polyclonal rabbit anti-*Cry11* previously obtained in our lab (data not shown).

2.8. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

To assess the toxicity of the fusion phage-expressed *Cry11a12synth* and variants to sugarcane giant borer larvae, bioassays were carried out in 96-well microplates. Each well contained a 50 µL mixture of sterilised liquid artificial diet (2% casein, 1% yeast extract, 6% white sugar, 1% ascorbic acid, 1.1% vitamins, 0.75% Wesson salt mixture, 0.03% cholesterol, 0.03% sodium benzoate, 100 µg/mL ampicillin, 0.2% cholin chloride 50% and water) and 10 µg/mL of phage-expressed *Cry11a12synth* or variants deposited on a solid support (1 cm² of a commercial porous sponge of 0.5 mm thickness). One *T. l. licus* neonate larva was then placed into each well, and the microplate was incubated at 28 ± 1 °C, 80 ± 10% relative humidity and 12 h photoperiod. For the negative control treatment, the artificial diet without addition of *Cry11a12synth* or variants was used. Each treatment was repeated four times and each replicate contained 10 larvae. After 4 days, percent mortality was recorded for each treatment. Statistical analyses were performed to compare the average percent mortalities by using ANOVA and the Tukey's test at the probability level of 5% (Cruz, 2001).

2.9. DNA sequencing

The *cry11a12synth* variant genes that exhibited proteins significant toxicity against *T. l. licus* in the bioassays had their nucleotide sequences determined using a 3130xL Genetic Analyzer automatic sequencer (Applied Biosystems). The forward and reverse primers used for sequencing N and C-terminal coding ends were: MMB4 (5'-GCTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3')

and MMB5 (5'-CGTCCATTGCATTCTTTAAT-3'), respectively. The primers TLL3IF (5'-TGTGTCAGCCAATATATCG-3') and TLL3IR (5'-GTTGCCGTGTGGTTCTCT-3') were designed to determine the variants' intermediate sequences. The nucleotide sequences were analysed using the BLASTn and BLASTx algorithms (Altschul et al., 1997), available on the web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Sequence alignments were performed by the ClustalW program (Thompson et al., 1994), available on the web (<http://www.expasy.org/>). In order to assemble the sequenced fragments and identify the positions of the mutated residues, the variant sequences were compared with the *cry11a12synth* parental sequence using the Staden Package program (Staden, 1996).

2.10. Molecular modelling

Sequence homology to Cry11a12synth was sought in the Protein Database Bank—PDB at the NCBI web site by using BLASTp with default parameters (Altschul et al., 1997). The resulting sequence set was aligned by using MUSCLE (Edgar, 2004) and further analyzed with JALVIEW (Clamp et al., 2004). After manual refinement of the sequence alignment, a homology model of Cry11a12synth and four variants was generated using MODELLER, Version 9.6 (Sali and Blundell, 1993). Default regimes of model refinement by energy minimisation and simulated annealing were employed. A rigorous interactive modelling protocol was adopted in which 20 models were constructed and analysed for each variant alignment. These models were analysed for stereochemical properties by using PROCHECK (Laskowski et al., 1993). When no further improvements could be achieved, the model with the best PROCHECK score was taken as the final model. Diagrammatic representations of the structures were generated by using PyMOL (DeLano, 2002).

3. Results

3.1. Generation of a *cry11a12synth* combinatorial library

The *cry11a12* gene (Grossi-de-Sa et al., 2007) had its nucleotide sequence modified (hereafter referred to as *cry11a12synth*) to conform to plant codon usage, facilitating its future use in plants for transgenic protection against insect pests. Besides changes in codon usage, the *cry11a12synth* gene coding sequence was also reduced to comprise only the active part of the original *cry11a12* molecule. Thus, the C-terminal domain, known to be dispensable for the toxicity of Cry proteins, was deleted. Consequently, the *cry11a12synth* gene is comprised of a 1944 bp open reading frame encoding a predicted protein of 648 residues, whereas the *cry11a12* gene is 2160 bp long and encodes a protein of 719 amino acids. For DNA shuffling purposes, the purified *cry11a12synth* parental gene was fragmented with DNaseI. The resulting fragments in the 30–50 bp range were recombined by primerless PCR. After a subsequent PCR reaction containing suitable primers to recover mutated *cry11a12synth* sequences, a population of *cry11a12synth* variants was obtained and visualised as a 1944 bp band (data not shown). This band was excised from the gel, purified and cloned into the pCOMB3X phagemid between two *Sfi* I restriction sites (Fig. 1). XL-1 Blue *E. coli* cells transformed with the resulting pCOMB3X-*cry11a12synth* constructs generated a phage-display combinatorial library of *cry11a12synth* variants containing 1.97×10^5 colony-forming units (cfu)/mL (Fig. 2).

3.2. Selection of *Cry11a12synth* variants binding to *T. l. licus* BBMVs (biopanning)

In order to select the clones expressing Cry11a12synth variants that bind specifically to the *T. l. licus* midgut, the phage-display com-

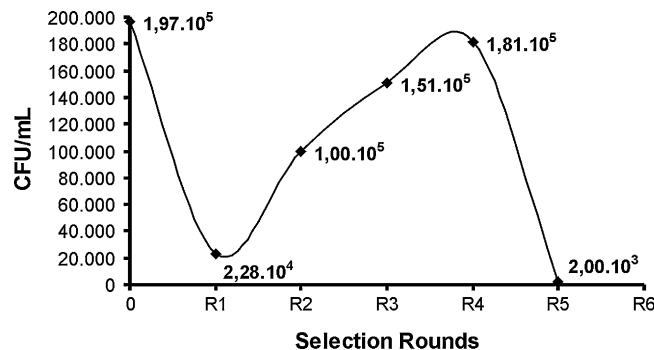


Fig. 2. Biopanning screening of the *cry11a12synth* Phage display combinatorial library for interactions of Cry11a12synth variants with Brush Border Midgut Vesicles (BBMVs) from sugarcane giant borer larvae (*T. l. licus*). The graph shows the number of phage-infected bacterial colonies obtained from each round of biopanning. In the second and third rounds of biopanning occurred the enrichment of recombinant phages displaying Cry11a12synth variants specifically bound to *T. l. licus* BBMVs. The points of the curve indicate the library titres in colony-forming units (cfu)/mL.

binatorial library was used for biopanning. Five selection rounds were performed. The second and third rounds were chosen since they yielded phage showing the highest binding specificity to *T. l. licus* BBMVs (Fig. 2). Four hundred randomly chosen clones from the second and third rounds exhibited amplicons corresponding to the original gene size of 1944 bp (data not show). The expression of the variant proteins was confirmed by dot blot detection of the hemagglutinin (HA) epitope fused to the variant proteins. A reaction signal was observed in the dot blot for most of the analysed clones (data not shown). Thirty clones that showed an expression signal in the dot blot analyses were randomly selected for further analysis of activity against *T. l. licus*.

3.3. Bioassays of the anti-*T. l. licus* activity of *Cry11a12synth* and its variants

Bioassays to test the activity of Cry11a12synth and the 30 selected Cry11a12synth variants against *T. l. licus* were conducted by feeding neonate larvae an artificial diet containing 10 µg/mL of the proteins expressed in fusion with M13 phage. Incubation of larvae either with a Cry11a12synth protein-supplemented diet or a diet with no supplementation (negative control) resulted in a mortality rate of about 25%, indicating that Cry11a12synth protein is not active against *T. l. licus* at the concentration tested (Fig. 3). On the other hand, four out of the thirty Cry11a12synth variants tested had a statistically significant effect on *T. l. licus* as compared to the non-supplemented diet (Fig. 3). The analysis of variance was significant for the mortality rates of these four variants ($F=20.10$; $p<0.0001$). Statistical analysis to compare the average mortality rate revealed that the variants had similar toxicity to each other and higher toxicity than Cry11a12synth (Fig. 3).

3.4. Analysis of the mutations in the active *Cry11a12synth* variants

The four Cry11a12synth variants previously demonstrated to be active against *T. l. licus* were sequenced, and after assembly and alignment analysis, these new variant sequences were deposited in the NCBI gene databank under assigned accession numbers FJ938023 to FJ938026, respectively corresponding to *cry11a12synth* variants 1–4. The *cry11a12synth* gene and its four shuffled variant genes encode proteins of 648 amino acid residues. Sequence alignments comparing parental *cry11a12synth* and its variants identified numerous nucleotide substitutions. Most of these nucleotide substitutions resulted in silent mutations, but a few resulted in amino acid residue substitutions (mutations). No deletions were obtained

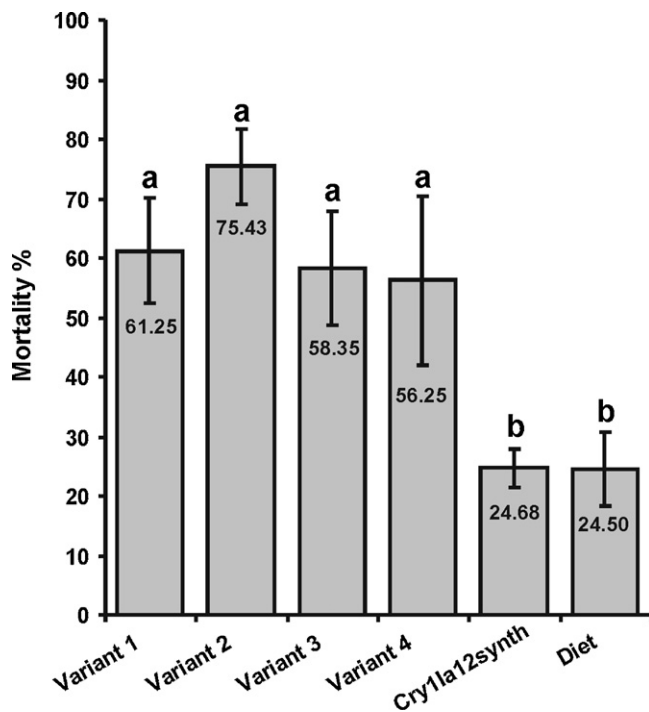


Fig. 3. Bioassays of Cry11a12synth and variants against *T. l. licus*. Treatments consisted of artificial diet supplemented or without Cry11a12synth protein or its variants. Average mortality rates (%) are plotted (vertical bars) and corresponding values are indicated. The standard deviation is indicated for each treatment (vertical lines). Average mortality rate values with different letters differ from each other by the Tukey's test at a probability of 5%.

(Table 1). Most of the changes in amino acid sequence were found in domain I, with a few changes found in domain III and none in domain II (Table 1).

To try to predict the effects of the mutations on structure and function, theoretical models were built for Cry11a12synth and the four variants by using Cry8Ea1 and Cry3Bb1 (PDB entries 3EB7 and 1J16, respectively) (Galitsky et al., 2001; Guo et al., 2009) as templates. Models were chosen for Cry11a12synth and its variants according to PROCHECK analysis. In the template crystal structures chosen (i.e. E3B7 and 1J16) there are no defined atomic coordinates to serve as templates to model N- and C-termini of the Cry11a12synth variant structures. Therefore, the models of the Cry11a12synth variants correspond to residues 62–643 (residue numbers of the Cry primary sequences), lacking the N- and C-termini but containing the three conserved domains of the Cry toxin structure (Fig. 4A).

The theoretical tertiary structure of Cry11a12synth depicts the location of the eight substitutions present in variants 1–4 (Fig. 4A). Three substitutions are located in domain I (Fig. 4A): (i) I116T, in variant 3, located in the loop between alpha2b and alpha3; (ii)

D233N, in all variants except for variant 3, located in helix α 6; and (iii) L266F, in variant 3, located in helix α 7. Two mutations were found in domain III: (i) K580R, in variant 3, located in strand β 16; and (ii) E639G, in variant 1, located in strand β 19.

4. Discussion

The gene *cry11a12*, previously isolated by our group from *B. thuringiensis* S811 strain, encodes a protein proven to be highly effective against the lepidopteran species *S. frugiperda*. In the present work, we generated a combinatorial phage-display library of variants of *cry11a12synth* via DNA shuffling and successfully identified four variants with optimised activity against *T. l. licus*.

In the last decade, directed molecular evolution techniques, such as DNA shuffling, have been employed in the agricultural research to create genes, such as the *cry* genes, encoding insecticidal molecules for the development of transgenic insect-resistant plants (Lassner and Bedbrook, 2001). The DNA shuffling strategy used here was highly efficient for our purposes, as it generated 1.97×10^5 variants of *cry11a12synth*, out of which over 400 bound specifically to *T. l. licus* BBMV. Furthermore, four out of 30 tested variants presented activity against sugarcane giant borer neonate larvae when compared to the non-toxic Cry11a12synth.

In comparison to conventional bacterial expression systems, the phage-display system, in addition to providing soluble, ready-to-use protein, has advantages for the selection of variants that include speed, ease of use and low cost. However, previous studies (Kasman et al., 1998; Marzari et al., 1997) have encountered problems with the functionality of proteins displayed on M13 phage. It was found that the Cry1Aa toxin was not properly displayed, resulting in deletions of the fused protein. Moreover, despite the fact that Cry1Ac toxin displayed by M13 phage retained its toxicity against *Manduca sexta* larvae, there was no binding to functional insect midgut receptors *in vitro*, suggesting structural restrictions of the displayed toxin (Pacheco et al., 2006). In spite of these limitations previously related in the literature, our group apparently established optimal conditions that overcame such constraints to successfully express Cry11a12synth protein variants with the M13 phage-display system.

When considering the four Cry11a12synth variants active against sugarcane giant borer larvae, eight mutation sites of amino acid substitutions were found. Out of these eight, half resulted in substitutions of nonpolar residues, whereas the other half resulted in substitution of charged residues. Moreover, it was observed that most of these mutations were found in domain I of the Cry11a12synth active variants. One of the roles of the Cry domain I is the insertion of the protein into the membrane. Dean et al. (1996) using Y153D, Y153A and Y153R substitutions in Cry1Ab domain I, demonstrated that the negatively charged residue D was less favourable for toxin insertion into membranes than the positively charged R or neutral A residues. Another biological role attributed to Cry domain I is the formation of pores. Girade et al. (2009) demonstrated with Cry1Aa mutations in the α 4 and α 5 helices and the α 3– α 4 and α 5– α 6 adjacent loops that these regions have an important role in the pore formation mechanism. Therefore, mutations located in domain I of the Cry11a12synth variants may have influenced their insertion into the membrane or pore formation in the midgut of *T. l. licus*.

In our work, two mutations in active Cry11a12synth variants were found in domain III, a domain associated with protection of Cry from proteolysis, with receptor binding and with regulation of pore formation (Flores et al., 1997). In this respect, there is evidence that domain III of Cry proteins is involved in binding to membrane proteins of the *Spodoptera exigua* midgut, demonstrating that domain III of Cry1C can play an important role in toxicity to insect pests (de Maagd et al., 1996).

Table 1
Mutations present in Cry11a12synth variants.

Variant	Substitution mutation	Domain
1	D233N	I
	E639G	III
2	D233N	I
3	I116T	I
	L266F	I
	K580R	III
4	M45V	N-terminus
	D233N	I

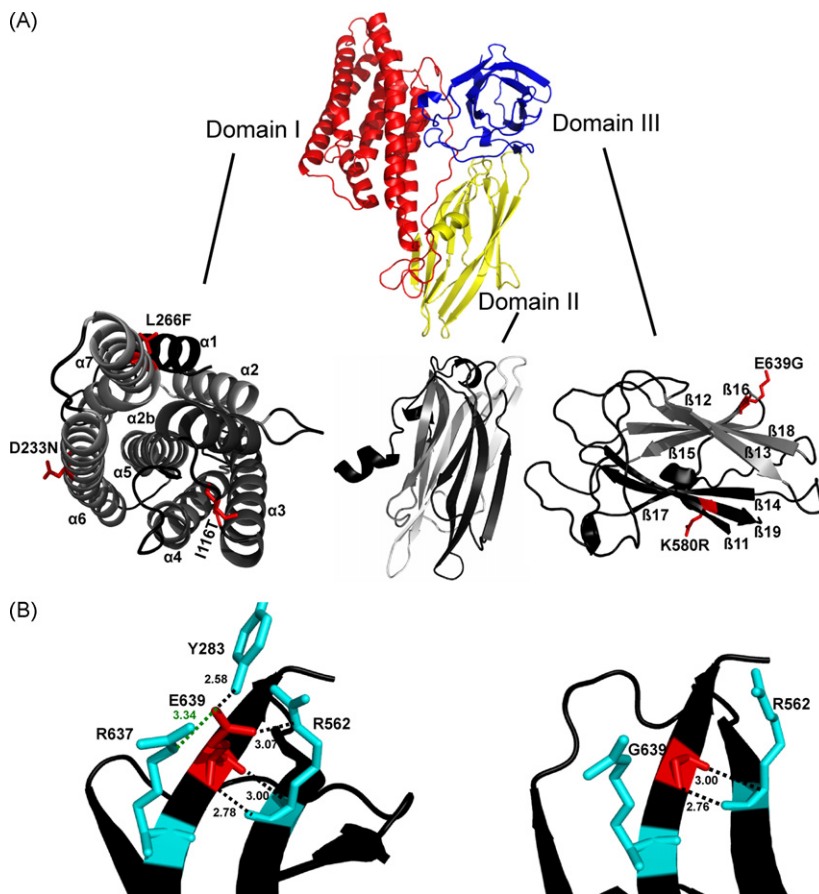


Fig. 4. Theoretical models of Cry11a12synth and variants. (A) A Cry11a12synth ribbon diagram, as viewed using PyMOL, is depicted at the top of panel A. Domain I is shown in red, domain II in yellow and domain III in blue. Separate models of each Cry11a12synth domain is shown in detail at the bottom of panel A. α -helices and β -strands are identified. Amino acid single substitutions present in the variants are coloured in red. The black dashed lines represent hydrogen bonds and the green dashed lines represent salt bridges. (B) Details of an amino acid substitution present in Cry11a12synth variant 1 (right), as compared to the parental Cry11a12synth (left). The variant 1 presents the mutation E639G, located in the β 19 strand in domain III. The model on the left depicts the interactions between residue E639 (in red) and residues Y283 (from block 2), R562 (from block 4) and R637 (from block 5) (in cyan). These interactions are disrupted in Cry11a12synth variant 1 (right).

Taken alongside previous data in the literature, our molecular modelling analysis provides potential explanations for the activity of the four variants:

- (i) In all Cry proteins, there are three conserved blocks, denoted blocks 2, 4 and 5, that are associated with the functionality of the toxins (Schnepf et al., 1998). In reference to the mutation E639G found in variant 1, G639 interacts solely with residue R562 from block 4 through two hydrogen bonds of around 3 Å, whereas in the Cry11a12synth protein, E639 interacts with Y283 from block 2 through a hydrogen bond of 2.58 Å, with R562 from block 4 through three hydrogen bonds of around 3 Å, and with R637 from block 5 through a salt bridge of 3.34 Å (Fig. 4B). Moreover, the mutation E639G of variant 1 is located in the β 19 strand of domain III, a domain associated with protection of the toxin from proteolysis, binding to midgut receptors, regulation of pore formation (Flores et al., 1997) and binding to insect midgut membrane proteins (de Maagd et al., 1996).
- (ii) Variant 2 contains the single mutation D233N. The residue at this position, be it D233 or N233, invariably presents its side chain to the solvent environment. These residues neither interact with nor belong to any region known to be relevant to the entomotoxic activity of Cry proteins. Nevertheless, the substitution of an oxygen from D233 for a nitrogen in N233 makes this spot on the toxin less negative, which might affect the

interactions of the toxin with the solvent environment. To elucidate the role of this mutation in the functionality of variant 2, it would be interesting to perform modelling studies of molecular dynamics in order to better understand the movement of the side chain of residue 233 in relation to simulated changes in environmental conditions. Modelling studies of Cry11a12synth or variant 2 docking to the Cry receptor might also be revealing. Moreover, bench experiments involving site-directed mutagenesis of residue 233 and its consequences on interactions with the receptor and protein toxicity could shed light on the role of this residue in Cry functionality.

- (iii) Three mutations occurring in variant 3 seem to present an interactive effect on the variant's structure, and consequently probably also on the variant's biological activity. Concerning the mutation I116T, the oxygen of T116 interacts with the beta-carbon of residue A120. This residue corresponds to residue A92 from Cry1Ab, which is involved in the insertion of the Cry toxin into the insect midgut membrane (Chen et al., 1995). Regarding the mutation L266F, L266 has its side chain turned towards the residues E455 (domain II), D270 and R262 (domain I). Thus the aromatic ring of F266, which is a less reactive residue than L266, interferes with interactions between domains I and II. With respect to the mutation K580R, both K580 and R580 are turned towards the neighbouring N578, which corresponds to the Cry1Ac N546 residue demonstrated to be related to Cry1Ac toxicity (Xiang et al., 2009).

Since the first 61 residues corresponding to the N-terminal portion of Cry1Ia12synth were not modelled, the effect of the mutation M45V present in variant 4 could neither be modelled nor analysed.

This work presents a pioneering approach towards the generation and selection of new genes to be used in the development of transgenic sugarcane resistant to the giant borer *T. l. licus*, a pest that is extremely resistant to conventional control methods and for which there is no known natural source of resistance. It should be noted that additional experiments, such as site-directed mutagenesis and modelling studies of molecular dynamics and interactions with the receptor are needed to better understand the effects of the mutations present in the Cry1Ia12synth variants on the biological activity of these proteins against *T. l. licus*. It will be also interesting to test these toxins against to others insect pest and non-target beneficial insects. In conclusion, the Cry1Ia12synth variants 1 to 4 are active against sugarcane giant borer larvae and are therefore promising proteins for the future development of transgenic sugarcane resistant to insect pests.

Acknowledgments

The present work was performed with financial support from CNPq, CAPES and EMBRAPA. The authors thank: Dr. Andréa Maranhão (University of Brasília, Brazil) for kindly providing the pCOMB3X phagemid and support about phage-display approaches; Dr. Dan Rigden (University of Liverpool, UK) for critical reading; Mr. Luiz Avelar Brandão Góis (Phytosanity Supervisor, Usina Triunfo, AL, Brazil) for sending us the giant borer larvae and Dr. Eduardo Alano Vieira (EMBRAPA Cerrados, Planaltina, DF, Brazil) for the aid in statistical analyses.

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andris-Widhopf, J., Rader, C., Steinberger, P., Fuller, R., Barbas III, C.F., 2000. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. *J. Immunol. Methods* 242, 159–181.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579.
- Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D.H., 1995. Mutations in Domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270, 6412–6419.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M., Barton, G.F., 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20, 426–427.
- Cruz, C.D., 2001. Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S.G., Klei, V.D., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J., Bosch, D., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537–1543.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.-J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R., 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis—a minireview. *Gene* 179, 111–117.
- DeLano, W.L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System on the World Wide Web.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Flores, H., Soberón, X., Sánchez, J., Bravo, A., 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* 414, 313–318.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr., Sect. D.* 57, 1101–1109.
- Girade, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Scgwartz, J.-L., Masson, L., Laprade, R., 2009. Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin single-cysteine mutants reveals the importance of domain I structural elements in the mechanism or pore formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 575–580.
- Grossi-de-Sa, M.F., Magalhães, M.Q., Silva, M.S., Silva, S.M.B., Dias, S.C., Nakasu, E.Y.T., Brunetta, P.S.F., Oliveira, G.R., Oliveira-Neto, O.B., Oliveira, R.S., Soares, L.H.B., Ayub, M.A.Z., Siqueira, H.A.A., Figueira, E.L.Z., 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 773–782.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D., Rao, Z., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168, 259–266.
- Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242–255.
- Kasman, L.M., Lukowiak, A.A., Garczynski, S.F., McNall, R.J., Youngman, P., Adang, M.J., 1998. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2995–3003.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Lassner, M., Bedbrook, J., 2001. Directed molecular evolution in plant improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 152–156.
- Marzari, R., Edomi, P., Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Selvapandian, A., Bradbury, A., 1997. Phage display of a *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. *FEBS Lett.* 411, 27–31.
- Mendonça, A.F., 1982. A broca gigante *Castnia licus* Drury, 1770 (Lepidoptera: Castniidae) no Brasil. *Saccharum APC*, São Paulo.
- Mendonça, A.F., Viveiros, A.J.A., Sampaio, F.F., 1996. A broca gigante da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep.: Castniidae). *Pragas da cana-de-açúcar. Insetos, Cia., Maceió*, pp. 133–167.
- Pacheco, S., Gómez, I., Sato, R., Bravo, A., Soberón, M., 2006. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 45–49.
- Patten, P.A., Howard, R.J., Stemmer, W.P.C., 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724–733.
- Rader, C., Steinberger, P., Barbas III, C.F., 2001. Selection from Antibody Libraries. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 10.1–10.20.
- Sali, A., Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Releclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Scott, J.K., Barbas III, C.F., 2001. Phage-display Vectors. In: Barbas III, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman, G.J. (Eds.), *Phage Display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2.1–2.19.
- Silva-Werneck, J.O., Ellar, D.J., 2008. Characterization of a novel Cry9Bb d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 320–328.
- Staden, R., 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5, 233–241.
- Stemmer, W.P.C., 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Lett. Nat.* 370, 389–391.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Willats, W.G.T., 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50, 837–854.
- Wolferberger, M., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 301–308.
- Xiang, W.F., Qiu, X.L., Zhi, D.X., Min, Z.X., 2009. N546 in β 18- β 19 loop is important for binding and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 119–123.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9897–9902.
- Zhao, H., Arnold, F.H., 1997. Optimization for DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* 25, 1307–1308.



Short Communication

Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut

Erich Y.T. Nakasu^{a,b}, Alexandre A.P. Firmino^{a,b}, Simoni C. Dias^c, Thales L. Rocha^b, Hudson B. Ramos^b, Gustavo R. Oliveira^b, Wagner Lucena^{a,b}, Célia R. Carlini^a, Maria Fátima Grossi-de-Sá^{b,c,*}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Building 43421, CEP 91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB Final Av. W/5 Norte, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil

^c Universidade Católica de Brasília, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. SGAN 916 Norte Av. W5 Norte-Modulo C-Sala 219, Asa Norte 70790-180 – Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2009

Accepted 29 January 2010

Available online 6 February 2010

Keywords:

Anthonomus grandis

Bacillus thuringiensis

Cry8Ka5

Two-dimensional gel electrophoresis

ABSTRACT

Biotech crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry toxins present a valuable approach for insect control. Cry8Ka5, which is highly toxic to the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*), was used as a model to study toxin–ligand interactions. Three Cry-binding proteins were detected after toxin overlay assays. Following *de novo* sequencing, a heat-shock cognate protein and a V-ATPase were identified, whilst a ~120 kDa protein remained unknown. Additional Cry8Ka5-binding proteins were visualized by two-dimensional gel electrophoresis ligand blots.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) is the major cotton pest in the American continent, causing drop of floral buds and reducing fiber quality. While the adults feed inserting its mouth parts below the plant surface, larval development is strictly endophytic, making the cotton boll weevil one of the most difficult insect pests to control (Metcalf and Metcalf, 1993; Fontes et al., 2006).

Transgenic plants expressing Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) constitute a viable alternative to chemical control. Bt cotton crops adoption rates grow worldwide (James, 2008), providing significant control over Lepidoptera. However, due to *A. grandis* economic importance, the search for Cry toxins specific to this species is as essential as the knowledge on the toxic processes involved.

It is broadly accepted that these toxins achieve their mode of action by interaction with specific receptors, either forming pores or activating a signaling pathway that leads to cell death (for a review, see Piggot and Ellar, 2007). Whereas the mode of action of Cry1A toxins is widely studied in lepidopterans, comparatively little is known about other Cry toxins and insect orders. This infor-

mation is important for development of more specific and effective toxins and also for regulatory purposes. In this context, in coleopterans an ADAM metalloproteinase and a cadherin were identified as Cry3Aa receptors in *Leptinotarsa decemlineata* and *Tenebrio molitor*, respectively (Ochoa-Campuzano et al., 2007; Fabrick et al., 2009).

Previously, the *Cry8Ka1* gene was cloned from *B. thuringiensis* S811, coding a potential toxin for *A. grandis* control (Magalhães, 2006). A library of recombinant genes was developed by DNA shuffling and expressed using phage display technique (Oliveira, 2008). A mutant derived from these libraries, Cry8Ka5, exhibited high toxicity against *A. grandis* larvae. The search for Cry8Ka5 receptors in *A. grandis* is a key to determine specificity and molecular mechanisms involved on toxicity. Aiming the prospect of putative Cry8Ka5 receptors, toxin binding proteins from *A. grandis* midgut were detected on blots of one- and two-dimensional gel electrophoresis.

2. Materials and methods

Cry8Ka5 production was performed by heterologous expression in *E. coli* BL21 (DE3) containing the mutant gene inserted into plasmid pET101/D TOPO (invitrogen), as described (Oliveira, 2008). Toxin biotin-labeling was performed using EZ-Link[®] sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Pierce), using a 10:0.1 toxin:biotin molar ratio, following manufacturer's instructions.

* Corresponding author. Address: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB – Final W5 Norte s/n, CP 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brazil. Tel.: +55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3624.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi-de-Sá).

Third instar larvae were purchased from colonies established at Embrapa – Genetic Resources and Biotechnology. The insects are reared on artificial diet, at 28 °C, 70% relative humidity and 12 h photoperiod (Monnerat et al., 2000). Cotton boll weevil brush border membrane vesicles (BBMV) were extracted as described (Wolfsberger et al., 1987).

Prior to two-dimensional gel electrophoresis (2DE), BBMV proteins (700 µg) were precipitated with 10% Trichloroacetic acid for 1 h on ice. Samples were centrifuged and the pellet washed three times with acetone. Pellets were dissolved in 350 µL solubilization buffer [8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% caprylyl sulfobetaine, 10 mg/mL DTT, 0.05% bromophenol blue, 2% carrier ampholytes (pH 3–10, Plus-one; GE Healthcare)].

For isoelectric focusing (IEF), solubilized BBMV were loaded onto an 18 cm immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3–10, linear, GE Healthcare). IEF was performed on an Ettan IPGphor 3 flat-bed system according to the manufacturer's guidelines (2D electrophoresis principles and methods, GE healthcare). After focusing, strips were transferred onto a 10% SDS-PAGE gel on an Ettan DALT six at 15 °C using a two-phase program: 2 W/gel (45 min) and 17 W/gel for 4 h. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 or electroblotted onto PVDF filters (immobilon P, Millipore).

On SDS-PAGE transfers, 15 µg of *A. grandis* BBMV were subjected to electrophoresis and transferred onto PVDF membranes using a wet system.

Membranes were blocked with blocking buffer (PBS-phosphate-buffered saline, 5% non fat milk powder, 5% glycerol, 0.05% Tween20) and incubated for 12 h at 4 °C in one of the two solutions: (i) blocking buffer (negative control) or (ii) blocking buffer containing 100 ng/mL biotin-labeled Cry8Ka5. The membranes were then washed in PBS and incubated with streptavidin/peroxidase (1:1500) for 2 h at 37 °C and revealed with 0.1% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).

The bands (SDS-PAGE) or spots (2DE) corresponding to Cry-binding proteins were excised manually from gels, destained, dried and digested overnight at 37 °C with trypsin. The solution was dried under vacuum to 10 µL and desalinated using ZipTip® C18 (Millipore). All samples were subjected to the peptide mass fingerprinting (PMF) technique via MALDI-TOF. Data obtained were evaluated using MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) against the MSDB, NCBIInr and Swissprot databases.

Products of digestion from SDS-PAGE gels were analyzed on an ESI-Q-TOF^{Micro} (waters) and spectra interpreted automatically using the program MassLynx 4.0 (waters). Peptides from spots were analyzed on a MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics,

Bremen, Germany). Peak lists were generated using the program FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). In all spectral analysis partial or total oxidation of methionine and cysteine carbamidomethylation were considered. Peptide sequences were analyzed using the BLASTp algorithm in the non-redundant protein sequences database (NCBIInr) (Altschul et al., 1997), available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> website.

3. Results and discussion

Ligand blot experiments with denatured proteins potentially exposes toxin-binding epitopes (Daniel et al., 2002), constituting the main strategy for initial Cry receptor identification.

BBMVs separated by one-dimensional gel electrophoresis showed a pattern of discrete bands in a range from less than 15–220 kDa. Three protein bands, denominated A (~120 kDa), B (~80 kDa) and C (~80 kDa) were detected after SDS-PAGE-based ligand blots with Cry8Ka5 (Fig. 1).

The peptide mass fingerprinting technique was not effective for protein identification. The low number of coleopteran and *A. grandis* protein sequences deposited in databases resulted in low probability or non-significant scores. Nonetheless, information generated by *de novo* sequencing circumvented this limitation, and two proteins, a heat-shock cognate protein (HSP) and vacuolar ATPase (V-ATPase) were identified for bands B and C, respectively (Table 1). On the other hand, tryptic peptides from band A did not present matches on protein databases.

Through 2DE ligand blot experiments, five Cry-binding spots were visualized (Fig. 1) and excised from the corresponding gels. These spots, named A1 (80.2 kDa, *pI* = 4.17), A2 (80.2 kDa, *pI* = 4.19) and A3 (78.9 kDa, *pI* = 4.3) presented similar masses to the band C on SDS-PAGE blot, while A4 (84.5 kDa, *pI* = 4.44) and A5 (84.5 kDa, *pI* = 4.55) exhibited similar masses to band B. Only one spot was identified after *de novo* sequencing via MALDI-TOF-TOF. The sequenced peptide corresponds to a V-ATPase, being derived from spot A1 (Table 1).

2DE technique has some limitations related to high molecular weight proteins separation (over 120 kDa) and detection of low abundance proteins (Oh-Ishi and Maeda, 2002; Ahmed and Rice, 2005), which could explain the absence of the previously detected ~120 kDa Cry-binding protein on one-dimensional ligand blots.

Interactions between Cry toxins and V-ATPases were previously reported (Krishnamoorthy et al., 2007; Jurat-Fuentes and Adang, 2007; Bayyareddy et al., 2009). As Cry toxins form pores and may be internalized during their toxic process (Griffitts et al.,

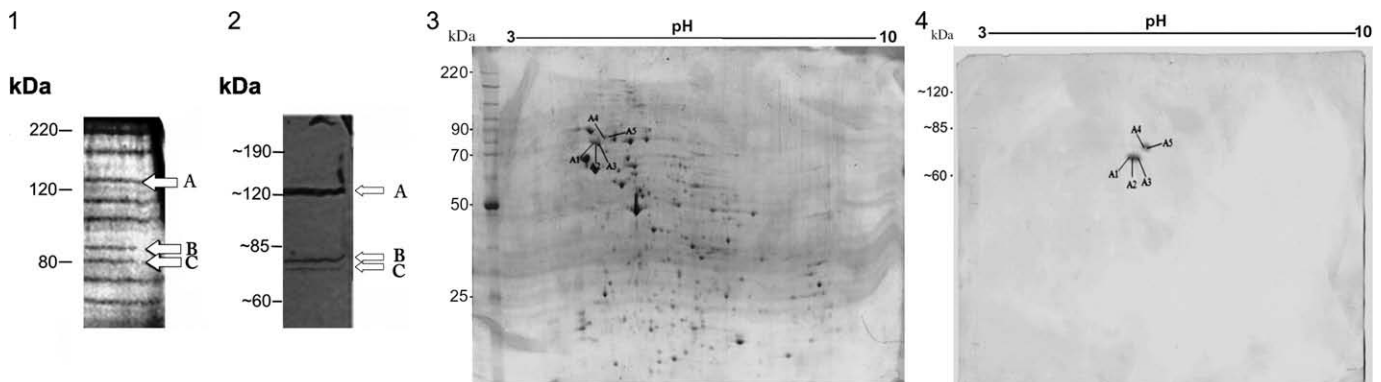


Fig. 1. Ligand blot of Cry8Ka5 toxin to *A. grandis* BBMVs. After SDS-PAGE. (1) BBMV proteins were transferred to PVDF filters and probed with biotinylated Cry8Ka5. (2) Cry8Ka5-binding proteins (A, B and C) are indicated by the arrows on the right. On experiments using 2DE. (3) gels were transferred to PVDF filters and probed with 100 ng/mL biotinylated Cry8Ka5. (4) A1, A2, A3, A4 and A5 represent Cry8Ka5-binding protein spots. positions of molecular size markers (kDa) are indicated on the side of each gel and the pH range for the isoelectric focusing is indicated at the top.

Table 1

Identification of Cry8Ka5-binding *A. grandis* BBMV proteins via mass spectrometry. After interaction with Cry8Ka5, corresponding protein bands (SDS–PAGE) and spots (2DE) were cut from the polyacrylamide gels stained with Coomassie blue R-250 and digested with trypsin. Peptides were analyzed by *de novo* sequencing and the sequences aligned against the NCBI nr database using the BLASTp algorithm.

Gel Id	Sequence	Identification	Organism	Access code	E-value
Band B	RNTVIPTKKS	Heat-shock cognate 70	<i>Aedes aegypti</i>	ABF18258	4.00E–05
	KIVITNDQNRL	Heat-shock cognate 70	<i>Loxostege sticticalis</i>	ACD63049	2.00E–09
	KELEDVVQPIIAKL	Heat-shock cognate 70	<i>Aedes aegypti</i>	ABF18258	6.00E–12
	KNQLTTNPENTVFDADR	Heat-shock cognate 70	<i>Drosophila yakuba</i>	XP_002101374	2.00E–09
Band C	KTVISQALSKY	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001604685	7.00E–09
	RLASFYERAGRV	Similar to V-ATPase subunit A	<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001604685	8.00E–04
Spot A1	RALDDDFYKDNFAEFVPLRT	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	<i>Apis mellifera</i>	XP_623495.1	4.00E–10

2001; Nair and Dean, 2008), cytosolic V-ATPases possibly play a role in toxicity, either controlling ion influx and destabilization of ionic and pH balance (Knowles, 1994), or directly interacting with toxins. In this context, Candas et al. (2003) demonstrated increased expression of V-ATPases in resistant larvae of *Plodia interpunctella*, suggesting that this would result in a high energy state in the intestinal tissue, facilitating resistance. Although Cry1Ac is non-toxic to vertebrates, inhibition of V-ATPases from mammals has been described in dogs and rats (English and Cantley, 1986; Rani and Balaraman, 1997). In insects, where they are located in goblet cells, English and Cantley (1985) reported inhibition of a K⁺ sensitive ATPase in *Manduca sexta* by a δ -endotoxin.

As Chen et al. (2009), we identified Heat-Shock Cognate protein as a direct Cry-interacting protein. These proteins are part of a group of molecular chaperones expressed constitutively (heat-shock cognates) or by induction under high temperatures, oxidative stress, infection or inflammation, protecting cells from negative effects posed by these conditions (Polla et al., 2007). Nair and Dean (2008) proposed that all Cry1A domains insert into *Manduca sexta* BBMVs. Hence, we can hypothesize that the role of HSP-70 found in this work is to act as part of the molecular defense mechanism against internalized toxins, and not as a receptor. However, since it is widely accepted that Cry toxins form pores in the membrane, the resulting osmotic and oxidative stress could increase HSP expression. Although speculative, it is also possible that the Cry-HSP interaction deregulate the insect cellular mechanism of protection.

The ~120 kDa protein, detected only on one-dimensional gels could not be identified. A large number of receptor-type aminopeptidase N (APN) was described with this molecular weight, in experiments using the same blot-based technique of this work (for example, Denolf et al., 1997; Yaoi et al., 1997). Another class of receptors, Cadherin, is sensitive to proteolytic degradation, forming ~120 kDa products. As a consequence, they may be confused with APNs in ligand blots (Martínez-Ramírez et al., 1994). Further experiments must be carried out in order to isolate and identify this protein. The functional roles of the identified proteins on the toxic process may be useful to elucidate the mode of action of Cry8Ka5 toxin.

Acknowledgments

We are thankful to the laboratory of Biological Control at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology for providing insect larvae and to the Uniprote-MS lab at the Center of Biotechnology-UFRGS for the protein sequencing. This work was supported by the Brazilian agencies, Embrapa, CAPES and CNPq.

References

Ahmed, N., Rice, G.E., 2005. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 815 (1–2), 39–50.

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25 (17), 3389–3402.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39 (4), 279–286.
- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bullar Jr., L.A., 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell Proteomics* 2, 19–28.
- Chen, L.Z., Liang, G.M., Zhang, J., Wu, K.M., Guo, Y.Y., Rector, B.G., 2009. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73 (2), 61–73.
- Daniel, A., Sangadala, S., Dean, D.H., Adang, M.J., 2002. Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes binding epitopes hidden under non-denaturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (5), 2106–2112.
- Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J., 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248 (3), 748–761.
- English, L.H., Cantley, L.C., 1985. Delta endotoxin inhibits Rb⁺ uptake, lowers cytoplasmic pH and inhibits a K⁺-ATPase in *Manduca sexta* CHE cells. *J. Membr. Biol.* 85 (3), 199–204.
- English, L.H., Cantley, L.C., 1986. Delta endotoxin is a potent inhibitor of the (Na, K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 261 (3), 1170–1173.
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284 (27), 18401–18410.
- Fontes, E.M.G., Ramalho, F.S., Underwood, E., Barroso, P.A.V., Simon, E.R., Pires, C.S.S., Beltrão, N., Lucena, W.A., Freire, E.C., 2006. The cotton agricultural context in Brazil. In: Hilbeck, A., Andow, D.A., Fontes, E.M.G. (Eds.), *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms*. CABI Publishing, pp. 21–66.
- Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, B.E., Aroian, R.V., 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* 293 (5531), 860–864.
- James, C., 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA executive Summary, 20p.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2007. A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 95 (3), 187–191.
- Knowles, B.H., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24, 275–308.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., Mcnall, R.J., Andacht, T., Adang, M.J., 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (3), 189–201.
- Magalhães, M.T.Q., 2006. Toxinas Cry: perspectivas para obtenção de algodão transgênico brasileiro. Dissertation in Cellular and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Martínez-Ramírez, A.C., González-Nebauer, S., Escriche, B., Real, M.D., 1994. Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 782–787.
- Metcalf, R.L., 1993. *Metcalf, R.A. Destructive and Useful Insects Their Habits and Control*. McGraw-Hill, New York.
- Monnerat, R.G.D., Oliveira-Neto, O.B., Nobre, S.D., Silva-Werneck, J.O., Grossi de Sa, M.F., 2000. Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Comunicado Técnico/Embrapa 46, 1–4.
- Nair, M.S., Dean, D.H., 2008. All domains of Cry1A toxins insert into insect brush border membranes. *J. Biol. Chem.* 283 (39), 26324–26331.
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M.D., Amparo, C., Martínez-Ramírez, A.C., Bravo, A., Rausell, C., 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2), 437–442.
- Oh-Ishi, M., Maeda, T., 2002. Separation techniques for high-molecular-mass proteins. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 771 (1–2), 49–66.
- Oliveira, G.R., 2008. Evolução in vitro de moléculas Cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera fugiperda*. Dissertation in Cellular and molecular biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

- Piggot, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2), 255–281.
- Polla, B.S., Gabert, F., Peyrusse, B.M.N., Jacquier-Sarlin, M.R., 2007. Increased proteolysis of diphtheria toxin by human monocytes after heat shock: a subsidiary role for heat-shock protein 70 in antigen processing. *Immunology* 120 (2), 230–241.
- Rani, S.S., Balaraman, K., 1997. Effect of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* on the enzymes of rat intestinal brush border membrane vesicles. *Indian J. Exp. Biol.* 35 (11), 1191–1193.
- Wolfersberger, M.G., Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 301–308.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H., Sato, R., 1997. Aminopeptidase N from *Bombyx Mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus Thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246 (3), 652–657.