



II Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia

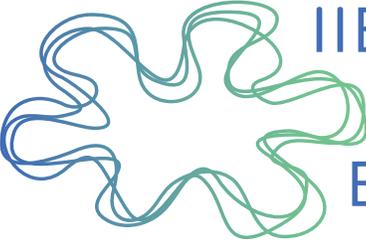
Anais

Alexandre Alonso Alves
Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Lorena Costa Garcia

Editores Técnicos

Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



II Encontro de
Pesquisa e Inovação da
Embrapa Agroenergia
Anais

*Alexandre Alonso Alves
Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Lorena Costa Garcia*
Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser obtidos na:

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

CEP: 70770-901

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição

Embrapa Agroenergia

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola*

Secretária-executiva: *Lorena Costa Garcia*

Membros: *Maria Iara Pereira Machado, Eduardo Fernandes Formighieri, Larissa Andreani Carvalho, Betania Ferraz Quirino, João Ricardo Moreira de Almeida, Felipe Brandão de Paiva Carvalho, Sílvia Belém Gonçalves e Diogo Keiji Nakai.*

Supervisão editorial: *Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola*

Revisão de texto: *Sérgio Saraiva Nazareno dos Anjos*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

Ilustração(s) da capa: *Leandro Santos Lobo*

Comitê Técnico-Científico

Presidente: *Bruno dos Santos Alves F. Brasil*

Membros: *Alexandre Nunes Cardoso, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, Patrícia Abrão de Oliveira, Leticia Jungamn Cançado, André Pereira Leão, Carolina Madalozzo Polleto e Lorena Costa Garcia*

1ª edição

1ª impressão (2015): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (2. : 2015 : Brasília, DF).

II Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: anais / Alexandre Alonso Alves ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2015.

132 p. ; 16cm x 22cm.

ISBN: 978-85-7035-524-9

1. Agroenergia - pesquisa - inovação. I. Alves, Alexandre Alonso. II. Brasil, Bruno dos Santos Alves Figueiredo. III. Garcia, Lorena Costa. IV. Embrapa Agroenergia. V. Título.

CDD 333.79

Apresentação

Em novembro de 2014 a Chefia de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroenergia instituiu em sua programação um evento denominado Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, cuja principal motivação foi trazer a público, por meio de pôsteres e apresentações orais, os trabalhos científicos desenvolvidos na unidade pelos nossos estudantes de graduação, mestrado, doutorado e pós-doutorado. O primeiro evento nos permitiu apresentar 49 trabalhos nas temáticas desenvolvidas nos nossos laboratórios de Genética e Biotecnologia, de Processos Bioquímicos, de Processos Químicos e de Química de Biomassa e Biocombustíveis. Tais trabalhos nos surpreenderam pela sua qualidade e pela dedicação dos nossos colaboradores e alguns destes foram premiados pela sua qualidade.

Este ano, no nosso segundo Encontro de Pesquisa e Inovação, tivemos um número muito semelhante de trabalhos apresentados e, ainda, incrementamos o evento com um Simpósio cujo principal objetivo foi discutir o tema “Produção e uso de enzimas no contexto da Agroenergia”. A ideia principal por trás deste evento foi criar uma oportunidade para que os pesquisadores da Embrapa Agroenergia apresentem suas ações de pesquisa bem como a nossa infraestrutura além de criar bases para uma discussão profunda sobre o tema enzimas no contexto da agroenergia de forma a prospectar tendências de mercado e de PD&I que pudessem ser incorporadas à programação de pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia. Esta é uma estratégia que adotaremos de agora em diante e, a cada ano, um novo tema de interesse para o setor da agroenergia será tratado no simpósio de forma a ampliar a identificação de lacunas na nossa programação de pesquisa e, desta forma, desenvolver as pesquisas necessárias à solução de gargalos tecnológicos que por ventura existirem e que tenhamos capacidade de trazer uma resposta ou solução para a sociedade brasileira.

Esperamos que a publicação destes anais do II EnPI possa ajudar a difundir as soluções que as equipes de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Agroenergia estão trazendo para o país e, também, permitam que novas parcerias com instituições tanto públicas como privadas possam ser firmadas com a nossa Unidade de forma a ampliar a capacidade da Embrapa em responder aos anseios da sociedade e do setor produtivo.

Guy de Capdeville
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Encontro de Pesquisa e Inovação

Organização

Chefia Adjunta de Pesquisa e Desenvolvimento (CPD) e Núcleo de Apoio à Programação (NAP), com o apoio do Comitê Local de Publicações (CLP), Comitê Local de Propriedade Intelectual (CLPI), Núcleo de Comunicação Organizacional (NCO), Setor de Infraestrutura e Logística (SIL) e Setor de Implementação da Programação de Transferência de Tecnologia (SIPT).

Objetivos

I) Proporcionar debates em PD&I visando à definição de focos de pesquisa no tema: “Produção e uso de enzimas no contexto da Agroenergia”; II) Divulgar os trabalhos de PD&I desenvolvidos na Embrapa Agroenergia; III) Premiar os melhores talentos nas categorias de graduandos, graduados e doutores.

Formato

O evento trata-se da segunda edição do Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia (EnPI 2015), que contará com a presença de palestrantes convidados internos e externos além de participantes de universidades e instituições de pesquisa do Distrito Federal e regiões adjacentes, em sua maioria alunos de graduação e pós-graduação.

O EnPI 2015 será realizado no período de 23 a 27 de novembro, na Embrapa Agroenergia (Brasília/DF). Esta unidade da Embrapa é integralmente dedicada à pesquisa, desenvolvimento e inovação de processos de conversão da biomassa em biocombustíveis e outros produtos que agreguem valor às cadeias produtivas da agroenergia no Brasil e promovam a sustentabilidade.

O evento será sub-dividido em dois momentos:

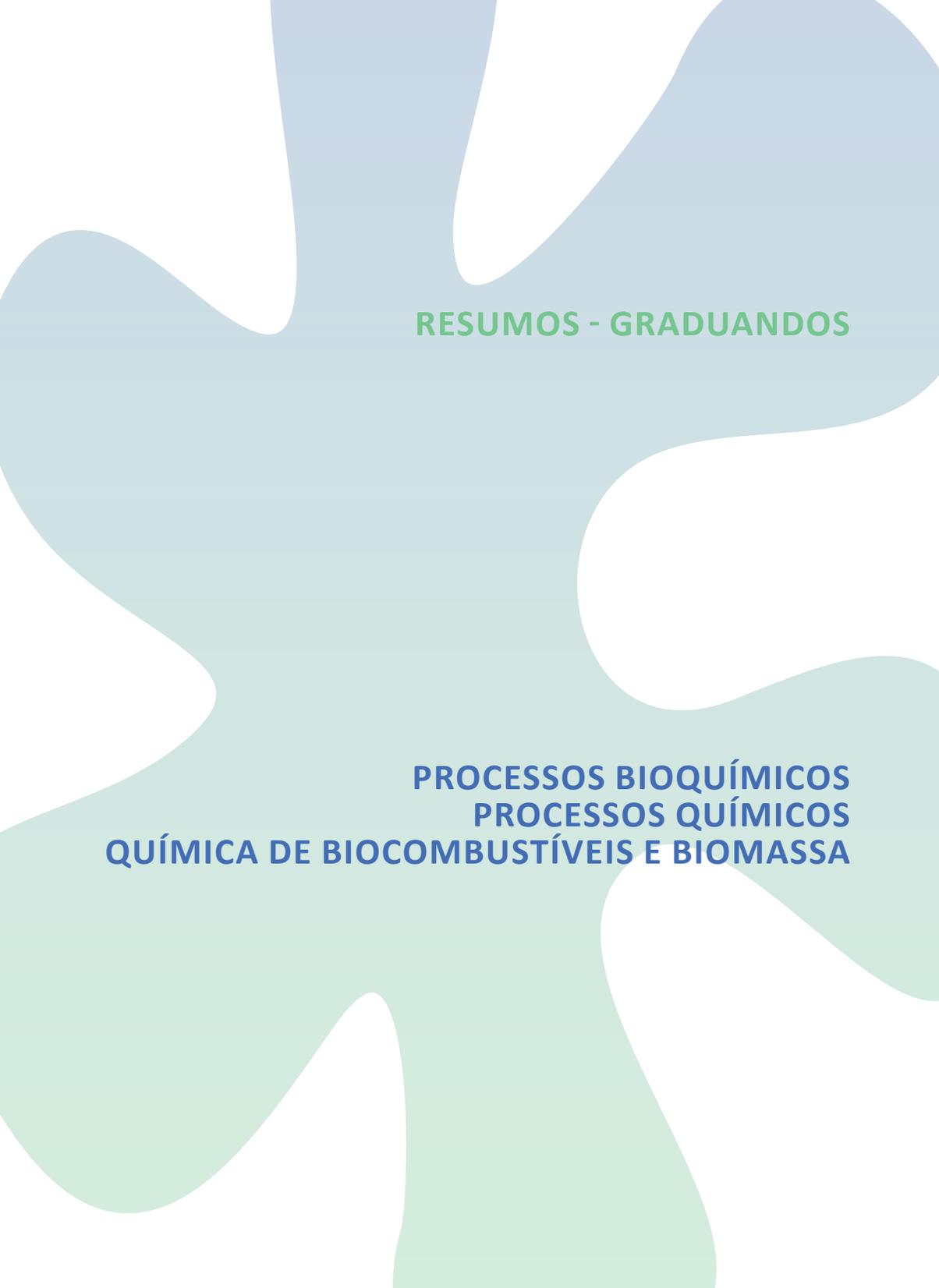
I) O simpósio “Agroenergia em Foco” com objetivo de avaliar o cenário externo e direcionar as ações de PD&I no tema “Produção e uso de enzimas no contexto da Agroenergia”. II) A seção de divulgação dos trabalhos do II Encontro de Pesquisa e Inovação da Agroenergia com a apresentação (forma de pôster e oral) e premiação dos melhores trabalhos de PD&I desenvolvidos nas grandes áreas: 1) Genética e Biotecnologia Vegetal; 2) Genética e Biotecnologia Microbiana; 3) Processos Bioquímicos; 4) Processos Químicos e 5) Química de Biocombustíveis e Biomassa.

Sumário

RESUMOS - GRADUANDOS	8
PROCESSOS BIOQUÍMICOS	8
PROCESSOS QUÍMICOS.....	8
QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA.....	8
Uso de aditivos na otimização da hidrólise enzimática de capim elefante pré-tratado por autohidrólise.....	9
Avaliação da atividade enzimática de biofábricas produtoras de Beta-glicosidases baseadas em microalgas.....	11
Validation of a RP-UPLC-PDA method for gossypol determination in cottonseed meal during biot detoxification process by fungi	13
Seleção de meio de cultivo para produção de celulases por <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8 em fermentação submersa e comparação entre linhagens mutantes e parental	16
Avaliação da estabilidade da enzima glicose oxidase livre e imobilizada na produção de ácido xilônico	18
Imobilização de extrato celulolítico produzido por <i>Aspergillus niger</i> e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	21
Avaliação da adaptação de <i>Spathaspora passalidarum</i> na fermentação de frações hemicelulósicas.....	24
Preparo e aplicação da hidrotalcita na produção de biodiesel	27
Estudo prospectivo para a síntese de poliésteres renováveis a partir de glicerol	30
Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão-manso por rota metílica.....	33
Otimização das etapas de hidrólise e filtração para a quantificação de carboidratos estruturais e lignina de bagaço de cana-de-açúcar	36
Preparo de misturas de óleo de soja e sebo bovino para a reação de transesterificação e sua caracterização	39
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	42
Sugarcane endophytic fungi as a source of new strains producing lipase	43
Transformação mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> do fungo celulolítico <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes.....	45
Mutagênese de <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8 com UV e EMS e caracterização de linhagens quanto ao aumento da produção de celulases e hemicelulases.....	48

Prospecção de bactérias endofíticas de plantas nativas e cultivadas e seu potencial para a desconstrução de biomassa lignocelulósica	51
Bacteria and fungi associated with fruits of <i>Elaeis guineensis</i> Jacq. and their potential to produce lipase	54
Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma harzianum</i> CFAM-422 visando à seleção de linhagens produtoras de enzimas para desconstrução de biomassa	56
Seleção e caracterização fisiológica de novas linhagens de leveduras não- <i>Saccharomyces</i> que sejam capazes de converter xilose, arabinose e glicerol em químicos de interesse.....	59
Construção de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> capaz de fermentar xilose para produção de etanol	61
RESUMOS – GRADUADOS	63
PROCESSOS BIOQUÍMICOS	63
PROCESSOS QUÍMICOS.....	63
QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA.....	63
Produção de biomassa de microalgas em vinhaça e CO ₂ e caracterização do efluente pós-cultivo... 64	
Seleção de microalgas com capacidade de crescimento no efluente da lagoa de estabilização de POME	67
Avaliação da produção de lipase por macrofungos cultivados em meio Agar-Torta-Dendê.....	70
Prospecção de microrganismos produtores de lipase a partir de frutos e de resíduos agroindustriais de dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	73
Efeito da temperatura no processo de purificação de celulose.....	75
Otimização da polimerização do glicerol.....	78
Preparo de amostra em metabolômica de leveduras para a determinação dos metabólitos produzidos na fermentação de xilose	81
Desenvolvimento de protocolo analítico para raízes de dendê utilizando UPLC-ESI-Q-TOF-MS....	84
Rendimento de proteína bruta em biomassa de microalga <i>Chlamydomonas biconvexa</i> cultivada em vinhaça utilizando fotobiorreatores.....	86
Avaliação da eficiência de aditivos comerciais no aumento da estabilidade à oxidação do biodiesel produzido a base de óleo de soja	89
RESUMOS – GRADUADOS	91
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	91

GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL	91
DNA barcoding of green microalgae using <i>rbcl</i> and <i>nuITS2</i> markers reveals putative new species	92
Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis	95
Fungos como agentes destoxicadores de torta de caroço de algodão (<i>Gossipol</i>)	98
Engenharia metabólica de <i>Pichia pastoris</i> para produção de ácido glicérico.....	101
Proteases e fitases de macrofungos cultivados em meio submerso com tortas de pinhão-manso ou caroço de algodão como fonte de carbono	103
Cellulolytic and accessory enzymes from brazilian microbiota for biomass deconstruction.....	106
Engenharia Metabólica de <i>Pichia pastoris</i> para Produção de Ácido Xilônico	109
Avaliação da diversidade microbiana do processo de produção de etanol de cana-de-açúcar por meio de abordagem independente de cultivo	111
Avaliação comparativa da capacidade fermentativa de leveduras consumidoras de xilose.....	113
Evolutionary engineering as strategy to improve xylose utilization by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	115
Estudo do desenvolvimento meiótico de cromossomos em microsporócitos coletados de inflorescências de <i>Elaeis oleifera</i> subamostra coari	118
RESUMOS - DOUTORES.....	121
QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA.....	121
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA	121
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL	121
Molecular characterization and genetic structure of American oil palm (<i>Elaeis oleifera</i>) based on genome-wide SNP markers	122
Development of a protocol for exocellulase activity direct detection in culture medium from metagenomics library clones for a high-throughput screening	125
Caracterização química de resíduo de pinus e eucalipto da indústria de papel e celulose	127
Qualidade de extrato de carotenoides obtido a partir das fibras da prensagem de dendê híbrido BRS-Manicoré (<i>Elaeis spp.</i>) com dióxido de carbono supercrítico.....	130



RESUMOS - GRADUANDOS

**PROCESSOS BIOQUÍMICOS
PROCESSOS QUÍMICOS
QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA**

Uso de aditivos na otimização da hidrólise enzimática de capim elefante pré-tratado por autohidrólise

Lenise V. Costa^{1}, Felipe B. P. Carvalho², Carla M. Camellini², Thais D. Mendes², Thalyta F. Pacheco², Marcelo A. Carvalho³, Mônica C. T. Damaso², Félix G. de Siqueira²*

Introdução

A conversão dos materiais lignocelulósicos em bioetanol é conduzida em etapas, iniciando-se pelo pré-tratamento dessa biomassa, seguido da hidrólise enzimática da celulose em glicose, por fim, a fermentação alcoólica e destilação. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma gramínea, apontada como uma alternativa no cenário de etanol de segunda geração, devido à sua elevada produtividade e rápido crescimento (SANTOS et al., 2014). A utilização de materiais lignocelulósicos ainda é um desafio. Este fato ocorre principalmente devido à sua natureza recalcitrante e ao alto custo da etapa de hidrólise, já que se fazem necessário altas cargas enzimáticas (LI et al., 2012). Várias abordagens com o objetivo de melhorar a hidrólise enzimática no processo de conversão de celulose em açúcares solúveis têm sido avaliadas, e uma delas é a adição de aditivos durante a hidrólise (SIPOS et al., 2011). O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar o efeito da adição de aditivos no processo de hidrólise enzimática de capim elefante pré-tratado por autohidrólise.

Métodos

O capim elefante foi pré-tratado por autohidrólise a 180°C (+/- 1°C) durante 20 min, em reator de 5 L, em aço inoxidável pressurizável, da marca Büchi e modelo Kiloclave. A razão sólido:líquido utilizada foi de 1:8,5 (m/v). Em seguida, a biomassa pré-tratada, ainda úmida, foi suspensa na proporção 1:10 (m/v, base seca), em tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M pH 5, empregando o complexo celulolítico Cellic Ctec 3^o como catalisador. Para a avaliação do efeito da dosagem enzimática e dos aditivos (BSA, Caseína, Tween 20, Tween 80, PEG 2050, PEG 4000, PEG 6000 e Triton X-100), os experimentos foram realizados segundo o planejamento experimental Plackett & Burman (RODRIGUES; IEMMA, 2014), com 16 ensaios e 3 pontos centrais. Os valores dos níveis e fatores utilizados no planejamento

1 Universidade Federal do Tocantins, Rua Badejós, Chácaras 69/72, Lote 07, Gurupi/TO, Brasil, 77402-970.

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901.

3 Embrapa Cerrados, Rodovia BR-020, Km 18, Planaltina/DF, Brasil, 73310-970.

*lenise.costa@colaborador.embrapa.br; monica.damaso@embrapa.br

foram 0; 0,05 e 0,1 g/L para as concentrações de aditivos e 3, 5 e 7 FPU/gde biomassa de carga enzimática para os fatores -1, zero e +1, respectivamente. A hidrólise foi conduzida sob agitação a 200 rpm e 50 °C. Foram coletadas alíquotas no tempo 0 h e após os tempos de reação de 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32 e 48 h de processo. As alíquotas foram analisadas em HPLC-RID para a determinação de açúcares. Análise dos efeitos significativos e não significativos para a resposta glicose gerada foi realizada utilizando o software *STATISTICA*® for Windows.

Resultados e Conclusões

Os valores de glicose obtidos após 24 h de hidrólise variaram entre 17 e 29 g/L. Após 48 h, o aumento da quantidade de glicose não foi expressiva, sendo que o maior nível obtido foi de 32 g/L. Os maiores rendimentos de glicose foram obtidos nos ensaios contendo maiores cargas enzimáticas (5 e 7 FPU/g). Em contrapartida, baixos rendimentos de glicose foram observados nos experimentos em que a carga enzimática está no ponto de mínimo (3 FPU/g), com rendimentos entre 17 e 20 g/L. A menor concentração de glicose após hidrólise foi obtida no ensaio em que todas as variáveis estavam no ponto de mínimo (-1), ou seja, no qual foi adicionado apenas a carga enzimática. Para compreensão dos efeitos das variáveis sob o processo foi realizada a análise estatística. Nas condições dos ensaios, somente a carga enzimática exerce efeito significativo sobre rendimento de glicose no hidrolisado. Acredita-se que o efeito desta variável tenha sido tão importante para o processo de hidrólise, que não foi possível avaliar a ação dos aditivos. Portanto, novos experimentos serão realizados, possivelmente fixando o valor da carga enzimática, visando entender o efeito dos aditivos durante o processo de hidrólise.

Apoio Financeiro

Embrapa Agroenergia

Referências

LI, J.; LI, S.; ZHIPEI YAN, C. F. The mechanism of poly(ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, Amsterdam, v. 89, p. 203-210, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3. ed. Campinas: Carita, 2014. 358 p.

SANTOS, M. M. P.; DAHER, R. F.; PONCIANO, N. J.; GRAVINA, G. A.; PEREIRA, A. V.; SANTOS, C. L. Respostas do capim-elefante sob doses de adubação azotada de cobertura para fins energéticos. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 37, n. 1, p. 100-108, 2014.

SIPOS, B.; GYI, M. T. S.; SEBESTYÉ'N, Z.; PERAZZINI, R.; DIENES, D.; JAKAB, E.; CRESTINI, C.; RE'CZEY, K. Mechanism of the positive effect of poly(ethylene glycol) addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 334, n. 11, p. 812-823, 2011.

Avaliação da atividade enzimática de biofábricas produtoras de Beta-glicosidases baseadas em microalgas

Artur F. B. Arantes¹, Hellen C. A. Braga¹, Thais D. Mendes¹, Félix G. Siqueira¹, Bruno S. A. F. Brasil¹

Introdução

A demanda por combustíveis no mercado agroindustrial brasileiro é crescente. Atualmente, o principal fator limitante para conversão eficiente da energia contida na biomassa lignocelulósica em etanol consiste na indisponibilidade de tecnologias de baixo custo, em especial, no que diz respeito à desconstrução da holocelulose presente na parede celular vegetal em açúcares fermentescíveis por meio de hidrólise enzimática. Frente a este panorama, a utilização de organismos geneticamente modificados ganha destaque como uma alternativa para produção de enzimas em grandes quantidades e com propriedades desejáveis. A utilização de microalgas como biofábricas de proteínas recombinantes é uma alternativa promissora, devido à alta taxa de crescimento destes microrganismos e ao seu baixo custo potencial (POSTEN; ROSELLO-SASTRE, 2012) Como modelo conceitual, propõe-se a expressão de novas Beta-glicosidases de alta eficiência, previamente prospectadas a partir de bibliotecas metagenômicas obtidas da biodiversidade brasileira pela Embrapa Agroenergia. O trabalho teve como objetivo avaliar os melhores métodos de recuperação da atividade enzimática de Beta-glicosidases heterólogas expressas a partir de microalgas (cianobactérias) geneticamente modificadas (*Synechococcus elongatus*) construídas no projeto Algasec. Potencialmente, essas biofábricas fotossintetizantes produtoras de enzimas poderiam capturar as emissões de carbono geradas na própria usina sucroenergética, o que reduziria os custos para produção de etanol lignocelulósico e diminuiria o passivo ambiental gerado pela indústria.

Métodos

Primeiramente seis cepas de cianobactérias *Synechococcus elongatus* (*S. elongatus* 1 LPB – 24-15; *S. elongatus* 5 LPB – 25-15; *S. elongatus* 6 LPB – 26-15; *S. elongatus* 9 LPB – 27-15; *S. elongatus* 10 LPB – 28-15; *S. elongatus* Controle LPB – 29-15) geneticamente modificadas (vetor pSyn1 – Life Technologies) pela inserção de gene codificador para enzima beta-glicosidase de origem procariótica. Os clones foram cultivados em meio BG-11

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; artur.arantes@colaborador.embrapa.br, bruno.brasil@embrapa.br

(LPB-103) sob iluminação (6.000 Lux) constante a 34°C durante 15 dias até alcançarem a densidade óptica 2,9 a 730nm (ZHOU et al., 2014a e b). As amostras foram submetidas ao rompimento da parede celular, no qual foram pipetadas em tubos eppendorfs de 1,5 ml e centrifugadas a 14.000 rpm – 4min. Logo em seguida, descartou-se o meio sobrenadante e foi adicionado 0,2 g de carboneto de silício (200-450 mesh – Sigma Aldrich) ao pellet de células. Consequente, foram realizados três ciclos de maceração manual com auxílio de um pilão, alternados por três ciclos de descanso em cuba de gelo. O tempo total de processamento é de 6 minutos para cada amostra, um minuto para cada ciclo respectivamente. Por fim, foi adicionado às amostras 0,5ml tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 para em seguida serem novamente centrifugadas nas prévias condições (ZHOU et al., 2014b). Para realização dos testes enzimáticos, usou-se o sobrenadante obtido de cada uma das seis cepas. Para análise proteica total empregou-se o método de Bradford e nas análises de atividade enzimática empregaram-se testes com 4-Metilumbeliferil Beta-D-Glucoronida (MUG).

Resultados e Conclusões

Nos resultados obtidos a partir do método de Bradford foi observado alto teor proteico em todas as amostras, destacando-se a cepa LPB 24-15 possuindo $0,87 \pm 0,0185$ mg/ml de proteína solúvel. Referente aos testes com MUG foi possível detectar atividade em todas as cepas, evidenciando maior grau na cepa LPB 25-15. Dessa forma, pode-se comprovar o promissor uso de microalgas como biofábricas no mercado agroindustrial. Nas próximas etapas do projeto, serão desenvolvidos métodos de cultivo otimizados em fotobiorreatores suplementados com CO₂ visando o incremento da expressão enzimática.

Apoio Financeiro

Embrapa (Projeto AlgaSEC – SEG: 03. 12. 11. 006. 00. 00)

Referências

POSTEN, C.; ROSELLO-SASTRE, R. Microalgae reactors. In: ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry. [New York]: Wiley, 2012.

ZHOU, J.; ZHANG, F.; MENG, H.; ZHU, Y.; BAO, G.; ZHANG, Y.; YIN, L.; YANHE, M. Discovery of a super-strong promoter enables efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria. **Scientific Reports**, n. 4, article nº 4500, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep04500>>. Acesso em: Julho/2015.

ZHOU, J.; ZHANG, F.; MENG, H.; ZHU, Y.; BAO, G.; ZHANG, Y.; YIN, L. Development of a silicon carbide disruption method enables efficient extraction of proteins from cyanobacterium *Synechocystis* sp. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 49, n. 12, p. 2199-2202, 2014b.

Validation of a RP-UPLC-PDA method for gossypol determination in cottonseed meal during biodegradation process by fungi

Aparecido A. Conceicao^{1}, Ana Paula F. Araújo¹, Thais D. D. Santana¹, José Antônio A. Ribeiro¹, Simone Mendonça¹, Felix G. de Siqueira¹*

Background

Cottonseed shows as a potential animal feed since it is a great source of protein, fiber and minerals. However, the use of cottonseed meal is mainly directed to ruminants and restricted to monogastric animal feed due to the high occurrence of gossypol in the glands of cotton plants (*Gossypium* spp.). Gossypol is a yellow pigment that confers resistance to cotton plants against natural predators. Also, it has harmful effects to livestock leading to immunotoxicity, liver damage, reducing weight gain, respiratory distress, anemia, weakness and infertility (GADELHA et al., 2014). In order to neutralize the gossypol actions and expand the use of cottonseed meal for all kind of animal, several research have been done such as supplementation with iron (GABER et al. 2012), microbial fermentation (LIM, 2011), and use of fungi strains (ZHANG et al. 2006). Treatment using fungi is a potential and efficacious method to eliminate gossypol from the cottonseed meal since it is a cheap, sustainable and an accessible method. Considering that most of used methods to determine gossypol is mainly for sources containing high concentration of the molecule, it makes necessary to develop and validate a method to extract and determine small amounts of gossypol in sources such as treated and untreated cottonseed meal. Thus, this work aimed to validate a methodology of extraction and determination of gossypol during the cottonseed meal biodegradation process by fungi.

Methods

Sample extraction—Several solvents (chloroform, acetonitrile 80% (BENSON et al. 2001), acetone 100% and acetone 70%) and extraction conditions (with or without sonication, cold or ambient temperature; with or without solvent evaporation) were tested. The optimized extraction procedure was accomplished as following: One gram (1 g) of the cottonseed meal were weighed into centrifuge tubes (15 mL) and extracted by sonification (10 min) in ice with 10 mL of acetone 70%. The samples were centrifuged (5 min at 9000 rpm and 8°C), an

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;
*aparecido.conceicao@colaborador.embrapa.br; felix.siqueira@embrapa.br

aliquot of the supernatant was transferred to a tube (1.5 mL) and centrifuged again (10min at 14000 rpm and 8°C) and finally an aliquot of the supernatant was transferred directly into an auto sample vial to be analysed at UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Recovery test was evaluated spiking gossypol standard on untreated cottonseed meal.

Standard - A gossypol standard (SIGMA G8761, purity 95%) was prepared dissolving 5 mg of gossypol standard in 5 mL of acetone 70%.

UPLC Analysis – All samples were performed in a Waters UPLC Acquity H-Class equipped with a Photodiode Array (PDA) detector and auto injector. For method development, the following parameters were tested: different reversed phase columns (RP-C18), organic mobile phase (CAN, MeOH or mixture of both), type of elution (isocratic or gradient), and use of mobile phase modifiers (acetic acid, formic acid, or trifluoroacetic acid). The wavelength for UV detection was 254 nm. A 1 µl of the samples at 8°C were injected at a flow rate of 0.4 mL/min.

Linearity, precision, limit of detection, limit of quantification and recovery tests were evaluated to validate the optimized method.

Results and Conclusions

Gradient elution using a mobile phase starting with 40% Aqueous (TFA 0.1%, v/v) and 60% of Organic (100% Methanol) with a Kinetex C18 column (100 x 2.1 mm, 2 µm) maintained at 35°C presented the best peak shape and sensitivity for gossypol. With regard to extraction conditions, poor recovery or stability issues were observed when chloroform, acetonitrile 80% or acetone 100% were employed as solvents. The best results were achieved by sample sonication with acetone 70% in an ice bath for 10 minutes.

The optimized RP-UPLC-PDA method showed good linearity ($R^2 > 0.999$) in the range of 0.5 µg/mL to 100 µg/mL; detection and quantitation limits were 0.2 µg/mL and 0.5 µg/mL, respectively; recovery was greater than 94% in three tested levels, with good precision (RSD < 15%).

The proposed method for extraction and UPLC analysis of gossypol is efficient and more sensitive than others methods available in literature (BENSON et al. 2001) allowing for detection and quantitation of small amounts of free gossypol in treated and untreated cottonseed meal.

References

BENSON, C. G.; WYLLIE, S. G.; LEACH, D. N.; MARES, C. L.; FITT, G. P. Improved method for the rapid determination of terpenoid aldehydes in cotton. *Journal Agriculture Food Chemicals*, Washington, DC, v. 49, n. 5, p. 2181-2184, 2001.

GABER, M. M.; ELHALFAWY, M. M.; RAMADAN, A. M. Utilization of cottonseed meal supplemented with iron for detoxification of gossypol in Nile tilapia, broodstock and their impact on the hatchability of their progenies. *Journal Aquaculture Research & Development*, v. 3, n. 7, p. 1-5, 2012.

GADELHA, I. C. N.; FONSECA, N. B. S.; OLORIS, S. C. S.; MELO, M. M.; BLANCO-SOTO, B. Gossypol toxicity from cottonseed products. **Scientific World journal**, New York, número do artigo 231635, 2014.

LIM, S.; LEE, K. J. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Malden, v. 42, n. 4, p. 494-503, 2011.

ZHANG, W.; XU, Z.; SUN, J.; YANG, X. Effect of selected fungi on the reduction of gossypol levels and nutritional value during solid substrate fermentation of cottonseed meal. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v. 7, n. 9, p. 690-695, 2006.

Seleção de meio de cultivo para produção de celulasas por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa e comparação entre linhagens mutantes e parental

Simone A. Serra^{1*}; Christian M. Tomm¹; Jhéssica C. Araújo¹; Thais D. Mendes²; Léia C. L. Favaro²; Mônica C. T. Damaso²

Introdução

Celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de glicose, que pode ser convertida em etanol de segunda geração e em outros químicos (CASTRO; PEREIRA, 2009). *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso septado e hialino, sendo uma das espécies frequentemente utilizadas para produção de celulasas. O processo de mutação clássica pode ser utilizado para melhorar os níveis de atividade enzimática produzidos por microrganismos (FÁVARO; POLETTTO, 2013). No projeto ao qual este trabalho está inserido estão sendo realizadas mutações em linhagem de *Aspergillus niger* 3T5B8, previamente selecionada para produção de poligalacturonase, utilizando o agente físico ultravioleta e o químico, etilmetanossulfonato. O objetivo deste trabalho foi selecionar uma fonte de carbono adequada para produção de celulasas pela linhagem parental *A. niger* 3T5B8, por fermentação submersa, visando comparar a produção da enzima por linhagens mutantes com a parental.

Métodos

A produção das enzimas para seleção de meio de cultivo foi realizada utilizando-se a linhagem parental *A. niger* 3T5B8. Para a avaliação da melhor fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas, ao meio basal proposto por Pinto (1998) foram adicionados quatro diferentes fontes de carbono: Bagaço de cana-de-açúcar, Avicel, Carboximetilcelulose e Capim-elefante. O meio de cultura foi inoculado com suspensão de conídios (1x10⁶ conídios/mL de meio de cultura) e a produção das enzimas conduzida sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após 72, 120 e 168h de fermentação, amostras foram retiradas

1 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília-DF, Brasil.

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*simone.serra@colaborador.embrapa.br; monica.damaso@embrapa.br

e as atividades enzimáticas de Endoglicanase, FPase e β -glicosidase foram determinadas seguindo métodos miniaturizados adaptados de Ghose (1987) e Xiao et al. (2004). O meio de cultivo selecionado foi utilizado para produção das enzimas pela linhagem parental e por duas linhagens mutantes, para fins de comparação. As duas linhagens mutantes utilizadas foram obtidas a partir de um segundo ciclo de mutagênese utilizando etilmetanossulfonato, partindo de linhagem selecionada no primeiro ciclo (ultravioleta).

Resultados e Conclusões

Dentre as fontes de carbono testadas para produção de celulases pela linhagem parental 3T5B8 de *A.niger* observou-se que o extrato enzimático produzido utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar foi o que apresentou maiores níveis de atividade. Após 120h de cultivo, foi obtido cerca de 0,6 U/mL de Endoglicanase e 0,9 U/mL de β -glicosidase. A atividade de FPase não foi detectada, nas condições testadas. Duas linhagens mutantes foram avaliadas para produção de celulases utilizando o meio de cultivo selecionado, porém os níveis de atividade produzidos não foram superiores aos obtidos pela parental. Novos testes de produção serão feitos testando-se outras linhagens mutantes selecionadas.

Apoio Financeiro

Embrapa

Referências

- CASTRO, A. M. de; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- FAVARO, L. C. de L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis Líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- PINTO, G. A. S. **Produção de uma mistura hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa**. 1998. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

Avaliação da estabilidade da enzima glicose oxidase livre e imobilizada na produção de ácido xilônico

Julia Aparecida C. Fagundes¹, Thályta F. Pacheco² e Dasciana S. Rodrigues²

Introdução

Ácido xilônico, um dos produtos de maior valor agregado segundo o Departamento de Energia dos EUA, tem aplicação na produção de diversos químicos nas áreas alimentícia, farmacêutica e na agricultura (RAGAUSKAS et al., 2006). A viabilidade do etanol lignocelulósico depende também do aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa, constituída majoritariamente de xilose e correspondente a até 40% da massa seca do material. Uma das possíveis utilizações da xilose é a produção de ácido xilônico. Este pode ser produzido a partir da oxidação da xilose, catalisada pela enzima xilose desidrogenase. Este processo requer a utilização de cofatores como NAD⁺. O ácido xilônico também pode ser obtido pela ação da enzima glicose oxidase na conversão da xilose, sem dependência de cofatores (LIU et al., 2012; BUCHERT et al., 1986).

A imobilização de enzimas apresenta vantagens em relação ao uso destas solúveis, tais como: possibilidade de reutilização e de operação em modo contínuo, maior facilidade de separação do produto final, melhoria no desempenho catalítico e redução da inativação por distorção de sua estrutura nativa.

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de avaliar a ação da enzima glicose oxidase na produção de ácido xilônico, empregando xilose como substrato. Será avaliada a atuação da enzima livre e sob três técnicas de imobilização (entrecruzamento, ligação covalente em resina agarose-amino e ligação covalente em quitosana), visando sucessivas reutilizações sem perda de estabilidade.

Métodos

A conversão de xilose em ácido xilônico foi realizada utilizando a enzima comercial glicose oxidase de *A. niger*. Primeiramente, foi feita a avaliação do comportamento da enzima livre em xilose pura e determinação da concentração de enzima a ser empregada na imobilização. Foram então avaliadas três técnicas de imobilização. Na imobilização por entrecruzamento, foi utilizando álcool iso-propílico como agente precipitante e glutaraldeído

1 Universidade de Brasília – UnB, Instituto de Química ;

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901

*julia.fagundes@colaborador.embrapa.br; dasciana.rodrigues@embrapa.br

como agente de entrecruzamento. Duas técnicas de imobilização por ligação covalente foram avaliadas. Na primeira delas foi utilizada resina agarose-amino como suporte. Para a segunda técnica, a imobilização da enzima em quitosana, primeiramente foi realizada a ativação da quitosana utilizando o método descrito por Budriene et al. (2005). Como agente ligante foi utilizado glutaraldeído. Para as três técnicas, o sólido resultante da imobilização foi lavado e centrifugado até que não houvesse perda de proteína no sobrenadante. Todas as soluções de enzima e sobrenadantes tiveram seu teor de proteína quantificado por Bradford para determinação da eficiência de imobilização. A conversão de xilose a ácido xilônico empregando as enzimas livre e imobilizadas foi avaliada em reator encamisado a 35°C, com agitação constante, empregando solução de 10 g/L de xilose. Foram coletadas amostras periodicamente para construção dos perfis de conversão de xilose a ácido xilônico. O ácido xilônico produzido foi quantificado por método colorimétrico descrito por Lien (1959). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo apresentadas as médias dos valores obtidos.

Resultados e Conclusões

Na avaliação da enzima livre, quando utilizados 2,0 mg da enzima glicose oxidase (correspondente a 0,53 mg de proteína) para 10 mL de solução de xilose na concentração de 10 g/L, houve formação de 0,89 g/L de ácido xilônico em duas horas. Quando oferecidos 10 mg de enzima (2,65 mg de proteína), para as mesmas condições do meio reacional, houve produção de 2,02 g/L de ácido xilônico em 2 horas. Com 6 horas de reação, foram formados 9,02 g/L de ácido xilônico, o que corresponde a 81,55% do rendimento teórico de conversão. Foi convencionada a utilização de 2,65 mg de proteína (10 mg de enzima) para avaliação das imobilizações. Nas condições de maior eficiência, houve a imobilização de 65,6% da proteína na técnica de entrecruzamento, 28,4% na ligação covalente com resina agarose-amino e 16,1% na ligação covalente em quitosana. As massas restantes de proteína foram perdidas nos sobrenadantes, ou seja, não se imobilizaram. Em 6 horas de reação, as técnicas de imobilização por entrecruzamento, ligação covalente em agarose-amino e em quitosana resultaram, respectivamente, em 1,6 g/L, 1,56 g/L e 3,19 g/L de ácido xilônico, correspondendo a 14,5%, 14,1% e 28,8% da conversão teórica de xilose a ácido xilônico. Com 24 horas de reação, obteve-se, para as imobilizações por entrecruzamento, ligação covalente em agarose-amino e em quitosana, rendimentos de 21,9%, 22,7% e 74,9% na conversão a ácido xilônico, respectivamente. Os resultados observados até o momento permitem concluir que a imobilização em quitosana, que teve a menor adesão da enzima ao suporte, resultou no maior rendimento de conversão dentre as imobilizações avaliadas. Possivelmente, além da perda de enzima nas lavagens (parcela não imobilizada), ocorre perda da atividade da fração imobilizada, devido às condições de imobilização de cada uma das técnicas. Até o momento, a imobilização por ligação covalente em quitosana se qualifica

como o melhor método para imobilização da enzima glicose oxidase, pois converte maior quantidade de xilose utilizando uma menor quantidade de enzima. Novas condições de imobilização para cada uma das técnicas devem ser avaliadas, de maneira a elevar a taxa de imobilização e evitar a perda de atividade da enzima durante o processo.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recurso proveniente do Sistema Embrapa de Gestão (Projeto C5 AGREGA).

Referências

- BUCHERT, J.; VIKARI, L.; LINKO, M.; MARKKANEN, P. Production of xylonic acid by *Pseudomonas-fragi*. **Biotechnology Letters**, London, v. 8, n. 8, p. 541-546, 1986.
- BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, L. V.; MIEZELINE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, Warsaw, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2005.
- LIEN, O. G. Determination of gluconolactone, galactonolactone and their free acids by hydroxamate method. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 8, p. 1363-1366, 1959.
- LIU, H.; VALDEHUESA, K. N. G.; NISOLA, G. M.; RAMOS, K. R. M.; CHUNG, W. Hight yied production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 115, p. 244-248, 2012.

Imobilização de extrato celulolítico produzido por *Aspergillus niger* e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Viviane C. B. Brasil¹, Thais D. Mendes²; Silviane Z. Hubinger³; Cristiane Farinas³; Mônica T. C. Damaso², Dasciana S. R. Gambetta²

Introdução

Materiais lignocelulósicos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a obtenção de etanol e outros bioprodutos. A desconstrução desses materiais envolve duas etapas: pré-tratamento e posterior conversão de polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. A despolimerização da celulose em glicose pode ser catalisada pela atuação sinérgica de três tipos de enzimas: endo- β -1,4-glicanase (E.C. 3.1.2.4), exo-glicanase (E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) (MARGEOT et al., 2009). Embora a conversão enzimática de celulose esteja se tornando viável, técnica e economicamente, o aperfeiçoamento deste processo, como por exemplo, pelo emprego de um biocatalisador imobilizado, pode levar a redução de custos (TISCHER; WEDEKING, 1999). O objetivo deste trabalho foi caracterizar o extrato celulolítico produzido por *Aspergillus niger* quanto às atividades em diferentes substratos celulósicos e avaliar seu desempenho, nas formas livres e imobilizadas, na hidrólise bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Métodos

Concentração e caracterização do extrato: O extrato celulolítico produzido por *A. niger* 3T5B8 foi concentrado em membrana Vivaspin® (GE Life Sciences) de 10 kDa. O extrato, antes e após concentração, foi caracterizado quanto ao teor de proteínas solúveis (Bradford – Biorad) e atividades enzimáticas (β -glicosidase, endoglicanase, exoglicanase e FPase). As atividades foram determinadas por ensaios miniaturizados adaptados de protocolos previamente descritos (GHOSE, 1987; XIAO et al., 2004).

Imobilização do extrato: O extrato foi imobilizado por entrecruzamento, em meio reacional pH 8, empregando iso-propanol como agente precipitante e glutaraldeído como agente interligante. O derivado imobilizado foi recuperado por centrifugação, lavado e ressuspendido em solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,1 M, pH 5.

1 1 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, 70770-901

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, 70770-901;

3 Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, São Carlos/SP, 13506-970.

*viviane.brasil@colaborador.embrapa.br; dasciana.rodrigues@embrapa.br

Hidrólise enzimática de biomassa: O desempenho do extrato enzimático como catalisador, em sua forma livre e imobilizada, foi avaliado na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (H_2SO_4 1,5% (v/v), 53 min a 120°C). Os ensaios de hidrólise foram realizados em tampão citrato de sódio/ácido cítrico, 0,1 M, pH 5, empregando concentração de 2% de sólido (m/v), 1,5 mL de catalisador (enzima livre ou suspensão do derivado imobilizado), em volume final de 5 mL. Os experimentos foram conduzidos, em triplicata, em reatores encamisados e agitação magnética, a 50°C, por período de 24 horas. Periodicamente, alíquotas foram retiradas e o teor de glicose quantificado por método colorimétrico (Glicose Monoreagente – Bioclin). Os resultados apresentados referem-se à média da triplicata dos ensaios.

Resultados e Conclusões

O extrato celulolítico produzido por *A. niger* apresentou os seguintes teores de proteína e valores de atividades, antes e depois da concentração, respectivamente:

- (i) proteínas solúveis: 0,73 e 7,02 mg/mL;
- (ii) β -glicosidase: 0,24 e 1,46 μ mol/min.mL;
- (iii) endoglicanase: 0,43 e 1,23 μ mol/min.mL;
- (iv) exoglicanase: 0,13 e 1,11 μ mol/min.mL; e
- (iv) FPase: 0,24 e 1,46 μ mol/min.mL.

Observou-se que os teores de proteínas solúveis e atividades enzimáticas apresentadas pelo extrato celulolítico antes da concentração são baixos, sendo necessária uma etapa de concentração para que seja viável empregar métodos de imobilização e avaliar o desempenho do extrato na hidrólise de biomassa pré-tratada. Porém, métodos de concentração de enzimas, em geral, resultam em perda de atividade. Comparando-se o teor de proteína nos extratos antes e após a concentração, o fator de concentração foi cerca de 10 vezes. Esse fator também foi observado para a atividade de exoglicanase. Para as demais atividades, o fator de concentração foi menor, cerca de 6 vezes para FPase e 3 vezes para endoglicanase e β -glicosidase.

Os resultados indicam que as enzimas endoglicanase e β -glicosidase são mais sensíveis ao processo empregado para a concentração. O método empregado para a imobilização do extrato celulolítico foi eficaz. O extrato, tanto em sua forma livre, como imobilizado, foi capaz de atuar como catalisador na hidrólise de biomassa pré-tratada. Após 24 h de hidrólise, foi possível obter um hidrolisado contendo 8,6 g/L de glicose, quando empregada a forma livre e 2,7 g/L, quando empregada a forma imobilizada. O menor rendimento obtido pelo emprego da forma imobilizada é resultante do menor poder catalítico do derivado, já que, no método empregado, parte da proteína é utilizada como suporte. Ajustes no método de imobilização e no processo de hidrólise serão avaliados para que a aplicação do derivado imobilizado resulte em um maior rendimento de glicose.

Pode-se concluir que o extrato celulolítico produzido por *A. niger* pode ser imobilizado por entrecruzamento e pôde ser aplicado na hidrólise de biomassa, tanto em sua forma livre como imobilizada.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado por recurso SEG (Projeto ETANOL2G).

Referências

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

TISCHER, W.; WEDEKING, F. Immobilized enzymes: methods and applications. **Topics in Current Chemistry**, Berlin, v. 200, p. 95-126, 1999.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. Microplate-base filter paper assay to measure total cellulase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 832-837, 2004.

Avaliação da adaptação de *Spathaspora passalidarum* na fermentação de frações hemicelulósicas

Breno R. Machado^{2*}, Sílvia B. Gonçalves¹, João Ricardo M. de Almeida¹ e Thályta F. Pacheco^{1**}

Introdução

A viabilidade do etanol lignocelulósico depende também do aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa que, em base seca, corresponde de 20 a 40% do material. Esta fração é constituída de diferentes carboidratos, majoritariamente pentoses (xilose em sua maior parte) e pequena fração de hexoses. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na produção comercial de etanol, não é capaz de consumir pentoses. Esses açúcares são fermentados por outras espécies de leveduras. *Spathaspora passalidarum*, avaliada neste trabalho, apresenta rápido crescimento e habilidade de consumir xilose após completo consumo da glicose do meio. Assim, a utilização da *S. passalidarum* se torna promissora para a produção de etanol a partir de fração hemicelulósica (NGUYEN et al., 2006). A utilização da fração hemicelulósica da biomassa para fermentação está condicionada ao uso de estratégias que superem o efeito de inibição de seus compostos tóxicos. A técnica escolhida foi a aclimação do microrganismo, que se baseia no cultivo sucessivo do microrganismo em concentrações crescentes dos compostos tóxicos (PROMPT, 2012; CARNEIRO, 2011). Neste contexto, o trabalho tem como objetivo avaliar e melhorar o desempenho da produção de etanol empregando *S. passalidarum* em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, obtidos por pré-tratamento ácido e por explosão a vapor. Foi utilizada estratégia de aclimação da levedura.

Métodos

Pré-tratamento: O pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar foi feito com ácido sulfúrico, em condições previamente estabelecidas. A fração líquida, contendo as pentoses recuperadas, teve o pH ajustado até 4,7 foi centrifugada e autoclavada. A fração hemicelulósica, obtida por explosão a vapor, foi cedida pelo CTBE e diluída 2,5 vezes para obtenção da mesma concentração de ácido acético do pré-tratamento ácido (3,75 g/L). Ambos foram suplementados com 6,7 g/L de YNB e até 50 g/L de xilose.

1 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Universidade de Brasília – UnB, Departamento de Engenharia Química

*breno.celestinio@colaborador.embrapa.br; **thalyta.pacheco@embrapa.br

Fermentação sem adaptação da levedura: *S. passalidarum* propagada em meio rico (YPX 10%) foi inoculada, numa concentração de 15 g/L, nas frações hemicelulósicas.

Adaptação da levedura: uma colônia foi inoculada em meio rico. Antes que ocorresse todo o consumo de xilose do meio, a levedura foi centrifugada e inoculada em um meio com 20% de fração hemicelulósica e 80% de YPX. Foram feitas transferências sucessivas das células para meios com concentrações crescentes de hidrolisado, até que o último meio tivesse 80% de hidrolisado e 20% de YPX. Todo o procedimento de aclimação ocorreu em 5 ciclos, para os quais foram monitoradas as concentrações de células, açúcares e produtos. O procedimento foi realizado separadamente para o hidrolisado de pré-tratamento ácido e de explosão a vapor.

Fermentação das frações hemicelulósicas com as leveduras adaptadas: A levedura aclimatada foi inoculada nos hidrolisados, numa concentração de 15 g/L. Para a verificação da adaptação, para o caso do pré-tratamento ácido, a cepa fermentada foi plaqueada, propagada em meio rico e inoculada novamente em meio hidrolisado. Todas as fermentações foram conduzidas em triplicata, em shaker rotativo, a 30°C e 150 rpm, com retirada periódica de alíquotas. As concentrações de açúcares e produtos foram determinadas por cromatografia líquida em coluna Aminex HPX 87H.

Resultados e Conclusões

Fermentação sem adaptação da levedura: Para o hidrolisado de pré-tratamento ácido, até 120 horas de fermentação, foram consumidos 0,4 g/L de glicose e 2,5 g/L de xilose, sem formação de etanol. Para o hidrolisado de explosão a vapor, não houve consumo de nenhum dos açúcares do meio, indicando que a levedura não está adaptada às condições dos hidrolisados.

Fermentação das frações hemicelulósicas com as leveduras adaptadas: para o hidrolisado de pré-tratamento ácido, a glicose foi consumida em 4 horas de fermentação e a xilose em 48 horas. Foram produzidos 19,64 g/L de etanol, correspondente a um fator de conversão de substrato em etanol de 0,404 g de etanol/g de açúcar, produtividade de 0,357 g de etanol/L.h e velocidade de consumo de substrato de 0,884 g de açúcar/h. A levedura apresentou ligeiro crescimento e viabilidade final de 76,3%. Na verificação da aclimação, após propagação em meio rico, o consumo de açúcares fermentescíveis do meio ocorreu após 110 horas. Nas primeiras 48 horas de fermentação foram produzidos, 12,38 g/L de etanol, o que corresponde a um fator de conversão de substrato em etanol de 0,302 g de etanol/g de açúcar, produtividade de 0,208 g de etanol/L.h e velocidade de consumo de substrato de 0,689 g de açúcar/h. Verificou-se que o aumento da tolerância aos compostos tóxicos ocorreu parcialmente em razão da aclimação ter tornado a cepa mais tolerante aos inibidores presentes no meio de fermentação, visto que estas foram capazes de manter parte de suas características após propagação em meio rico. Porém, como o

desempenho da fermentação com levedura propagada em meio rico foi menor em termos de rendimento, produtividade e velocidade de consumo do substrato, há indicação de que parte das características observadas na cepa aclimatada não foram propagadas para as novas células.

Para o hidrolisado de explosão a vapor houve, em 8 horas, completo consumo da glicose (aproximadamente 10 g/L) e de apenas 5 g/L de xilose em 48 horas. Neste tempo, a viabilidade da cepa era de 20%, ou seja, esta ainda não se mostrou adaptada às drásticas condições do hidrolisado. Pode-se concluir que a estratégia de adaptação da cepa *S. passalidarum* melhorou o seu desempenho na fermentação de meio hidrolisado de pré-tratamento ácido. Para o hidrolisado de explosão a vapor, a estratégia empregada ainda não se mostrou eficaz.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos proveniente do Sistema Embrapa de Gestão (Projeto SUPERMICRO)

Referências

CARNEIRO, L. M. **Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol.** 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, São Paulo.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232 – 1241, 2006.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Preparo e aplicação da hidrotalcita na produção de biodiesel

Isabela C. Curado^{1,2}, Emerson Leo Schultz¹, Grace F. Ghesti², Itânia Soares Pinheiro¹*

Introdução

O biodiesel é produzido industrialmente pela transesterificação básica, utilizando um catalisador homogêneo. Embora o processo já esteja bem estabelecido, existe um grande esforço das pesquisas para encontrar um catalisador heterogêneo com eficiência semelhante ao catalisador homogêneo. Esse catalisador traria benefícios como a possibilidade de reutilização em ciclos consecutivos, menor geração de resíduos, e consequente facilidade de purificação do biodiesel e glicerina.

Uma gama de catalisadores heterogêneos vem sendo pesquisada para a síntese do biodiesel. Alguns exemplos são: óxidos metálicos como CaO, MgO, SrO, carbonatos $MgCO_3$, $BaCO_3$, zeólitas básicas e as hidrotalcitas (HELWANI et al., 2009). As zeólitas, apesar de apresentarem alta seletividade na produção de biodiesel, podem não gerar altas taxas de conversão devido à sua limitação quanto ao tamanho da molécula a ser sintetizada, pois seus canais podem dificultar a passagem de moléculas maiores e assim, sua difusão no espaço cristalino. Já as hidrotalcitas possuem características favoráveis na produção de biodiesel, pois a presença de água, apesar de comprometer a atividade de alguns catalisadores heterogêneos, pouco afeta as hidrotalcitas. Essas últimas possuem vantagens, como o fácil preparo e baixo custo (ELLABBAN et al., 2014).

Esse trabalho tem como objetivo produzir hidrotalcita e testá-la na produção de biodiesel.

Metodologia

A hidrotalcita foi preparada segundo Villanueva (2005) e Andrade (1997). O método utilizado foi da coprecipitação, utilizando a solução (B) formada por agentes precipitantes, carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) e hidróxido de sódio (NaOH), titulada pela solução (A) composta por nitrato de alumínio nonaidratado ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) e nitrato de magnésio hexaidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$). A razão molar para a hidrotalcita sintetizada foi de Al/(Al+Mg) 0,20, calcinada a 550 °C. O processo de envelhecimento, importante na formação cristalina, foi feito em repouso de 21h em temperatura ambiente. A filtração foi necessária

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Laboratório de Catalise, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900.

*isabelaccurado@gmail.com, Itania.soares@embrapa.br

até o pH 7-8, para a retirada dos íons Na^+ que podem contaminar o catalisador. Após a secagem em estufa por 18h a 110 °C realizou-se a calcinação em rampas como citado em Villanueva (2005). Os resultados foram comparados com a hidrotalcita comercial fornecida pela empresa japonesa Kyowa Chemical Industry Co., Ltd. As hidrotalcitas foram identificadas como HT 550 (hidrotalcita sintetizada) e HT COM (hidrotalcita comercial).

Para caracterização da hidrotalcita foram realizadas análises de difração de raios x (DRX), marca Rigaku, modelo D/MAX-2A/C e análise térmica (TG/DTG/DTA), equipamento 2960 Simultaneous DSCTGA (TA Instruments).

Os catalisadores foram ativados em mufla a 300 °C, por duas horas. Para as reações de transesterificação foram variados os parâmetros: razão molar óleo/álcool, concentração de catalisador, e tempo de reação. As reações foram todas processadas a 100 °C e agitação de 1000 rpm. As reações foram conduzidas em mini reatores de 5 mL, utilizando 1 g de óleo de soja. O teor de éster foi determinado segundo método proposto por Ghesti (2009), utilizando um espectrômetro de infravermelho médio, marca PerkinElmer, modelo Spectrum Two e os dados foram tratados com o programa OPUS.

Resultados e Conclusões

Nas análises de difração de raios X, os picos característicos da hidrotalcita não calcinada foram agudos e simétricos para valores baixos de 2θ , nos planos (003) e (006), referentes à presença de pequenos cristais formados por poucas lamelas empilhadas e picos assimétricos e de baixa intensidade para ângulos maiores, de acordo com o descrito por Andrade (1997). Após a calcinação, há a permanência da fase de óxidos mistos de MgO nas difrações de 43 e 63° (2θ) (ANDRADE, 1997). Para as análises térmicas, foi possível notar a presença de três picos endotérmicos, referentes à: perda de água, desidroxilação e remoção de carbonatos. Além disso, a temperatura de calcinação estabelecida de 550°C foi escolhida para o favorecimento da formação de óxidos mistos, a fase mais ativa para a hidrotalcita.

Para a produção de biodiesel, foram encontrados os seguintes teores de éster nas reações:

HT COM – razão molar óleo/álcool - 1:18; concentração de catalisador – 10%; e tempo de reação – 4 h; teor de éster – 100%.

HT COM – razão molar óleo/álcool - 1:18; concentração de catalisador – 10%; e tempo de reação – 2 h; teor de éster – 71,53%.

HT COM – razão molar óleo/álcool - 1:12; concentração de catalisador – 10%; e tempo de reação – 2 h; teor de éster – 64,13%.

HT 550 – razão molar óleo/álcool - 1:12; concentração de catalisador – 5%; e tempo de reação – 2 h; teor de éster – 50,20%.

Com base nos dados obtidos pode-se concluir que o uso da hidrotalcita como catalisador para biodiesel é promissor. A hidrotalcita sintetizada não mostrou um valor muito satisfatório quando comparada a hidrotalcita comercial. No entanto, novos testes devem ser feitos otimizando os parâmetros através de um planejamento experimental.

Deve-se ressaltar ainda que estudos devem ser conduzidos tanto com aumento de escala quanto na reutilização desses catalisadores já que a principal vantagem do catalisador heterogêneo é possibilitar sua reutilização. Além disso, os catalisadores podem ainda ser testados com óleos ácidos. Quando se utiliza óleo ácido para produção de biodiesel, normalmente é necessária uma etapa extra no processo pra esterificar os ácidos graxos livres. Encontrar um catalisador capaz de esterificar os ácidos graxos livres e transesterificar os triglicerídeos é, sem dúvida, um grande desafio e pode representar enorme ganho para o processo.

Referências

ANDRADE, R. de C. dos S. **Remoção de Cr(VI) de soluções aquosas utilizando argilas aniônicas tipo hidrotalcita**. 1997. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

ELLABBAN, O.; ABURUB, H.; BLAABJERG, F. Renewable energy resources: current status, future prospects and their enabling technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 39, p. 748-764, 2014.

GHESTI, G. F. **Preparação e caracterização de catalisadores para produção de biocombustíveis**. 2009. 123 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; FERNANDO, W. J. N.; KIM, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 90, n. 12, p. 1502-1514, 2009.

VILLANUEVA, S. B. L. **Preparação e caracterização de hidrotalcitas Mg/Al calcinadas e suas propriedades catalíticas para reações de conversão de etanol**. 2005. 238 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

Estudo prospectivo para a síntese de poliésteres renováveis a partir de glicerol.

Talita R.H. R. Silva^{1,2}, Larissa Andreani², Leonardo F. Valadares²*

Introdução

Devido a incentivos do governo brasileiro e à crescente preocupação com o aquecimento global, observa-se um aumento na produção de biodiesel no Brasil. A lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, estabelece o percentual de adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel de 7% a partir de 1º de novembro de 2014. O glicerol, subproduto da reação de transesterificação dos ésteres de ácidos graxos, pode ter papel importante na comercialização viável do biodiesel, desde que seja valorizado economicamente por meio de aplicações de larga escala que agreguem valor à cadeia do biodiesel, por exemplo, obtendo novos materiais a partir desse coproduto. Somado a isso, o uso indiscriminado de recursos fósseis ao longo do tempo, a consequente preocupação com o meio ambiente e a estagnação em inovação de polímeros sintéticos impulsionaram o crescimento de pesquisas para a produção e aplicação de polímeros renováveis (BASTOS, 2007).

Os polímeros renováveis (ou verdes) podem ser definidos como sendo macromoléculas formadas pela repetição de grande número de unidades químicas (monômeros) possuindo massa molar da ordem de 10^4 a 10^6 que empregam matérias-primas renováveis durante o processo de polimerização. Quando comparados aos polímeros convencionais, os polímeros renováveis produzem menor impacto ambiental durante seu processamento e degradação (BRITO et al., 2011), além de possuírem fontes com ciclo de vida menor e com menor tempo de biodegradação sob condições favoráveis.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência de policondensação entre o monômero glicerol e ácido cítrico ou ácido succínico sem a adição de catalisadores, levando em conta os efeitos de temperatura e tempo na reticulação do material.

Parte Experimental

Glicerol, ácido cítrico e ácido succínico foram obtidos da Sigma, Dinâmica e Vetec, respectivamente.

Para a policondensação de glicerol e ácido cítrico, inicialmente foi realizada a adição do ácido ao glicerol (razão molar 1:1) a 150 °C. O sistema reacional permaneceu nessa

1 Engenharia Automotiva, Faculdade UnB Gama, Brasília/DF.

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*talita.silva@colaborador.embrapa.br; leonardo.valadares@embrapa.br

temperatura com agitação constante por 5 minutos e, em seguida, a solução resultante foi vertida em placa de petri de vidro. Para a policondensação de glicerol e ácido succínico, o ácido foi adicionado ao glicerol (razão molar 1:1,5) a 190 °C e, após 5 minutos, a solução resultante foi vertida em placa de petri de vidro.

Depois, as amostras foram colocadas em forno mufla e submetidas ao planejamento fatorial com 4 pontos extremos e 1 ponto central, com as seguintes condições: A) 90 °C por 4 horas; B) 90 °C por 24 horas; C) 130 °C por 14 horas; D) 170 °C por 4 horas; e E) 170 °C por 24 horas.

Os polímeros obtidos foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento FTIR Spectrum Two, Perkin Elmer, com acessório de refletância total atenuada (ATR) empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Todos os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras.

Resultados e Conclusões

Para as condições A e B, as amostras obtidas apresentaram-se gelatinosas para o ácido cítrico e sólidas para o ácido succínico. Essa observação indica que a reticulação do glicerol na presença de ácido cítrico ocorre de forma mais lenta que a reticulação de glicerol com ácido succínico. Para as demais condições, houve a formação de polímeros sólidos com coloração variando de acordo com o tempo ao qual foram submetidas. Durante o processo de policondensação, ocorre a liberação de água do meio reacional, levando à formação de bolhas na matriz polimérica. Os polímeros contendo ácido cítrico, nas condições D e E, apresentaram matriz com grande incidência de poros. Esse resultado indica que, para esse sistema, a temperatura tem maior influência sobre o processo de polimerização em comparação com o tempo de reação, sugerindo que a 170 °C a velocidade de reticulação do sistema é bastante rápida. Os polímeros contendo ácido succínico solidificaram-se sem a presença de bolhas revelando uma reação de polimerização mais controlada, uma vez que o tempo de reação foi suficiente para que as bolhas surgissem e atingissem a superfície da matriz antes de sua total reticulação.

Os espectros de FTIR dos poliésteres preparados a partir de glicerol e ácido cítrico em todas as condições analisadas mostraram absorções que correspondem à formação do grupamento éster na região entre 1753 – 1665 cm^{-1} e 1247 – 1144 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2007), comprovando a formação do polímero. Além disso, foi observada uma diminuição da banda de hidroxila com o aumento de temperatura para as condições A a E. Comparando-se as condições A e B, não foram observadas diferenças na intensidade da banda relacionada à hidroxila, em 3550 – 3142 cm^{-1} . O mesmo foi observado quando se comparou os espectros das condições D e E (banda de hidroxila em 3566 a 3142 cm^{-1}), sugerindo que o tempo não

é um fator relevante na policondensação de glicerol com ácido cítrico em uma mesma faixa de temperatura.

Para os espectros dos poliésteres preparados a partir de glicerol e ácido succínico as condições A a E resultaram em materiais com absorções de infravermelho que correspondem à formação do grupamento éster entre $1750 - 1677 \text{ cm}^{-1}$ e $1228 - 1136 \text{ cm}^{-1}$. A baixa intensidade da banda de hidroxila do poliéster da condição B ($3468 - 3194 \text{ cm}^{-1}$) associada à alta intensidade da banda de éster indica maior grau de polimerização para esta condição quando comparada à condição A. As condições C, D e E revelaram semelhante diminuição na intensidade da banda referente à hidroxila em $3527 - 3214 \text{ cm}^{-1}$, indicando grau de polimerização semelhante.

Ambos os sistemas demonstraram alto grau de polimerização, porém, pelo aspecto físico dos poliésteres obtidos, as melhores condições foram as reações que empregaram temperaturas de $130 \text{ }^\circ\text{C}$ e $170 \text{ }^\circ\text{C}$.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado com recursos do projeto DENDEPALM/FINEP.

Referências

BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 set. 2014. Seção 1, p. 3.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 28, p. 201-234, 2007.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 6.2, p. 127-139, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão-manso por rota metálica

Rodrigo S. N. Siqueira^{1,2*}, Adriana S. Oliveira^{1,3}, Simone Mendonça¹, Lorena C. Garcia¹

Introdução

A necessidade do uso da energia renovável atrelada à diminuição na emissão de carbono na atmosfera vem contribuindo para a ascensão da produção de biocombustíveis no Brasil nos últimos anos (CARVALHO; CARRIJO, 2007). A partir de uma reação de transesterificação o óleo vegetal proveniente de diferentes fontes renováveis se obtém o biodiesel, produto com características semelhantes às do diesel de origem fóssil. O biodiesel pode ser classificado como um éster monoalquílico de ácidos graxos, sendo gerado a partir da reação entre triacilgliceróis com etanol ou metanol, na presença de um catalisador, sendo a catálise básica a mais utilizada. O biodiesel vem de forma paulatina substituindo o diesel (PRATES et al., 2007), sendo que todo diesel combustível comercializado no Brasil contém 7% de biodiesel.

No Brasil, há grande diversidade de fontes vegetal de óleo, tais como a soja, algodão, macaúba, canola, pinhão-manso, dendê, indaiá, buriti, pequi, mamona e babaçu, que podem ser utilizada para produção deste biocombustível (PRATES et al., 2007), respeitando as particularidades regionais para cada cultura. A adoção do pinhão-manso como uma cultura potencial para atender ao programa nacional de produção de biodiesel, deve-se, principalmente, ao potencial de rendimento de óleo, por ser uma espécie não alimentar e devido ao seu manejo ser compatível com o perfil da agricultura familiar (LAVIOLA et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de produção de biodiesel a partir do óleo de pinhão-manso, utilizando a rota metálica de transesterificação. Esta otimização foi realizada a partir dos resultados obtidos em um trabalho desenvolvido anteriormente (OLIVEIRA, 2014), no qual foi realizado um *screening* de variáveis que poderiam ter influencia nas características do biodiesel produzido por meio da rota metálica de transesterificação. As variáveis porcentagem de hidróxido de potássio e razão molar (metanol/óleo) foram as que apresentaram maiores efeitos no rendimento e qualidade do biodiesel e foram selecionadas para serem otimizadas.

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Universidade Católica de Brasília, QS 07, Lote 01, EPCT, s/n- Taguatinga, Brasília/DF

3 Universidade de Brasília, Área Especial de Indústria Projeção A, UnB-FGA- DF-480- Gama Leste, Brasília- DF, 72444-240
silveira.farm@gmail.com; lorena.garcia@embrapa.br

Material e Métodos

O óleo de pinhão-manso utilizado para a produção do biodiesel foi obtido a partir de uma mistura de diferentes genótipos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Agroenergia (Planaltina – DF). Para otimização da produção de biodiesel foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), com 2 variáveis, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. Tanto a porcentagem de hidróxido de potássio, quanto à razão molar (metanol/óleo) foram estudadas em cinco níveis (-1,41; -1; 0; 1; 1,41), sendo que a porcentagem de hidróxido de sódio variou de 1,5 a 2,5 e a razão molar de 2:1 a 6:1. O tempo de reação foi de 30 minutos e a temperatura foi mantida em 30°C com agitação constante de 400 rpm em todos os experimentos. Após a reação, as fases formadas foram centrifugadas por 8 minutos a 9.000 rpm. Com a separação das fases, o biodiesel formado foi lavado com ácido cítrico em uma concentração proporcional a quantidade de hidróxido de potássio inicialmente utilizada. Após a lavagem, o biodiesel foi novamente centrifugado e, após a nova separação de fases, o biodiesel foi rotaevaporado até a evaporação completa da água presente. Os principais parâmetros avaliados foram rendimento (peso do biodiesel em relação ao peso inicial de óleo) e pureza do produto final, baseada no teor de ésteres (EN 14103). A qualidade do biodiesel foi determinada ainda com base na avaliação da viscosidade (NBR nº 14065) e densidade (NBR nº 10441). As normas citadas estão disponíveis em Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2014). Os resultados foram analisados através do software Statistica 12.

Resultados e Conclusões

Ao se avaliar o rendimento de produção do biodiesel, verificou-se que a variável razão molar tem efeito significativo na produção de biodiesel. Ao aumentar a quantidade de metanol na reação, proporcionalmente aumenta a produção de biodiesel, mas isso acontece somente até a razão 4:1; após este ponto, o aumento na quantidade de metanol, reduz o rendimento de biodiesel. Os resultados obtidos para viscosidade corroboram com os obtidos no rendimento, já que concentrações mais elevadas de metanol resultam em um material com viscosidade muito alta, próxima da viscosidade inicial do óleo, indicando então que a reação de transesterificação não ocorreu de forma eficiente. Para resposta densidade, nenhuma variável apresentou efeito significativo. A análise do teor de éster, que fornece a eficiência do processo de transesterificação, não foi afetada por nenhuma das variáveis estudadas.

Conclui-se então que a variável porcentagem de KOH não teve efeito significativo na produção de biodiesel, nas condições de processo e nos limites utilizados neste estudo. Já a razão molar teve efeito significativo, sendo positivo seu aumento até a razão de 4:1 e negativo a partir deste valor. Uma possível explicação para isso é uma diluição excessiva do óleo, o que não favoreceu o processo de transesterificação. Portanto, nas condições de

processo utilizadas, a condição ótima para produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão manso é 1,5% de KOH e razão molar (metanol: óleo) de 4:1.

Apoio Financeiro

Agradecemos o suporte financeiro da Embrapa e da Finep

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 ago. 2014. Seção 1, p. 68.

CARVALHO, S. P.; CARRIJO, E. L. O.; **A produção de álcool: do Proálcool ao contexto atual**. Trabalho apresentado no XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Londrina, Paraná. 2007. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/6/685.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T. B.; ALBRECHT, J. C. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhao-manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

PRATES, C. P. T.; PIEROBON, E. C.; COSTA, R. C.; **Formação do mercado de biodiesel no Brasil**. BNDES Setorial, 2007. Disponível em: <http://www.bndespar.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2502.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2015.

OLIVEIRA, A. S. **Uso do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel**. 2014. 59 f. Monografia (graduação) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Otimização das etapas de hidrólise e filtração para a quantificação de carboidratos estruturais e lignina de bagaço de cana-de-açúcar

Letícia M. C. Filardi^{1,2}, Raquel B. Campanha¹*

Introdução

O etanol, uma importante fonte de energia renovável, pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas e diferentes tecnologias de conversão. No Brasil, as tecnologias de primeira geração baseiam-se na fermentação do caldo de cana-de-açúcar, enquanto que as de segunda geração, o processo fermentativo é baseado nos açúcares liberados do bagaço por hidrólise da celulose (SOCCOL et al., 2010). O bagaço de cana-de-açúcar, nos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos usados na produção de etanol de segunda geração, já que apresentam alto teor de carboidratos e baixo teor relativo de lignina (PANDEY et al., 2000).

O desenvolvimento de processos para a produção de etanol, envolve a otimização de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. Para a avaliação da eficiência desses processos, é fundamental a exata composição química da biomassa (GOUVEIA et al., 2009). O método de determinação de carboidratos estruturais e lignina consiste em uma hidrólise ácida com duas etapas que fraciona a lignina em material insolúvel em ácido (lignina insolúvel) e material solúvel em ácido (lignina solúvel). Os carboidratos poliméricos são também hidrolisados e os monômeros formados são solubilizados na fração líquida do hidrolisado (SLUITER et al., 2008).

Esse trabalho teve como objetivo otimizar as etapas de hidrólise e filtração para a implementação de um método confiável de quantificação de carboidratos estruturais e lignina de bagaço de cana-de-açúcar.

Materiais e Métodos

A determinação dos teores de carboidratos estruturais e lignina foi realizada segundo método proposto por Sluiter et al. (2008), com adaptações. Amostras de 0,3 g foram transferidas para tubos de pressão com 3 mL de ácido sulfúrico 72% e colocadas em banho termostático a 30°C por 1 h, a cada 10 min os tubos eram agitados. Após a adição de 84 mL de água, os tubos foram tampados e autoclavados a 121°C por 1 h. O material resultante foi

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, W3 Norte, Brasília/DF, 70770-901

2 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, 70910-900

*lmcfilardi@gmail.com; raquel.campanha@embrapa.br

filtrado em cadinhos tipo Gooch, nessa etapa, três modelos de cadinho foram testados: um de porcelana, recomendado pelo método, e dois de vidro, sendo um de porosidade n° 2 (C2) (40 a 100 μm) e outro n° 4 (C4) (10 a 16 μm). Para o teor de lignina solúvel (LS), a absorbância do filtrado foi determinada a 240 nm. Para o teor dos carboidratos estruturais (CE), 10 μL do filtrado foi injetado em HPLC-RID e as concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas. Os cadinhos contendo a lignina insolúvel (LI) foram secos em estufa a 105°C *overnight* e, em seguida, levados à mufla a 500°C por 3 h. As análises foram feitas em duplicata e a diferença entre as médias foi analisada estatisticamente pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Resultados e Conclusões

Foram realizados diversos testes para a implementação do método. Primeiramente o cadinho de porcelana recomendado foi testado. No entanto, por ser pouco poroso, não foi possível filtrar a amostra mesmo com o uso de bomba de vácuo. Deste modo, como alternativa, foram testados cadinhos de vidro com duas porosidades diferentes, C2 e C4. Como o método recomenda realizar a queima do resíduo insolúvel a 575°C, teve-se que reduzir a temperatura da queima para 500°C devido à substituição do cadinho.

Quatro repetições de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar foram hidrolisadas, duas delas foram filtradas no C2 e duas no C4. Após a filtração, foi observada a presença de partículas no filtrado do C2 (FC2), enquanto que, o filtrado do C4 (FC4) mostrou-se límpido. Foi necessário passar o FC2 em um filtro de seringa de 0,22 μm , antes da leitura no espectrofotômetro, para evitar a interferência das partículas insolúveis. Os teores de LS encontrados foram 4,96 e 4,98% para FC2 e FC4, respectivamente. Os valores de LI obtidos foram 18,92% para C2 e 24,34% para C4. Analisando estatisticamente esses resultados, observa-se que os teores de LS não diferiram, ao contrário dos valores de LI, indicando que, a diferença de porosidade dos cadinhos influenciou apenas o teor de LI. Esses resultados sugerem que C2 permitiu a passagem de parte da LI para o filtrado, que foi removida antes da determinação de LS. O teor de lignina total (LT) foi obtido a partir da soma dos teores de LS e LI. Com isso, os valores de LT encontrados foram 19,26% para C2 e 25,04% para C4.

O ponto de controle da hidrólise ácida é a observação do pico cromatográfico referente à celobiose, sua presença indica que a reação não foi completa. Durante a implementação do método foi observada a presença da celobiose em duas situações, ambas na primeira etapa da hidrólise. Uma foi no uso do banho com temperatura abaixo de 30 \pm 1°C e outra, na agitação que deve ser realizada ao menos 5 vezes para cada tubo durante o tempo de reação. Os teores de CE foram os mesmos, tanto para C2 quanto C4, que apresentou 41,97% de celulose e 23,56% de hemicelulose.

Todos os valores encontrados para C4 foram próximos ao publicados por NREL (ESTADOS UNIDOS, 2015), que variam de 23,09 a 27,56% para LT, 31,87 a 43,39% para celulose, e,

12,23 a 25,47% para hemicelulose. Com isso, conclui-se que, para a determinação de teor de lignina, o cadinho C4 foi melhor que o C2, e, mesmo com as adaptações, a exatidão dos resultados não foi comprometida.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pela Embrapa.

Referências

ESTADOS UNIDOS. Department of Energy. Biomass Program. **All struct properties**. Disponível em: <<http://www.afdc.energy.gov/biomass/progs/search1.cgi>>. Acesso em: 31 jul. 2015. Consulta à Biomass Feedstock Composition and Property Database.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. do; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. D. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

PANDEY A.; SOCCOL C. R.; NIGAM P.; SOCCOL V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Colorado: NREL, 2008. Technical Report NREL/TP-510-42618. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/publications/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

Preparo de misturas de óleo de soja e sebo bovino para a reação de transesterificação e sua caracterização

Jéssica S. Silva^{1}, Ian Fernandes de Faria¹, Itânia Pinheiro Soares¹*

Introdução

Atualmente, existe uma grande busca por fontes de energias alternativas as fósseis, pois estas estão cada dia mais escassas. Arelado a este problema, existe a questão ambiental proveniente da queima de combustíveis, causando mudanças climáticas, tornando-se imprescindível o uso de energias limpas. Neste cenário, o biodiesel vem ganhando destaque por ser uma fonte de energia renovável. Hoje a matéria-prima mais utilizada para produção de biodiesel no país é o óleo de soja, tendo atingido um percentual de utilização de 75,57% em março de 2015. Além do óleo de soja, devido ao seu baixo custo, o sebo bovino é a segunda matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel, com 20,39% de utilização (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2015).

A utilização do sebo bovino para a produção de biodiesel se mostra como vantajosa ambientalmente, pois está dando-se uma destinação eficiente do produto, oriundo do abate bovino, transformando o potencial dejetado em fonte de energia limpa. Porém, o sebo bovino apresenta um alto teor de cadeias saturadas, o que pode ser um problema, já que devido a este fator ele apresenta um alto ponto de solidificação (MORAES, 2008). Para evitar tal desvantagem, uma solução encontrada é a sua utilização em misturas com óleo de soja, normalmente não superiores a 30% de sebo.

Ao se fazer um estudo prévio sobre as vantagens do uso da gordura animal para a produção do biodiesel, este trabalho tem como objetivo produzir este biocombustível a partir de misturas em proporções pré-determinadas de óleo vegetal com sebo bovino e caracterizá-las verificando suas propriedades físico-químicas a partir da Resolução N° 45/2014 da ANP.

Metodologia

O sebo bovino adquirido em restaurante foi derretido em banho maria, e misturado ao óleo de soja. Após a mistura atingir a temperatura de 60°C, foi adicionado hidróxido de potássio diluído ao metanol. Foi utilizada uma razão metanol:álcool 6:1 e 0,8% de KOH,

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;
*jessica.souza@colaborador.embrapa.br; itania.soares@embrapa.br ;

como catalisador. A reação durou 1 hora, a temperatura de 60°C. Após cada reação, a glicerina formada por decantação foi retirada e então o biodiesel foi lavado com solução 10% de ácido cítrico e logo após foi lavado novamente com água destilada. Depois desse processo, o biodiesel foi levado para um rotaevaporador para a retirada de água e metanol excedente. O processo de rotaevaporação ocorreu por 1 h, onde nos 30 min iniciais a água de aquecimento estava a 50°C e no tempo restante a 90°C. As misturas de óleo de soja e sebo bovino foram definidas nas proporções de 20:80;30:70;40:60;50:50;60:40;70:30, respectivamente. Após este processo, as amostras foram caracterizadas por ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) seguindo a norma ABNT NBR 14747:2008, densidade pela norma ABNT NBR 14065:2003 e viscosidade Cinemática a 40°C seguindo a norma ABNT NBR 10441:2007.

Resultados e Conclusões

Para o ensaio de ponto de entupimento, observou-se os seguintes resultados para PEFF: 100% óleo de soja -2,6°C; 30% de sebo bovino - 6°C; 40% - 8,6°C; 50% - 11°C; 60% - 12°C; 70% - 13,3°C; 80% - 15,6°C. Assim, pode-se observar que com o aumento da quantidade de sebo bovino ocorreu um aumento no PEFF, conforme esperado. Tal fato pode ser explicado pela presença de um maior número de ácidos graxos saturados na composição do sebo bovino.

De acordo com os resultados, apenas a amostra com 100% óleo de soja seria apropriada para ser usada em qualquer estado do país, independente da época do ano. A amostra contendo a mistura com 30% de sebo bovino poderia ser usada em praticamente todas as regiões, com exceção da região sul, entre os meses de junho a outubro. Já a amostra com 80% de sebo bovino estaria inviável de ser usada em qualquer região, visto que pela Norma da ANP o valor de 15,6 °C seria superior ao valor máximo estabelecido (14 °C).

Para o ensaio de densidade, todas as amostras apresentaram valores dentro do estabelecido pela resolução da ANP, na qual o valor da densidade deve estar entre 850 e 900 kg/m³, mostrando que para este ensaio, as amostras continuam dentro da especificação.

Os resultados do ensaio de viscosidade dos biodiesel sintetizados a partir das misturas de sebo bovino e óleo de soja estão próximos aos valores limites estipulados pela Resolução nº 45 da ANP de 3 a 6 mm²/s. Pode-se notar que quanto maior a porcentagem de sebo bovino na amostra mais viscosa ela se torna, em decorrência da maior presença dos ácidos graxos saturados

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pelo MCTI/CNPq 40/2013.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 ago. 2014. Seção 1, p. 68.

CUNHA, M. E. **Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Boletim Mensal do Biodiesel**, Brasília, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=77873&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&144560143915>>. Acesso em: jun. 2015.

MORAES, M. S. A. **Biodiesel de sebo: avaliação de propriedades e testes de consumo em motor a diesel**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.



GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Sugarcane endophytic fungi as a source of new strains producing lipase

Larissa C. R. Magalhães^{1,3*}, Carolina M. Poletto³, Jheniffer R. Cunha^{2,3},
Paula F. Franco³, Thais F. C. Salum³, Léia C. L. Fávares³

Background

Lipases are enzymes widely distributed in nature, which catalyze the hydrolysis of fats and oils into free fatty acids, acting on lipid substrates emulsified (DHEEMAN et al., 2011). The industrial demand for new lipase sources with different enzymatic characteristics promote the isolation and detection of new strains with lipase activity (COLEN et al., 2006). These enzymes are considered alternative catalysts for biodiesel synthesis. However, its high cost and low efficiency, hamper its implementation on industrial scale. Endophytic microorganisms inhabit, for at least one period of their life cycle, the interior of the host plant without inducing disease symptoms or producing external structures (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Our group has previously shown the capacity of some endophytic fungi to secrete hydrolytic enzymes such as lipase, specifically fungal strains isolated from *Saccharum officinarum* leaves (FÁVARO et al., 2011). In this context, this study aimed to characterize a collection of endophytic fungi from sugarcane, to identify novel lipase-producing strains.

Methods

A collection of 205 endophytic fungi isolated from sugarcane leaves was evaluated. Lipase/esterase activity was detected using culture media containing the substrates olive oil, triolein, tributyrin, Tween 20, and Tween 80. Plates were incubated at 25°C for 4 days. The enzymatic index (EI = diameter of halo/diameter of colony) was calculated in duplicate. Besides the detection of lipase/esterase activity, fungal strains were also analyzed at conditions of low water activity (aw), in order to selecting/select strains more adapted to bioprocess conditions. The procedure was to cultivate fungal strains the culture media MY50G (with 50% glucose) and DG18 (with 18% glycerol), indicated to grown xerophilic fungi. For that evaluation, the tests (triplicate) were performed by measure the colony diameter after incubation at 25°C for 10 days. Selected strains were identified by sequencing and phylogenetic analysis of ITS1-5.8S-ITS2 region of ribosomal DNA.

1 Universidade Paulista (Unip), Brasília, Distrito Federal, Brasil

2 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil

3 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

*larissa.magalhaes@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

Results and Conclusions

Olive oil is suitable for the detection of lipase activity, whereas the other substrates may be degraded by both lipases and by esterases. The simultaneous use of different substrates allowed to trace the phenotypic profile of each strain. This approach helps reducing the number of strains to be further evaluated by quantitative assay. In this regard, it was prioritized the selection of lipase producing fungi over esterase, for their subsequent application in biodiesel synthesis. The results showed that fungal strains were categorized in different phenotypic classes according to the substrate degradation profile. The exclusive degradation of only one of the five substrates was observed to 33% of the strains. From a total of 205 strains, 5.0% degraded olive, 11.0% Tween 20, 2.0% Tween 80, 7.0% tributyrin, 8.0% triolein, and 51.0% didn't show any degradation. As for simultaneous degradation, in other words, degradation of more than one substrate: 8 strains showed enzymatic activity in olive and triolein; 2 strains in olive and tributyrin; 1 strain in olive and Tween 20; 3 strains in olive, triolein and Tween 20; 1 strain in olive, triolein, Tween 20 and Tween 80; 1 strain in triolein and Tween 80; 2 strains in olive and tributyrin; 7 strains in Tween 20 and Tween 80; 2 strains in tributyrin and Tween 20 and 1 strain in all of the substrates. The tolerance to conditions of low water activity was investigated. 57% of the strains were capable of growing on culture medium MY50G ($a_w = 0,91$) and 59% at culture medium DG18 ($a_w = 0,94$). Some strains that presented high enzymatic index were also capable of growing on low water activity, indicating that they could be candidates for producing lipases at solid state fermentation. Analysis of the sequence of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the ribosomal DNA showed that selected strains belong to the class Ascomycota, specifically to the genera *Ampelomyces*, *Bipolaris*, *Gibberella*, *Bionectria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Myrmecridium*, *Talaromyces*, and *Gaeumannomyces*. The lipase production of selected isolates will be further evaluated using quantitative tests before their application in the synthesis of biodiesel from palm oil.

References

- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. p. 189–207.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; SANTOS, T. M. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.
- DHEEMAN, D. S.; BABU, S. A.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 72, n. 3-4, p. 256-262, 2011.
- FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, artigo e14828, 2011.

Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* do fungo celulolítico *Trichoderma harzianum* CFAM422 e obtenção de uma biblioteca de transformantes

Alyssa M. F. Shimizu^{1,2*}; Paula M. D. Jaramillo²; Gláucia E. O. Midorikawa²; Ayla. S. Silva³; Elba P. S. Bon⁴; Léia C. L. Fávoro²

Introdução

Fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por sua capacidade de produzir enzimas para aplicação no processo de conversão enzimática de biomassa vegetal. No entanto, esses microrganismos podem ter limitações na produção de uma ou outra enzima, limitando a eficiência do processo de hidrólise, que é possível devido à atuação sinérgica das celulasas e hemicelulasas (KUMAR et al., 2008). Torna-se assim necessário utilizar técnicas de melhoramento genético que aumentem a produção das enzimas utilizadas no processo. Souza et al. (2011) selecionaram a linhagem *Trichoderma* sp. CFAM-422, dentre várias linhagens isoladas na Amazônia, como melhor produtora de FPase, β -glicosidase e xilanase em comparação com linhagens industriais. Na Embrapa Agroenergia a linhagem CFAM422 (identificada como *T. harzianum* por métodos moleculares) foi submetida a um programa de melhoramento convencional, visando alcançar maiores níveis de produção de enzimas celulolíticas. Como parte do programa de melhoramento genético, a adaptação de protocolos de transformação genética visando à manipulação de genes de interesse é essencial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de transformação mediada por *A. tumefaciens* para *T. harzianum* CFAM-422 e obter uma biblioteca de transformantes visando à identificação de genes envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Métodos

O protocolo utilizado para transformação por *A. tumefaciens* foi realizado conforme Fávoro (2009), com modificações. Células de *A. tumefaciens* EHA105 carregando o vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003) foram crescidas em YEP contendo espectinomicina e

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília/DF, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil

3 Instituto Nacional de Tecnologia (INT), Rio de Janeiro/RJ, Brasil

4 Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil

*alyssa.maria@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

rifampicina (100 µg/mL). Esta cultura foi diluída para uma densidade ótica de 0,15_(660 nm) em meio de indução líquido suplementado com acetoseringona (200 mM) e incubada até atingir densidade ótica de 0,6_(600 nm). Esta suspensão de células foi misturada (1:1) com uma suspensão de conídios (10⁶ conídios/mL). Alíquotas de 200 µL desta mistura foram espalhadas sobre discos de membrana de nylon (0,45 µm) em meio de indução sólido suplementado com 200 mM de acetoseringona. Placas de co-cultivo sem acetoseringona foram utilizadas como controle. Após co-cultivo a 25°C por 48h, as membranas foram transferidas para PDA contendo higromicina B (100 µg/mL), cefoxitina sódica (200 µg/mL) e Triton X-100 (0,1%). As placas foram incubadas por 7-20 dias a 28°C, até o surgimento de colônias resistentes à higromicina B. Os transformantes obtidos foram purificados por meio de três repiques sucessivos em meio seletivo e os que permaneceram resistentes à higromicina B foram novamente purificados para obtenção de culturas monospóricas, e então foram preservados em duplicata em água destilada (método Castellani). A estabilidade genética de 20 transformantes monospóricos escolhidos aleatoriamente foi avaliada por meio de 10 repiques sucessivos em PDA sem o agente seletivo. A confirmação da transformação foi realizada por PCR, por meio da amplificação do gene que confere resistência a higromicina B. A amplificação das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA foi realizada pela técnica TAIL-PCR.

Resultados e Conclusões

Os resultados mostraram que transformantes resistentes à higromicina B e expressando a proteína verde fluorescente GFP podem ser facilmente obtidos utilizando conídios não germinados como material inicial. Os transformantes foram obtidos quando acetoseringona estava presente durante o co-cultivo. Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado. Um total de 618 transformantes foi obtido, sendo que o número de transformantes por placa variou de 1 a 20, em um total de 164 placas de meio seletivo que foram utilizadas no experimento. A presença de Triton X-100 no meio seletivo facilitou a obtenção de colônias de tamanho reduzido de modo a evitar a sobreposição entre transformantes crescendo em uma mesma placa.

Os testes de estabilidade genética com 20 transformantes revelaram que 45% mantiveram a capacidade de crescer na presença de higromicina B após 10 repicagens sucessivas em meio PDA sem adição deste agente seletivo. A transformação foi confirmada por PCR para 15 transformantes, a partir da amplificação de um fragmento de 600 pb, correspondente ao gene de resistência à higromicina B. Foi possível obter produtos de amplificação das regiões que flanqueiam o T-DNA dos transformantes de número 129, 236 e 250. Neste trabalho foi possível adaptar um protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium* para *T. harzianum* CFAM422 e obter, pela primeira vez, uma biblioteca

de transformantes que poderá ser caracterizada para descoberta de genes de interesse envolvidos na produção de enzimas lignocelulolíticas.

Apoio Financeiro

CNPq e Embrapa

Referências

FAVARO, L. C. de L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, New York, v. 107, p. 803-810, parte 7, 2003.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C. C.; BOM, E. P. S.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.

Mutagênese de *Aspergillus niger* 3T5B8 com UV e EMS e caracterização de linhagens quanto ao aumento da produção de celulases e hemicelulases

Jhébica C. Araújo^{1,2*} Thais D. Mendes²; Edna M. M. Oliveira³;
Mônica C. T. Damaso²; Léia C. L. Fávoro²

Introdução

Um dos principais desafios para a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e químicos renováveis é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática dos polissacarídeos. A Embrapa realiza pesquisas em melhoramento genético de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico por meio de melhoramento convencional e transformação genética (FÁVARO; POLETTO, 2013). A linhagem de *A. niger* 3T5B8 foi previamente selecionada em um programa de melhoramento visando aumento da produção de pectinases (COURI; FARIAS, 1995). Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo dar continuidade ao programa de melhoramento desta linhagem por mutagênese, visando o aumento da produção de celulases e hemicelulases.

Métodos

Dois ciclos de mutagênese foram realizados, sendo o primeiro com ultravioleta (UV) e o segundo com etilmetanossulfonato (EMS). Para a mutagênese com UV, inicialmente foi determinado o tempo de exposição necessário para obtenção de 1-10% de sobrevivência. Para tanto, em sala escura uma suspensão contendo 10^6 conídios/mL foi tratada com UV durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 minutos. Diluições de cada tratamento foram inoculadas em Meio Completo e as placas foram envoltas em papel alumínio e incubadas por 3 dias a 28°C na ausência de luz, de modo a evitar a reversão de mutações pela enzima fotoliase. Conídios não irradiados foram usados como controle para o cálculo de sobrevivência. Uma vez determinado o tempo de exposição à UV, conídios foram tratados com este agente e inoculados em diferentes meios de cultura (Meio Completo e Meio Mínimo contendo Avicel, carboximetilcelulose-CMC, pectina e xilana). As colônias obtidas foram avaliadas quanto ao halo de degradação (CMC, xilana e pectina) e crescimento em Avicel, de modo

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília/DF, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil

3 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba/RJ, Brasil

*jhessica.araujo@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

a selecionar colônias com produção enzimática superior ao parental. Linhagens que apresentaram halo de degradação visualmente superior foram purificadas para obtenção de cultura monospórica e reavaliadas quanto ao índice enzimático (IE) em ensaios com 10 repetições. As melhores linhagens selecionadas foram avaliadas quanto a produção de FPase, β -glicosidase e poligalacturonase em ensaios miniaturizados em microplacas de 96 poços. Mutantes melhorados foram submetidos a um segundo ciclo de mutagênese com EMS. Conídios foram tratados com solução de EMS 10% em diferentes tempos, de modo a obter 1-10% de sobrevivência. Uma vez determinada a dose adequada deste mutágeno, conídios foram tratados e inoculados nos mesmos meios de cultura. As colônias sobreviventes foram avaliadas quanto ao IE em meios seletivos semelhante à metodologia citada no primeiro ciclo, em testes em triplicata. As linhagens superiores foram purificadas para obtenção de cultura monospórica e reavaliadas quanto ao índice enzimático em experimentos com 10 repetições. Os mutantes melhorados do primeiro e segundo ciclos de mutagênese foram avaliados quanto à identidade genética por meio de marcadores RAPD (FÁVARO et al., 2011).

Resultados e Conclusões

O tempo de exposição de 7,5 minutos à radiação UV foi adequado para a obtenção de sobrevivência de 1-10%. No primeiro ciclo de mutagênese foram obtidas 1800 linhagens. Trinta linhagens que apresentaram IE superior ao parental foram selecionadas e avaliadas quantitativamente para a produção de enzimas. Foi possível obter 3 linhagens com produção superior de poligalacturonase e β -glicosidase em ensaios miniaturizados. Estas 3 linhagens foram reavaliadas para confirmação da superioridade, porém observou-se que somente a linhagem C88 apresentou um leve aumento da produção de poligalacturonase (7,35 U/mL ($\pm 0,8$)) enquanto que no parental foi observada uma produção de 4,76 U/mL ($\pm 1,7$). Para a produção das demais enzimas não foram observados resultados significativos para essa seleção. Dessa forma, o mutante C88 foi submetido a um novo ciclo de mutagênese com EMS. Foi observada uma taxa de 6,6% de sobrevivência que resultou na seleção de 200 linhagens que foram avaliadas quanto ao IE e crescimento em diferentes substratos. A partir desta triagem, 27 linhagens foram pré-selecionadas por apresentarem IE superior aos parentais 3T5B3 e C88, e foram submetidas à uma nova triagem, utilizando o mesmo método de comparação com dez repetições. Desta forma 8 linhagens foram selecionadas. Em CMC os parentais 3T5B8 e C88 apresentaram IE de 2,426 ($\pm 0,622$) e 2,735 ($\pm 0,632$) respectivamente, enquanto as linhagens P106 (3,347 $\pm 0,293$), P110 (3,443 $\pm 0,218$), P80 (4,107 $\pm 1,089$), P83 (3,583 $\pm 0,276$), P157 (3,228 $\pm 0,161$), P123 (4,799 $\pm 0,599$), P49 (3,473 $\pm 0,285$) foram selecionadas por apresentarem IE superior. Em xilana os parentais 3T5B8 e C88 apresentaram IE de 1,821 $\pm 0,244$ e 1,813 $\pm 0,257$ e as linhagens selecionadas P106 (2,561 $\pm 0,326$), P110 (2,633 $\pm 0,517$), P83 (2,623 $\pm 0,124$), P80 (2,418 $\pm 0,331$), P123

(2,617±0,399) e P49 (2,859±0,481) foram superiores. Em Avicel, apenas a linhagem P157 (4,650 cm ±0,226) apresentou crescimento superior comparado aos parentais 3T5B8 (3,844 cm ±0,247) e C88 (4,281 cm ±0,313). A identidade genética dos 8 mutantes melhorados em comparação aos parentais 3T5B8 e C88 foi avaliada por RAPD. De um total de 100 oligonucleotídeos de RAPD, 23 produziram perfil de amplificação adequado e confirmaram a identidade genética das linhagens. A estratégia utilizada para obtenção de mutantes tem sido satisfatória e obteve-se até o momento uma biblioteca de 2000 linhagens que poderão ser avaliadas futuramente. Os 8 mutantes selecionados estão sendo avaliados quanto à produção de enzimas em cultivo submerso e espera-se obter linhagens com produção enzimática superior para aplicação na desconstrução de biomassa lignocelulósica e para continuidade do programa de melhoramento.

Apoio Financeiro

Embrapa e CNPq

Referências

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, e14828, p. 1-18, 2011.

FÁVARO, L. C. L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.

Prospecção de bactérias endofíticas de plantas nativas e cultivadas e seu potencial para a desconstrução de biomassa lignocelulósica

Letícia B. M. Lima^{1,2*}, Micaele F. Caratti^{1,2}, Ana Carolina M. G. Silva^{1,2}, Thais F. C. Salum², Wellington L. Araújo³, Maria C. Quecine⁴, Betania F. Quirino⁴ e Léia C. L. Fávoro²

Introdução

A produção de energia renovável derivada de biomassa constitui uma alternativa para reduzir o uso intensivo de combustíveis fósseis e para diversificar e garantir o suprimento de energia no futuro (FÁVARO; POLETTTO, 2013). O interesse na utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis e químicos renováveis tem despertado a atenção da comunidade científica para os desafios que precisam ser vencidos. A bioconversão de componentes celulósicos em açúcares fermentáveis, no entanto, continua a ser um desafio devido ao alto custo de enzimas para o processo de hidrólise enzimática (MARGEOT et al., 2009). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar bactérias da “Coleção de Microrganismos Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias” da Embrapa Agroenergia, provenientes de diferentes biomas brasileiros, bem como selecionar e identificar taxonomicamente potenciais linhagens produtoras de enzimas lignocelulolíticas.

Métodos

Bactérias endofíticas (6.816 linhagens) das espécies vegetais *Saccharum officinarum*, *Eucalyptus* sp., *Glicine max*, *Paullinia cupana*, *Utricularia* sp., *Tecoma stans*, *Blechnum brasiliense*, *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa* foram transferidas da Universidade de São Paulo para a Embrapa Agroenergia. Estas bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de degradação dos substratos carboximetilcelulose (CMC), xilana, pectina, amido, ABTS {ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico} e RBBR {Remazol Brilliant Blue R}. A degradação destes substratos indica a produção de celulase, xilanase, pectinase, amilase, lacase e ligninase, respectivamente. As bactérias foram submetidas a duas etapas de triagem. A primeira triagem (qualitativa) foi realizada em duplicata para as 6.816 linhagens e a análise foi realizada considerando a presença ou

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

3 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

4 Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil

*leticia.lima@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

ausência de halo de degradação nos diferentes substratos. Para esta triagem, as bactérias foram cultivadas em Tryptic Soy Broth em microplacas de 96 poços e em seguida foram inoculadas em placas de Petri de 150 x 15 mm contendo os meios de cultura seletivos, com auxílio de repicador de 96 fios. A incubação foi realizada a 28°C por até 20 dias. As linhagens que degradaram CMC e xilana na primeira etapa foram submetidas a uma segunda triagem (semi-quantitativa), que foi realizada em experimentos com quatro repetições, de modo a se obter o índice enzimático (IE = diâmetro do halo/diâmetro da colônia) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1977). As bactérias selecionadas foram identificadas por meio da análise da região 16S do DNA ribossômico (LANE, 1999), contra a base de dados do GenBank (não curada) e contra a base de dados Ribosomal Database Project (curada).

Resultados e Conclusões

Os resultados da primeira triagem mostraram que 22,1%, 3,4%, 0,5% e 0,8% das linhagens degradaram CMC, xilana, pectina e amido, respectivamente. Não houve degradação de ABTS e RBBR nas condições utilizadas, mesmo após 20 dias de cultivo. Na segunda etapa de triagem foram avaliadas 940 bactérias degradadoras de CMC e 144 bactérias degradadoras de xilana. Os resultados mostraram que 35,9% das bactérias degradaram CMC e 26,3% degradaram xilana. Vinte e uma linhagens que apresentaram os maiores valores de índice enzimático em CMC (índice enzimático variando de 6,0 a 16,4) foram identificadas como pertencentes ao Filo Firmicutes e ao gênero *Bacillus* (12 linhagens de *B. amyloliquefaciens*; 4 linhagens de *B. pumilus*; 2 linhagens de *B. methylotrophicus*, 1 linhagem de *B. safensis*; 1 linhagem de *B. aerius*; 1 linhagem de *B. anthracis*). As espécies *B. aerius* e *B. methylotrophicus* foram, pela primeira vez, descritas como produtoras de celulases.

Este trabalho demonstrou que bactérias associadas a plantas são uma fonte prolífica de novas linhagens com potencial biotecnológico. A identificação taxonômica das bactérias selecionadas está em andamento e poderá revelar outras espécies com potencial de produção de enzimas para utilização como suplemento de coquetéis enzimáticos para hidrólise de biomassa, dentro do conceito de biorrefinarias. Além disso, este trabalho contribui para a agregação de valor ao germoplasma microbiano mantido na Embrapa Agroenergia.

Apoio Financeiro

Embrapa e CNPq

Referências

FAVARO, L. C. de L.; POLETTTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulose activity of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 1, p. 109-115, 1977.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley & Sons, 1999. p. 115-175.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

Bacteria and fungi associated with fruits of *Elaeis guineensis* Jacq. and their potential to produce lipase

Jheniffer R. Cunha^{1,3*}, Lucas S. Leite^{1,3}, Carolina M. Polletto³, Paula F. Franco³, José A. Santos², Thais F. C. Salum³, and Léia C. L. Fávoro³

Background

Lipase-based enzymatic routes toward biodiesel production hold advantages over chemical methods using alkaline and/or acid catalysts. However, biodiesel derived from chemical transformations still dominates the current market, mainly due to its lower cost compared to the biocatalytic processes (VIEIRA et al., 2006; SHARMA et al., 2001). Therefore, strain/genes discovery is central to warranty the economic viability of enzymatic biodiesel production. The aim of this study was to identify novel lipolytic strains among a large collection of microorganisms sampled from *Elaeis guineensis* Jacq. fruits.

Methods

Fruits were collected from four varieties of palm oil grown in a experimental field (Embrapa Cerrados), with three repetitions of each variety, with a total of 12 samples. Samples were immediately transported to Embrapa Agroenergia for isolation of filamentous fungi, yeasts, and bacteria. Five similar fruits per sample were transferred to 50 mL of PBS buffer (pH 7.4) and incubated at 28°C for two hours under agitation (200 rpm). After incubation, serial dilutions were prepared, and aliquots of these dilutions were plated in several culture media (Tryptic Soy Agar, Actinomycete Isolation Agar, YPD Agar; Potato Dextrose Agar and Oat Meal Agar) and incubated for 2-10 days at 28°C. After this period, the microorganisms were counted, purified and preserved. The lipolytic activity was evaluated in solid media containing triolein, olive oil and Tween 20 as a carbon source (HANKIN et al., 1975). The enzymatic index was estimated in triplicate. Selected bacteria and fungi were identified using the 16S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 sequences, respectively.

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, 70910-900

2 Embrapa Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, Brasil, 73310-970

3 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil, 70770-901

*jheniffer.cunha@colaborador@embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

Results and Conclusions

From 664 bacterial isolates, 9.1% showed lipolytic activity in at least one of the substrates evaluated. Twenty-two presented high enzymatic index and were identified as *Burkholderia* sp., *Erwinia* sp., *Falsibacillus* sp., *Gibbsiella* sp., *Kluivera* sp., *Leclercia* sp., and *Stenotrophomonas* sp. Among the 427 filamentous fungi isolated, 45% and 96% degraded olive oil and triolein, respectively. Four selected isolates were identified as *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Diaporthe* sp., and *Penicillium* sp. Among the 384 isolated yeasts, 53%, 23%, and 9% degraded Tween 20, triolein, and olive oil, respectively. Overall, it was possible to identify distinct strains/species of bacteria and fungi able to produce lipases. The lipase production of selected isolates will be further evaluated using quantitative tests before their application in the synthesis of biodiesel from palm oil.

Financial Support

This work was supported with project grants by Embrapa and CNPq.

References

- HANKIN, L.; POINCELOT, P. R.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Microorganisms from composting leaves: Ability to produce extracellular degradative enzymes. **Microbial Ecology**, New York, v. 2, n. 4, p. 296-308, 1975.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- VIEIRA, A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, Bahia Blanca, v. 36, n. 4, p. 283-288, 2006.

Obtenção de mutantes de *Trichoderma harzianum* CFAM-422 visando à seleção de linhagens produtoras de enzimas para desconstrução de biomassa

Jéssyca S. Alencar^{1,3*}; Mariana S. Tamietti^{2,3}; Jhéssica C. Araújo^{2,3}; Léia C. L. Fávoro³

Introdução

A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis e químicos renováveis. No entanto, um dos principais desafios para seu aproveitamento é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática. Isto pode ser obtido, por exemplo, por meio da obtenção de microrganismos capazes de produzir enzimas em concentrações elevadas e de serem cultivados em substratos de baixo custo. Diferentes estratégias de melhoramento genético têm sido utilizadas visando aumento da produção de enzimas para conversão de biomassa (FÁVARO; POLETTO, 2013). Neste contexto, este trabalho iniciou um programa de melhoramento por mutação/seleção recorrente de *T. harzianum* CFAM-422, visando à seleção de linhagens melhoradas quanto à produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Métodos

A linhagem de *T. harzianum* CFAM-422 foi isolada do bioma Amazônico e previamente selecionada como produtora de celulasas e hemicelulasas em níveis semelhantes à linhagens industriais (SOUZA et al., 2011). Esta linhagem foi submetida a um primeiro ciclo de mutagênese com ultravioleta. Para tanto, 10^6 conídios/mL foram tratados para obtenção de sobrevivência entre 1 e 5% e as células foram inoculadas em meio completo e em meio mínimo contendo carboximetilcelulose (CMC), Avicel, xilana e pectina. A biblioteca de prováveis mutantes foi parcialmente caracterizada em testes em triplicata, utilizando a avaliação semi-quantitativa do índice enzimático nos substratos CMC, pectina e xilana (4 dias de incubação a 25°C), bem como a avaliação de crescimento em Avicel (2 dias de incubação a 25°C). Linhagens promissoras foram selecionadas, purificadas e então reavaliadas do mesmo modo, porém em experimentos com 10 repetições. Linhagens selecionadas foram submetidas a um segundo ciclo de mutagênese com etilmetanossulfonato (10^6 conídios/mL

1 Centro Universitário de Brasília (UnICEUB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70790-075

2 Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70910-900

3 Embrapa Agroenergia, Brasília, Distrito Federal, Brasil, CEP 70770-901

*jessyca.alencar@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

tratados com EMS 10%, de modo a obter entre 1 e 5% de sobrevivência). A nova biblioteca de mutantes foi avaliada em duas etapas, conforme descrito anteriormente. Alguns mutantes selecionados foram caracterizados quanto à identidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD, conforme protocolo descrito por Fávoro et al. (2011).

Resultados e Conclusões

No primeiro ciclo de mutagênese com ultravioleta foi obtida uma biblioteca de 1047 linhagens. Destas, 454 foram avaliadas quanto ao índice enzimático em CMC, xilana e pectina e quanto ao crescimento em Avicel (em triplicata) e 2 linhagens (TA127 e TA99) foram selecionadas. No segundo ciclo de mutagênese com etilmetanossulfonato foram obtidas 205 linhagens provenientes do parental TA127 e 305 linhagens provenientes do parental TA99. Após nova triagem (nos substratos CMC e Avicel, em triplicata) foi possível selecionar 32 linhagens descendentes do parental TA127 e 20 linhagens descendentes do parental TA99. As 32 linhagens descendentes do parental TA127 foram purificadas até a obtenção de culturas monospóricas e reavaliadas. Apenas 8 linhagens foram superiores nos testes realizados com 10 repetições. O parental TA127 apresentou crescimento em Avicel de 4,760 cm ($\pm 0,122$), enquanto que para os mutantes 7A43, 7A47, 7A49, 7D23 o diâmetro médio das colônias neste substrato foi de 6,694 cm ($\pm 0,194$); 7,156 cm ($\pm 0,297$); 7,238 cm ($\pm 0,116$) e 7,238 cm ($\pm 0,116$), respectivamente. No substrato CMC, o índice enzimático do parental TA127 foi 1,414 ($\pm 0,073$) e para os mutantes 7A33, 7A38, 7A54 e 7C30 os índices enzimáticos neste substrato foram 1,529 ($\pm 0,051$); 1,706 ($\pm 0,152$); 1,518 ($\pm 0,053$) e 1,530 ($\pm 0,085$), respectivamente. As 20 linhagens provenientes do parental TA99 também foram purificadas e reavaliadas em experimentos com 10 repetições, porém somente no substrato Avicel. O parental TA99 apresentou crescimento de 4,125 cm ($\pm 0,050$) neste substrato e apenas 4 das 20 linhagens apresentaram maior crescimento: 9A6, 9E20, 9E57 e 9C53 {4,713 cm ($\pm 0,133$); 4,263 cm ($\pm 0,116$); 4,481 cm ($\pm 0,080$); 4,400 cm ($\pm 0,108$), respectivamente}.

Alguns mutantes selecionados descendentes da linhagem TA127 foram avaliados quanto à identidade genética em comparação com os parentais CFAM-422 e TA127, por meio de marcadores RAPD. De 23 oligonucleotídeos avaliados, 17 produziram perfil de amplificação adequado para análise e confirmaram a identidade genética das linhagens (OP-A03, OP-A13, OP-A18, OP-A07, OP-A09, OP-A10, OP-C02, OP-C06, OP-C07, OP-C08, OP-C11, OP-P03, OP-P06, OP-P07, OP-P15, OP-P19 e OP-X01). A estratégia utilizada para obtenção de mutantes tem sido satisfatória e obteve-se até o momento uma biblioteca de 1558 linhagens. Os mutantes selecionados estão sendo avaliados quanto à produção de enzimas em cultivo submerso e espera-se obter linhagens com produção enzimática superior para aplicação na desconstrução de biomassa lignocelulósica.

Apoio Financeiro

Este trabalho é financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia.

Referências

FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 8, número do artigo e14828, 2011.

FAVARO, L. C. de L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microorganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.

SOUZA, M. F.; GONÇALVES, H. R. A.; FERNANDES, O. C. C.; BOM, E. P. S.; SILVA, A. S. Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos filamentosos isolados da Amazônia: seleção de uma linhagem promissora. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM, 18., 2011, Caxias do Sul. [Anais...]. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2011.

Seleção e caracterização fisiológica de novas linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* que sejam capazes de converter xilose, arabinose e glicerol em químicos de interesse

Clara V. G. C. Carneiro^{1*}, Monica C. T. Damaso¹, João R. M. Almeida¹

Introdução

A crescente demanda no consumo energético, bem como as preocupações ambientais acarretadas pelo uso de combustíveis fósseis, vem encorajando uma procura por fontes alternativas de combustíveis e produtos químicos de interesse. A produção de tais componentes a partir de resíduos agroindustriais, como xilose e arabinose, provenientes da hemicelulose, e o glicerol cru, derivado da transesterificação de gorduras e óleos vegetais na produção de biodiesel (ALMEIDA et al., 2012), podem ser alternativas viáveis a essa procura. Embora monômeros de hexose sejam fermentados eficientemente por leveduras, a conversão de pentoses e glicerol a etanol e outros químicos ainda é um obstáculo (ALMEIDA et al., 2011; KUMAR et al., 2008). A vista disso, o presente trabalho tem como objetivo selecionar leveduras selvagens naturalmente capazes de converter xilose, arabinose e glicerol em combustíveis, como o etanol, e outros produtos químicos de interesse.

Métodos

As leveduras foram avaliadas por sua capacidade de crescer em meio mínimo YNB suplementado com xilose (40g/L), arabinose (20g/L) e glicerol (60g/L), como fonte de carbono, em microplacas de 96 poços. A partir desses resultados, as 40 leveduras que obtiveram melhor crescimento, medido através da absorbância, foram selecionadas e passaram por um processo fermentativo microaeróbico de 48h utilizando-se os mesmos meios descritos acima. Cromatografia líquida de alta eficiência—HPLC foi utilizada para quantificar o consumo de substrato e formação de produtos. As 6 leveduras que mais consumiram a fonte de carbono e produziram químicos de interesse foram selecionadas para realização de fermentação aeróbica em frascos.

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; clara.vida@colaborador.embrapa.br; joao.almeida@embrapa.br; monica.damaso@embrapa.br;

Resultados e Conclusões

A metodologia empregada permitiu a seleção de linhagens que crescem eficientemente em xilose, arabinose e glicerol. Porém, as linhagens apresentaram diferentes taxas de consumo dos substratos avaliados. As leveduras selecionadas em glicerol consumiram mais de 80% da fonte de carbono inicial, enquanto os microrganismos selecionados em arabinose consumiram menos de 10% do açúcar. As leveduras que cresceram em xilose consumiram pouco mais de 20% da fonte de carbono disponibilizada. Tais leveduras foram capazes de produzir altas concentrações de biomassa, além de xilitol e etanol em baixas concentrações. Quando a cinética de fermentação das linhagens selecionadas em xilose foi avaliada em condições aeróbicas, as leveduras tiveram a capacidade de consumir mais de 50% de xilose e produzir até 9 g/L de xilitol e 2 g/L de etanol em 78 h.

Estes resultados indicam que as linhagens selecionadas são capazes de produzir etanol em baixas concentrações em aerobiose. Modificações dos parâmetros fermentativos serão avaliados com o intuito de aumentar o consumo de xilose e produção de etanol. A fermentação com as linhagens selecionadas em arabinose e glicerol apresentaram resultados similares.

Apoio Financeiro

CNPq

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; RUNQUIST, D.; NOGUE, V. S. I.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 6, n. 3, p. 286-299, 2011.

ALMEIDA, J. R. M.; FAVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, artigo 48, 2012.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

Construção de levedura *Saccharomyces cerevisiae* capaz de fermentar xilose para produção de etanol

Samara B.Carvalho¹, Paula F. Franco¹, João R.M. Almeida¹

Introdução

Devido à demanda brasileira e mundial por novas fontes de combustíveis renováveis vários estudos são feitos para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (STAMBUK et al, 2008). O desenvolvimento de linhagens microbianas para a produção de etanol lignocelulósico torna-se necessário para melhor aproveitamento dos resíduos agroindustriais e de lixo urbano. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não é naturalmente capaz de fermentar a pentose xilose, portanto a fermentação dos açúcares presentes em hidrolisados de biomassa por essa levedura restringe-se às hexoses (ALMEIDA et al., 2011; GEDDES et al., 2011). Como a xilose representa grande parte dos açúcares presentes em hidrolisados de biomassa, linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de convertê-la a etanol vem sendo construídas pela superexpressão da via catabólica de xilose nessa levedura.

O objetivo desse trabalho é a construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose a etanol. Para tanto, os genes codificantes para xilose reductase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *Scheffersomyces stipitis*, e xilulokinase (XK) de *S. cerevisiae* serão expressos em linhagem laboratorial dessa levedura.

Métodos

A levedura *S. cerevisiae* capaz de fermentar xilose foi construída utilizando a via de assimilação de xilose composta de xilose reductase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stipitis*. A enzima xilulokinase (XK) endógena de *S. cerevisiae* também foi superexpressa. Inicialmente, os cassetes de expressão para XR e XK foram obtidos pela digestão com *Xho*I e *Sac*I dos vetores pRH185 e pRH195, respectivamente (HECTOR et al., 2011). Para construção do cassete de expressão para XDH, o gene *Xil2* foi amplificado a partir do DNA genômico de *S. stipitis* com oligonucleotídeos específicos. Posteriormente, o gene foi clonado no vetor p426-TEF sob regulação do promotor TEF e terminador *CYC1*, gerando o plasmídeo p426-XDH. Finalmente, este plasmídeo foi linearizado com a enzima *Sac*I e os

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901
joao.almeida@embrapa.br

cassetes de expressão para XR e XDH previamente obtidos foram ligados a este. O vetor resultante, p426-XR-XDH-XK foi utilizado para transformação de *S. cerevisiae* CEN.PK.

Resultados e Conclusões

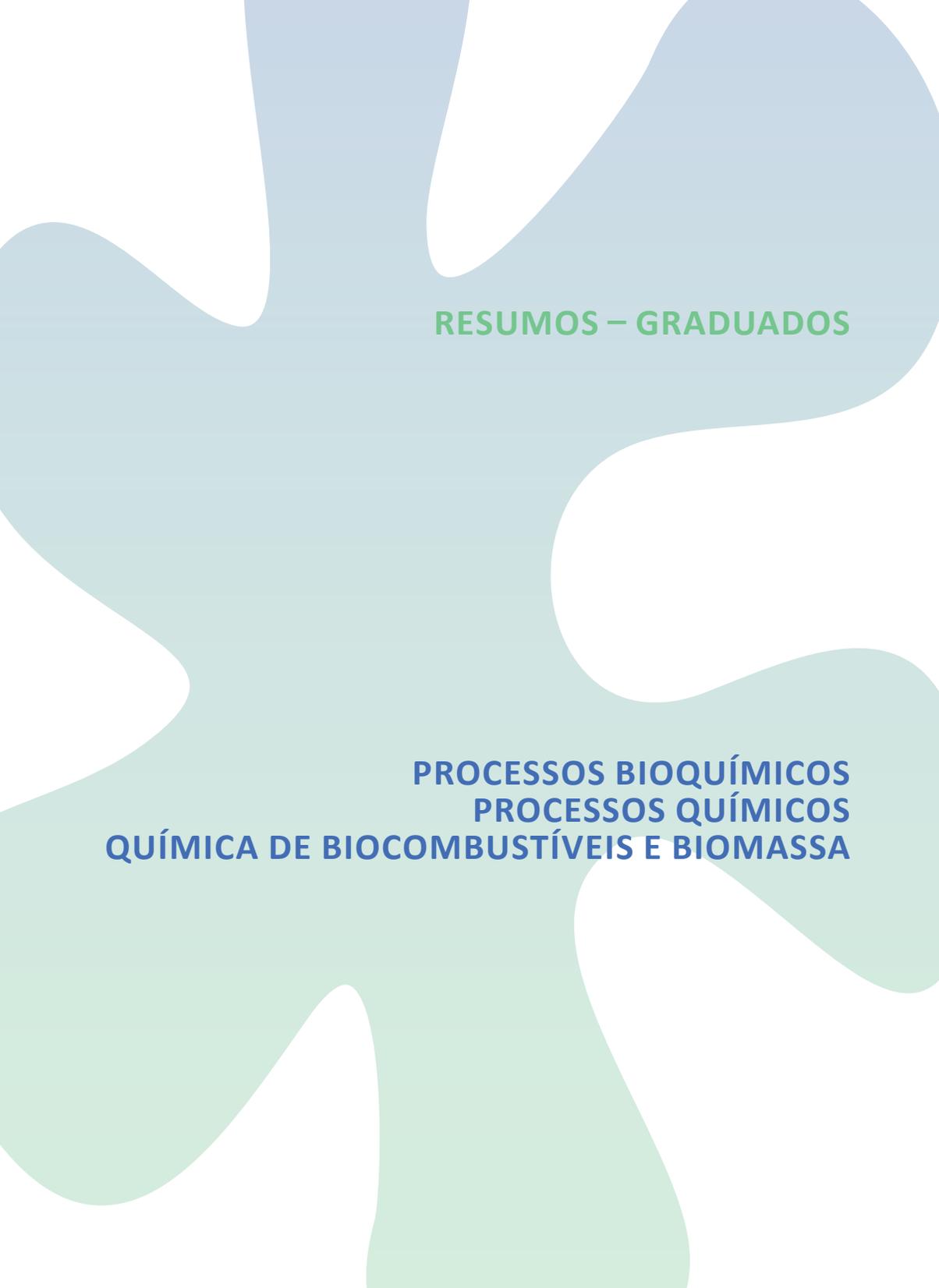
O plasmídeo episomal p426-XR-XDH-XK contendo cassetes de expressão para XR, XDH e XK foi construído com sucesso. Linhagem recombinante de *S. cerevisiae* foi obtida após transformação com esse plasmídeo. A linhagem foi capaz de crescer em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono, demonstrando a correta expressão dos genes. Avaliações das taxas de crescimento e perfil fermentativo da linhagem confirmaram a capacidade de utilização de xilose pela linhagem, porém a taxas foram uma ordem de magnitude abaixo das observadas para glicose. Utilização de estratégias de evolução adaptativa serão aplicadas na linhagem para melhorar seu consumo de xilose.

Apoio Financeiro

Embrapa agroenergia.

Referências

- ALMEIDA, J. R. M.; RUNQUIST, D.; NOGUE, V. S. I.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to thanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 6, n. 3, p. 286-299, 2011.
- GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 22, n. 3, p. 312-319, 2011.
- HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; QURESHI, N. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 38, n. 9, p. 1193-1202, 2011.
- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 11, p. 918-926, 2008.



RESUMOS – GRADUADOS

**PROCESSOS BIOQUÍMICOS
PROCESSOS QUÍMICOS
QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA**

Produção de biomassa de microalgas em vinhaça e CO₂ e caracterização do efluente pós-cultivo

Hugo Santana^{1}, Carolina R. Cereijo¹, Patrícia P. M. Brunale¹, Félix G. Siqueira¹, Bruno A. F. S. Brasil¹*

Introdução

A vinhaça é uma água residual produzida durante a destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado para a produção de etanol, em uma proporção de 10-15 litros para cada litro de etanol produzido. Este efluente apresenta como principais características o baixo pH e a alta demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente), sendo, por isso, considerada como um poluente, não podendo ser descartada diretamente em ambientes aquáticos (CORTEZ et al., 2014). No entanto, os macro e micronutrientes presentes na vinhaça podem ser utilizados para o cultivo de diversos microrganismos, como microalgas, por exemplo.

As microalgas compõem um grupo não-monofilético de microrganismos fotossintetizantes que são reconhecidos como uma fonte alternativa para a produção de biocombustíveis (SCHMITZ et al., 2012). Considerando esta característica, as microalgas poderiam ser utilizadas em uma estratégia de biorrefinaria para a produção de biocombustíveis utilizando a vinhaça como meio de cultivo (RAZZAK et al., 2013). Neste trabalho, foi analisado o potencial de crescimento de duas cepas de microalgas verdes (Chlorophyta), oriundas da coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia, em vinhaça e o seu impacto sobre a composição da mesma, analisando assim, o potencial de biorremediação desses microrganismos.

Métodos

Para determinar a melhor condição para o cultivo das microalgas, o meio a base de foi utilizado avaliado em duas formulações distintas: 1) clarificação química seguida de centrifugação; 2) Centrifugação seguida diluição em água destilada. Para o primeiro processo, cal hidratada foi adicionada à vinhaça na concentração 3 g/L e posteriormente decantada por 40 minutos a temperatura ambiente. Após este período, o material foi centrifugado a 800 g e o pellet descartado. O pH do resíduo foi ajustado para 8 e o material foi esterilizado por autoclavagem por 15 minutos a 1 atm. Para o segundo processo, a vinhaça foi centrifugada a 800g e o pellet descartado. O pH do resíduo foi ajustado para 8 e o material foi esterilizado por autoclavagem por 15 minutos a 1 atm.

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901

*hugo.santana@colaborador.embrapa.br; bruno.brasil@embrapa.br

Para a análise do potencial de biorremediação da vinhaça utilizando microalgas, inóculos das cepas LBA32 (espécie não descrita de *Micractinium sp.*) e LBA40 (*Chlamydomonas biconvexa*.) foram primeiramente produzidos de forma axênica, em erlenmeyers contendo 500 mL de meio BBM (Bold's Basal Medium, pH 7.1), com injeção de ar atmosférico (5 L/h) durante 7 dias, com fotoperíodo de 12 horas de luz (8000 lux) e 12 horas de escuro a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, as duas cepas foram inoculadas separadamente em fotobiorreatores de geometria *flat-plate* com agitação *air lift* contendo 14L de meio de cultivo nas seguintes formulações: 1) Vinhaça clarificada e centrifugada (100%); 2) Vinhaça apenas centrifugada diluída em água destilada (50%); 3) Meio sintético padrão BBM. O cultivo foi realizado durante 3 dias com fotoperíodo de 12 horas de luz (35000 lux) e 12 horas de escuro, com injeção de ar atmosférico (48 L/h) e CO_2 (4,8 L/h), com temperatura mínima de 26°C . Para a medição da produtividade de biomassa, foram coletados, em triplicata, 10 mL do cultivo nos dias 0 (ponto inicial) e dia 3 (ponto final). As amostras coletadas foram lavadas 3 vezes por centrifugação (10600g, 10 minutos). O pellet gerado foi ressuspenso em água destilada e seco utilizando estufa a 105°C . Posteriormente, as amostras secas foram pesadas e a produtividade de biomassa mensurada.

Para a análise do potencial de biorremediação das microalgas sobre a vinhaça, o material cultivado foi centrifugado e o sobrenadante foi analisado para os seguintes parâmetros: DBO, DQO, fosfato, nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, potássio total, carbono orgânico total, turbidez e pH. Como referência do tratamento, a vinhaça pura, a vinhaça clarificada (100%) e a vinhaça centrifugada e diluída (50%) também foram analisadas para os mesmos parâmetros.

Resultados e Conclusões

Para que o cultivo das microalgas seja realizado, a presença de nitrogênio, fósforo e dióxido de carbono são fundamentais no meio, além da incidência de luz. Sendo assim, devido à alta turbidez da vinhaça *in natura* (1670 NTU), processos de clarificação são necessários para aumentar a penetração de luz na mesma. As análises mostraram que houve uma redução de cerca de 97% na turbidez da vinhaça (cerca de 35 NTU), após ambos os tratamentos. Apesar da clarificação ter favorecido a penetração de luz, componentes importantes para as microalgas (nitrato, amônia e fosfato) foram reduzidos. Ao final do cultivo, no entanto, foi observado um aumento na maior parte dos parâmetros analisados, incluindo DBO e DQO, o que indica que as microalgas utilizadas não levam a biorremediação deste resíduo.

Apesar dos resultados da composição dos meios utilizados terem demonstrado que as microalgas utilizadas não apresentaram impacto significativo na biorremediação desse efluente, foi observado que a produtividade de biomassa das cepas cultivadas ao final do experimento foi superior a produtividade observada em cultivo em meio BBM (meio

sintético padrão). Para a cepa LBA32, foi observada a produtividade de $0,10 \pm 0,015$ g/L/dia, $0,18 \pm 0,015$ g/L/dia e $0,16 \pm 0,005$ g/L/dia em meio BBM, em vinhaça centrifugada e em vinhaça clarificada, respectivamente. Para a cepa LBA40, foi observada a produtividade de $0,13 \pm 0,015$ g/L/dia, $0,18 \pm 0,016$ g/L/dia e $0,22 \pm 0,011$ g/L/dia em meio BBM, em vinhaça centrifugada e em vinhaça clarificada, respectivamente.

Os resultados deste estudo demonstram que a vinhaça pode ser utilizada como um meio de cultivo para a produção de biomassa microalgal sem inviabilizar o uso do sobrenadante do cultivo para a fertirrigação do canavial, uma vez que a maior parte dos micro e macro nutrientes continuam presentes em sua composição. Estes achados ilustram o potencial de integração do cultivo de microalgas em um contexto de biorrefinaria suco-energética.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq e FAPESB

Referências

CORTEZ, L. A. B.; ROSSELL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R. L. V.; LORA, E. E. S. R&D needs in the industrial production of vinasse. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Blucher, 2014. p. 619-636.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 27, p. 622-653, 2013.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC**, Passo Fundo, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

Seleção de microalgas com capacidade de crescimento no efluente da lagoa de estabilização de POME

Carolina R. Cereijo¹, Hugo Santana¹, Patrícia P. M. Brunale¹, Félix G. Siqueira¹, Bruno S. A. F. Brasil¹.

Introdução

Efluentes agroindustriais são resíduos derivados de processos de produção agroindustrial, os quais podem ser sólidos ou líquidos. Os macros e micronutrientes presentes em resíduos líquidos agroindustriais constituem passivos ambientais, que podem ser aproveitados para o cultivo de determinadas espécies de microalgas. Entre os resíduos agroindustriais com potencial de aproveitamento está o POME (efluente da extração do óleo da palma), cuja estimativa de produção em 2013 foi de 275 milhões de litros no Brasil, (MORAIS et al., 2013).

O POME possui um alto potencial poluidor, pois apresenta alta carga orgânica, característica essa que pode causar desequilíbrios ecológicos como eutrofização nas áreas em que o resíduo for lançado (MARONEZE et al., 2014). No Brasil, são utilizadas lagoas de estabilização para reduzir a carga orgânica existente neste resíduo antes que o mesmo seja liberado no meio (ALVES et al., 2013). No entanto, é possível agregar valor e otimizar este processo pela inclusão de tanques aeróbios de alta produtividade a jusante da usual lagoa anaeróbia de estabilização. Este processo permitiria gerar biomassa algal com potencial de servir de matéria-prima para ração animal, pigmentos de alto valor agregado, biocombustíveis e/ou químicos renováveis.

O presente trabalho objetivou selecionar microalgas da coleção da Embrapa Agroenergia com alta produtividade em meio de cultivo a base de efluente de lagoa de estabilização de POME.

Material e Métodos

Para a seleção no efluente da lagoa de estabilização do POME (LE-POME), foram usadas 23 cepas da coleção de microalgas da Embrapa Agroenergia, o LE-POME foi fornecido pela agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá, PA)

Primeiramente, as cepas foram cultivadas em meio sintético padrão (BBM) em erlenmeyers com aeração constante (5L/h) e fotoperíodo (12 horas escuro e 12 horas

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br; bruno.brasil@embrapa.br

com iluminação a 8mil Lux). Após 7 dias, as microalgas foram centrifugadas e o meio BBM substituído pelo resíduo agroindustrial bruto (LE-POME) seguido de cultivo com aeração constante (5L/h) e fotoperíodo 12 horas escuro e 12 horas com iluminação a 8mil Lux por trinta dias. Visando acompanhar a seleção, foram realizadas análises microscópicas no dia 0, 15 e 30 de cultivo para avaliar a presença ou ausência da microalga no meio. Após a seleção, foram feitas curvas de crescimento utilizando as duas cepas mais produtivas em diferentes condições de cultivo: 1) Meio padrão (BBM), axênico, fotoperíodo 12h/12h; 2) LE-POME 100%, axênico, sem iluminação; 3) LE-POME 100%, axênico, fotoperíodo 12h/12h; 4) LE-POME 100%, não-axênico, fotoperíodo 12h/12h; 5) LE-POME 50% (diluído em água destilada), não-axênico, fotoperíodo 12h/12h;

Para avaliar a taxa de crescimento foram feitas contagens de células e com o a contagem do dia da inoculação e o último dia do experimento utilizou-se o cálculo:

$$\text{taxa de crescimento} = \ln(n^{\circ} \text{ células finais}/n^{\circ} \text{ células iniciais})/(\text{tempo final}-\text{tempo inicial})$$

Resultados e Conclusões

Na etapa de seleção em LE-POME, as cepas LBA 40 (*Chlamydomonas biconvexa*) e LBA 52 (*Selenastrum* sp.) apresentaram crescimento nas análises microscópicas. Uma vez selecionadas, estas cepas foram submetidas a cultivos em duas concentrações de meio à base de LE-POME (50% e 100%) na presença/ausência de luz e microrganismos contaminantes. Esta etapa visa caracterizar o tipo de cultivo (heterotrófico, mixotrófico ou fotoautotrófico) passível de ser utilizado para a produção escalonada de biomassa algal em LE-POME e a robustez do crescimento algal na presença de microrganismos contaminantes (cultivos axênicos/não-axênicos). No meio de cultivo LE-POME 100%, a cepa de microalga LBA 40 apresentou a taxa de crescimento médio de 0,58, em condições axênicas, e de 0,63, em condições não axênicas, com desvio padrão de 0,007 e 0,032 respectivamente. Nestas mesmas condições, a cepa LBA 52 apresentou taxa de crescimento médio de 0,68 e 0,65, com desvio padrão de 0,032 e 0,024 respectivamente. No meio de cultivo LE-POME 50%, a cepa LBA 40 apresentou média de taxa de crescimento de 0,57 em condições não axênicas, com desvio padrão de 0,040, enquanto a cepa LBA 52 apresentou 0,61 nessas mesmas condições com desvio padrão de 0,050. Não houve crescimento significativo em meio a base de LE-POME 100% no escuro (condições heterotróficas) o que pode significar que o mesmo não tem a composição necessária para que as cepas apresentem (caso as mesmas tenham capacidade) um crescimento mixotrófico.

Com base nos presentes resultados pode-se observar que ambas as cepas apresentam maiores rendimentos em meio a base de LE-POME 100%, na presença de luz e de microrganismos contaminantes (cultivos não-axênicos), características desejáveis para a produção em larga escala em tanques aeróbios abertos. A futura caracterização da composição química centesimal da biomassa de ambas as cepas permitirá indicar a melhor

destinação biotecnológica (ração animal, pigmentos, biocombustíveis, entre outros) destas matérias-primas potenciais.

Apoio Financeiro

EMBRAPA, CNPq e FINEP

Referências

ALVES, S. A. O.; AMARAL, W. A. N.; HORBACH, M. A.; ANTIQUEIRA, L. M. O. R.; DIAS, I. F. da S. Indicadores de sustentabilidade da agroindústria do dendê no estado do Pará. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 28, n. 4, p. 240-246, 2013.

MARONEZE, M. M.; ZEPKA, L. Q.; VIEIRA, J. G.; QUEIROZ, M. I.; JACOB-LOPES, E. A tecnologia de remoção de fósforo: gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 9, n. 3, p. 445-458, 2014.

MORAIS, J. P. S.; MEDEIROS, E. P. de; SILVA, J. A. da; ROSA, M. de F.; SOUZA FILHO, M. de S. M. de; ALEXANDRE, L. C.; CASSALES, A. R.; SANTOS, M. A. **Valorização de coprodutos da cadeia do dendê**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. 37 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 163).

Avaliação da produção de lipase por macrofungos cultivados em meio Agar-Torta-Dendê

*Débora L. Sciuto¹, Pedro A. Martins¹, Cibele F. Santos¹, Thais D. Mendes¹,
Dasciana S. R. Gambetta¹, Thais F. C. Salum¹, Félix G. Siqueira¹*

Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma palmeira de origem africana, de cujos frutos (dendê) podem-se extrair dois tipos de óleo: 1) o óleo da polpa (extraído do mesocarpo do fruto), conhecido como óleo de dendê ou óleo de palma (*palm oil*) e 2) o óleo da amêndoa, conhecido como óleo de palmiste (*palm kernel oil*); ambos apresentam amplo emprego alimentar e industrial (Müller, 1980). Um dos resíduos gerados no processo de beneficiamento do dendê é a fibra de prensagem (proveniente do mesocarpo do fruto), também conhecida como torta de dendê. Esta torta é um subproduto rico em lipídeos, representando uma fonte alternativa para o crescimento de micro-organismos e indução da produção de suas enzimas.

As lipases são serina hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) em ácidos graxos livres e glicerol (Ramos-Sánchez *et al.*, 2015). Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como a esterificação, transesterificação e interesterificação, sendo a atividade de água (a_w) do meio reacional um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise ou da síntese (Messias *et al.*, 2011). Lipases microbianas possuem diversas aplicações tecnológicas, sendo utilizadas no tratamento de efluentes, resolução de misturas racêmicas, indústria alimentícia, química, farmacêutica, detergentes, têxtil, polpa e papel, produção de biodiesel, entre outras (Hasan *et al.*, 2006). Consequentemente, há grande interesse na prospecção de enzimas alternativas, mais eficientes e estáveis. Desta forma, foi avaliado o crescimento micelial de macrofungos em meio Agar-Torta-Dendê (ATD) visando a seleção de agentes potenciais produtores de lipases.

Métodos

Foram avaliados 14 macrofungos pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB), EMBRAPA Agroenergia: FPB05, FPB11, FPB21, FPB24, FPB25, FPB26, FPB34, FPB101, CC110, CC111, CC247, CC380, CC400 e CC425. Os

¹ Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB), Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; debora.sciuto@colaborador.embrapa.br; felix.siqueira@embrapa.br; dasciana.rodrigues@embrapa.br

isolados foram cultivados em placas de Petri com meio BDA [Batata Dextrose Agar 3,9% (m/v)] e meio ATD [torta de dendê moída 10% (m/v) e agar 2% (m/v)]. As placas foram mantidas a 28 °C durante sete dias. O crescimento micelial dos macrofungos foi avaliado com auxílio de uma régua milimetrada.

Os fungos que apresentaram melhor crescimento no meio ATD foram cultivados por sete dias a 28 °C em placas de Petri contendo 5 meios diferentes: BDA, Agar-Trioleína (Azul de Nilo) [agar nutriente 2,3% (m/v), trioleína 0,38% (v/v) e azul de Nilo A 0,01% (m/v)], Agar-Óleo de Oliva (Rodamina B) [agar nutriente 2,3% (m/v), óleo de oliva 2% (v/v) e rodamina B 0,007% (m/v)], Agar-Torta-Dendê e Agar-Caroço-Algodão [caroço de algodão deslintado e moído 5% (m/v) e agar 2% (m/v)].

O meio BDA foi utilizado como controle do crescimento dos fungos. Os meios Agar-Trioleína e Agar-Óleo de Oliva foram utilizados como testes qualitativos para lipases, avaliando-se o halo de hidrólise formado ao redor das colônias fúngicas.

Os meios Agar-Torta-Dendê e Agar-Caroço-Algodão foram utilizados como substrato para o cultivo dos macrofungos e avaliação quantitativa da produção de lipase. Após o crescimento destes, a biomassa pastosa (meio fermentado) foi macerada e avaliada quanto à atividade de lipase por método titulométrico, utilizando emulsão de óleo de oliva como substrato. Além disso, a biomassa macerada foi homogeneizada com solução salina 2% (m/v) (30 °C / 150 rpm / 2 h) e, então, centrifugada (25 °C / 10.000 rpm / 10 min); o sobrenadante obtido, denominado extrato bruto, foi utilizado para determinação da atividade lipolítica pelo método colorimétrico de hidrólise do palmitato de p -nitrofenila (pNPP).

Resultados e Conclusões

Com exceção da cepa FPB24, todos os macrofungos avaliados cresceram no meio Agar-Torta-Dendê. Os cinco fungos que apresentaram maior taxa de crescimento micelial (cm/dia) foram: FPB11 ($1,45 \pm 0,00$), FPB25 ($1,17 \pm 0,22$), FPB34 ($0,68 \pm 0,05$), FPB101 ($0,76 \pm 0,03$) e CC400 ($0,62 \pm 0,02$).

Nos testes qualitativos para lipase, apenas o macrofungo CC400 (espécie comestível) apresentou halo de hidrólise quando cultivado em meio Agar-Óleo de Oliva, porém o halo não foi observado no meio Agar-Trioleína. Concomitante ao teste qualitativo, a atividade lipolítica foi avaliada quantitativamente nos meios Agar-Torta-Dendê e Agar-Caroço-Algodão, uma vez que a produção enzimática pode variar quando o organismo é cultivado em substratos distintos. Entretanto, também não foi observada atividade de lipase nos extratos brutos enzimáticos (método colorimétrico com pNPP) e biomassas pastosas (método titulométrico).

Outros macrofungos pertencentes à coleção da Embrapa Agroenergia ainda estão sendo avaliados quanto ao crescimento micelial e produção de lipase em meio ATD. A enzima obtida será, então, purificada e caracterizada quanto às suas propriedades bioquímicas.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos do Projeto DendePalm (FINEP).

Referências

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

MESSIAS, J. M.; et al. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MÜLLER, A. A. A Cultura do Dendê. **Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido**, Belém, Miscelânea n 5, 1980.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; et al. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, Los Angeles, v. 5, n. 203, p. 1-9, 2015.

Prospecção de microrganismos produtores de lipase a partir de frutos e de resíduos agroindustriais de dendê (*Elaeis guineensis*)

Pedro A. Martins^{1*}, Débora L. Sciuto¹, Fábio E. M. Lopes¹, Carolina M. Poletto¹, Thais F. C. Salum^{1*}

Introdução

Lipases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, produzindo glicerol e ácidos graxos, bem como promover as reações de esterificação, transesterificação, inter-esterificação, alcoólise e aminólise. Dentre diversas aplicações, as lipases podem ser utilizadas como catalisadoras da rota biológica de produção do biodiesel (CHRISTOPHER *et al.*, 2014; SALUM *et al.*, 2013). Muitos microrganismos capazes de produzir estas enzimas podem ser encontrados associados a ambientes ricos em lipídeos, como os frutos do dendê e os resíduos agroindustriais gerados no processo de extração do óleo destes frutos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos produtores de lipase e avaliar a atividade enzimática destes quando cultivados em fibra de prensagem (torta) de dendê como substrato para fermentação em estado sólido.

Métodos

Os frutos de dendê foram coletados de uma palmeira da Embrapa Cerrados. Foram utilizadas duas abordagens para o isolamento dos microrganismos: na primeira, os frutos foram esterilizados quimicamente na sua parte externa, de forma a se obter apenas os microrganismos endofíticos; na segunda, o fruto inteiro foi utilizado para obtenção dos microrganismos, englobando tanto endofíticos quanto epifíticos. Como fonte de microrganismos, foram utilizadas, também, amostras de fruto, cacho e fibra de prensagem de dendê, além de resíduos agroindustriais cedidos pela empresa Denpasa (Belém-PA). Nestes casos, as amostras foram empregadas para a prospecção sem nenhum tipo de esterilização prévia. As amostras foram incubadas em tampão PBS pH 7,4 a 30°C e agitação de 200rpm por 2h. Em seguida, a solução contendo os microrganismos foi utilizada para inocular os meios LB (bactérias), YPG 2% (leveduras) e BDA (fungos filamentosos), os quais foram incubados a 28°C. Após o crescimento dos microrganismos, cada um deles foi isolado até a obtenção de culturas puras. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produção de lipase através de testes qualitativos em placa utilizando os meios Azul de Nilo

1 Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB), Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

* pedro.alves@colaborador.embrapa.br; thais.salum@embrapa.br

A e Rodamina B (DAMASO *et al.*, 2013). Aqueles que apresentaram resultados positivos para estes testes foram, então, cultivados em torta de dendê como substrato para fermentação em estado sólido e a sua produção de lipases foi avaliada quantitativamente por meio dos métodos colorimétrico (KRIEGER, 1995) e titulométrico (DIAZ, 2006).

Resultados e Conclusões

Ao todo, foram isolados 298 microrganismos, dentre os quais 180 bactérias, 18 leveduras e 100 fungos filamentosos. Do total de microrganismos isolados, 60 apresentaram halos positivos quando avaliados qualitativamente pelos testes de produção de lipases em placa utilizando os meios Azul de Nilo A e Rodamina B, sendo 40 fungos filamentosos, 18 bactérias e 2 leveduras. Até o momento, foram realizados os cultivos de 36 fungos filamentosos por fermentação em estado sólido. Quando avaliados quantitativamente por meio de ensaios enzimáticos dos sólidos fermentados e dos extratos enzimáticos, apenas os fungos filamentosos BDA 24, BDA-FI 7, BDA-FI 8.1, BDA-FI 11 e FPA 15 expressaram alguma atividade lipolítica, já que apresentaram uma acidez maior do sólido fermentado, quando avaliados por meio do método titulométrico. A análise dos sólidos fermentados inativados destes mesmos fungos revelou uma acidez menor do que quando avaliados os mesmos sólidos não inativados, indicando que a acidez observada inicialmente era devido à presença de lipases. Entretanto, testes posteriores ainda precisam ser realizados para confirmar e quantificar a atividade enzimática observada. As bactérias, leveduras e o restante dos fungos filamentosos ainda serão cultivados e avaliados.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos do projeto DendePalm (FINEP).

Referências

- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, Oxford, v. 119, p. 497-520, abr. 2014
- DAMASO, M. C. T.; SALUM, T. F. C.; TERZI, S. C.; COURI, S. Assay methods for lipase activity. In: VERMELHO, A. B.; COURI, S. (Ed.). **Methods to determine enzymatic activity**. Rio de Janeiro, RJ: Bentham Science, 2013, p. 161-194.
- DIAZ, J. C. M.; et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, set. 2006.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- SALUM, T. F. C.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; DAMASO, M. C. T. Produção de biodiesel por catálise enzimática. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013, p. 257-276.

Efeito da temperatura no processo de purificação de celulose

Maria de Sousa Brito Neta^{1}, Felipe Brandão de Paiva Carvalho^{1*} e Leonardo Fonseca Valadares^{1*}*

Introdução

Nos últimos anos, tem surgido grande interesse mundial no desenvolvimento de tecnologias “verdes” que possibilitem a utilização de produtos de menor impacto ambiental. Isso implica no desenvolvimento de processos químicos e produtos que levem a um ambiente mais limpo, saudável e sustentável. Destaque ainda maior deve ser dado à utilização de fibras de origem vegetal, em razão da enorme variedade de espécies passíveis de serem pesquisadas. (SILVA *et al.*, 2009)

O dendzeiro (*Elaeis guineenses*) é uma importante espécie utilizada para a produção de óleo vegetal, principalmente devido à sua alta produtividade, de 4 a 6 toneladas de óleo por hectare/ano. Essa característica torna o dendê uma matéria-prima promissora para produção de biodiesel e, dentro desse contexto de agroenergia, tendências apontam que o mesmo terá grande importância estratégica para o Brasil, especialmente por ser cultivado em áreas degradadas. A utilização dos resíduos da cadeia produtiva do dendê é necessária para evitar problemas ambientais e agregar valor à mesma. Dentre os resíduos da extração do óleo, os cachos vazios são gerados em grande quantidade, chegando a 1,1 toneladas para cada tonelada de óleo de palma produzido (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Os cachos vazios de dendê, assim como outros resíduos agroindustriais ainda subutilizados (FAHMA *et al.*, 2010 *apud* SUN *et al.* 1999), têm o potencial para serem usados como matéria-prima para a indústria de papel e celulose, de polímeros e compósitos, afirmação corroborada pelo elevado número de patentes nacionais e internacionais (SILVA *et al.*, 2009).

A celulose é o principal constituinte das plantas, sendo encontrada tanto em fibras não-lignificadas (como algodão), como em plantas lignificadas (como a madeira), além de ser observada na parede celular de alguns tipos de algas e em membranas de fungos. Dentre as aplicações da celulose purificada, estão a utilização de nanofibras, hidrogéis, microcápsulas, filmes e reforço de compósitos na forma de fibras (SCHLEMMER, *et al.*, 2014).

Neste trabalho, foi estudado o efeito da temperatura no rendimento e grau de branqueamento da celulose extraída e purificada a partir de cachos vazios de dendê.

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901; *maria.brito@colaborador.embrapa.br;felipe.carvalho@embrapa.br;leonardo.valadares@embrapa.br

Métodos

A purificação da celulose foi realizada em três etapas: remoção de extrativos dos cachos vazios de dendê moídos, realizada em Extrator Acelerado por Solvente (ASE, Dionex - Thermo Scientific); extração da lignina realizada em banho termostático com clorito, água e homogeneizador; e extração da hemicelulose com hidróxido de potássio, com o auxílio do homogeneizador.

Os cachos de dendê moídos foram submetidos à extração por solvente no ASE, utilizando éter de petróleo e etanol (2:1), a 105 °C por 10 minutos, conforme metodologia estabelecida anteriormente pelo grupo de pesquisa.

Para a extração da lignina, foram testadas três temperaturas: 53,2 °C, 70 °C e 86,8 °C, enquanto as demais condições operacionais foram mantidas constantes (adições de clorito, pH = 4 e teor de biomassa = 5%). Para cada ensaio, foi preparada uma solução contendo 23,5 g de clorito de sódio (NaClO_2) e 6 mL de ácido acético (CH_3COOH), diluídos em 600 mL de água destilada previamente aquecida à temperatura do ensaio. Foram acrescentadas à solução 40 g de biomassa sem extrativos, e a reação mantida sob agitação (300 rpm) e temperatura constantes, por 4 horas, sendo que a cada hora decorrida, foram acrescentadas ao sistema novas doses de clorito de sódio e ácido acético, nas mesmas quantidades iniciais. Após as 4 horas, o sistema foi desligado e a reação permaneceu em repouso por 1 hora, ao final da qual a solução foi filtrada em um filtro de polipropileno e lavada com 1 L de água fervente.

O sólido retido foi submetido à extração da hemicelulose. Para tanto, o mesmo foi acrescentado a uma solução de 6% de hidróxido de potássio (KOH), e levado à agitação constante durante 17 horas (overnight), à temperatura ambiente, de aproximadamente 20 °C. Ao término do processo, a solução foi centrifugada e lavada até obtenção de pH 7,0.

Foram realizadas análises de teor de sólidos e colorimetria, utilizando Colorímetro Konica Minolta, sendo realizadas em triplicata a análise colorimétrica de cada amostra. As três amostras, provenientes dos tratamentos com as diferentes temperaturas (53,2 °C, 70 °C e 86,8 °C), foram identificadas como A, B e C respectivamente.

Resultados e Conclusões

A amostra A, tratada a 53,2 °C, apresentou massa final 16,83 g, com rendimento de 42,08% e luminosidade $89,64 \pm 0,05$. Para a amostra B, a 70 °C, obteve-se massa final 16,32 g, com rendimento de 40,79% e luminosidade $91,74 \pm 0,28$. A amostra C, cujo tratamento foi realizado a 86,8 °C, apresentou massa final 8,48 g, com rendimento de 21,20% e luminosidade $92,87 \pm 0,03$.

Pode-se observar que, com o aumento de temperatura, ocorre uma diminuição do rendimento final em massa e ao mesmo tempo obtêm-se um branqueamento mais acentuado da celulose.

Os resultados sugerem que o decréscimo no rendimento mássico está associado à maior extração de lignina e hemicelulose, obtendo-se uma celulose mais pura. Consequentemente, o maior grau de pureza resultaria em uma luminosidade mais acentuada, o que é confirmado pelo resultado obtido na medida colorimétrica realizada.

Portanto, conclui-se que o aumento da temperatura durante o processo está associado ao maior branqueamento e purificação da celulose extraída.

A realização de análises centesimais dos materiais obtidos, para a quantificação da celulose, confirmaria as conclusões apresentadas.

Apoio Financeiro

Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP. Projeto “Estratégias genômicas e agregação de valor para a cadeia produtiva do dendê”.

Referências

FAHMA, F.; et al. Isolation, preparation, and characterization of nanofibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). **Cellulose**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 977-985, ago. 2010.

RIBEIRO, S. S. R.; et al. Purificação da celulose e extração das nanofibras de celulose de cachos vazios de dendê. In: Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 7., São Carlos, 2013. **Resumos...** São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2013.

SCHLEMMER, D. A.; ANDREANI, L.; VALADARES, L. F. Biomateriais: polímeros e compósitos. Embrapa Agroenergia, Brasília, Comunicado Técnico nº 10, 2014.

SILVA, R.; et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, maio. 2009.

Otimização da polimerização do glicerol

Débora R. Serra^{1*}, Larissa Andreani¹ e Leonardo F. Valadares¹

Introdução

O biodiesel é um combustível obtido a partir de fontes renováveis que não possui compostos sulfurados e aromáticos, apresenta alta capacidade calorífica, grande quantidade de cetanos e é biodegradável (SANTOS et al., 2009). O biodiesel pode ser obtido por transesterificação, que consiste na reação de triglicerídeos, provenientes de óleos vegetais ou gorduras animais, com álcoois na presença de um catalisador para gerar ésteres e glicerina. Estima-se que a produção de biodiesel aumentará nos próximos anos, podendo chegar a 14,3 bilhões de toneladas em 2020, gerando aproximadamente 1,4 bilhões de toneladas de glicerina (VASCONCELOS et al., 2012). Devido à quantidade crescente de glicerina produzida, seu preço reduziu consideravelmente, logo é importante desenvolver métodos para o aproveitamento desse coproduto. A glicerina pode ser utilizada por meio de sua polimerização, que é realizada com catálise ácida. Essa polimerização produz éteres com possível aplicação como surfactantes não-iônicos, ideais para aplicação em cosméticos e na indústria alimentícia (UMPIERRE; MACHADO, 2010/2011). Também podem ser utilizados em substituição aos polióis, como aditivo para tintas e cimentos, como lubrificantes e como matéria-prima para a produção de poliuretanos (MEDEIROS, 2010). O objetivo desse trabalho foi otimizar essa polimerização variando a concentração do catalisador e a temperatura da reação.

Métodos

Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, onde os fatores estudados foram: temperatura e concentração do catalisador, os níveis (-) foram 140 °C e 1% de H_2SO_4 e os níveis (+) foram 220 °C e 3% de H_2SO_4 e o ponto central com 2% de H_2SO_4 e 180 °C. Utilizou-se glicerol P.A. da marca Sigma Aldrich e ácido sulfúrico com 95% de pureza da marca Dinâmica. O sistema reacional foi montado utilizando uma placa de agitação abaixo de uma manta aquecedora, e um balão de três bocas de 250 mL. Em uma das bocas do balão conectou-se o fluxo de nitrogênio, medido por um rotâmetro. Na segunda boca conectou-se um termopar para o controle da temperatura e na terceira conectou-se um *Dean-Stark* ligado a um condensador e a este uma bomba de vácuo com um *trap* recoberto com gelo a -80 °C e etanol, para evitar a contaminação da bomba. De

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*debora.serra@colaborador.embrapa.br; leonardo.valadares@embrapa.br

acordo com o planejamento, as reações ocorreriam por 4 horas, sob sistema de vácuo com fluxo de nitrogênio a aproximadamente 10 litros por minuto. Os produtos foram analisados por espectrofotometria de infravermelho com o espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer.

Resultados e Conclusões

As reações realizadas a 220 °C ocorreram por aproximadamente uma hora, pois a reação começou a borbulhar de maneira brusca, sendo o tempo de reação variado, de forma não planejada, devido às condições do experimento. Os produtos obtidos dessas reações apresentaram-se como sólidos pretos com um odor forte. Já os produtos obtidos a 140 °C se apresentaram como líquidos viscosos sendo que a reação realizada com 1% de catalisador apresentou uma cor amarelada e a realizada com 3% mostrou-se com uma cor marrom. A primeira reação no ponto central ocorreu por apenas meia hora e apresentou-se como um líquido escuro extremamente viscoso. Já as duas seguintes apresentaram-se como sólidos pretos, sendo que uma reação ocorreu por meia hora e a outra por duas horas, até que se transformassem em sólidos. Pelos espectros de infravermelho conclui-se que em altas temperaturas ocorreu conversão de hidroxilas em éteres, que podem ser visualizados no pico em aproximadamente 1110 cm^{-1} . Porém houve a formação de carbonilas terminais, ou seja, aldeídos, representadas pelo pico em aproximadamente 1730 cm^{-1} . Apesar de não ser evidenciado a formação de aldeídos nas reações realizadas em baixas temperaturas, também não foi reparado a formação de éteres.

Foi obtido líquido no *Dean-Stark* apenas nas reações realizadas em altas temperaturas e nas reações do ponto central. Os espectros de infravermelho dos dois líquidos obtidos apresentam frequências de transmitância muito próximas à da água, porém com alguns picos fracos e largos entre 1000-1500 cm^{-1} que podem ser atribuídos ao ácido utilizado nas reações.

Para todas as reações obteve-se resíduo no *trap*. Na reação realizada com 3% de catalisador e 140 °C, o resíduo apresentou um pico característico de carbonila, em 1730 cm^{-1} e houve uma redução do pico de hidroxila em 3300 cm^{-1} em relação ao espectro do glicerol. Na reação realizada com 1% de catalisador e 140 °C não houveram alterações significativas no espectro em relação ao espectro do glicerol, concluindo-se que o glicerol do meio reacional foi arrastado pelo vácuo. Em ambas as reações realizadas a 220 °C há dois picos característicos de hidroxila em água, um próximo a 3290 cm^{-1} e o outro próximo de 1240 cm^{-1} , porém todos os outros picos não apresentaram mudança significativa em relação ao glicerol, concluindo-se que o sistema de vácuo arrastou parte da água formada, que deveria ter sido condensada no *Dean-Stark*, e parte do glicerol utilizado na reação. Já nas reações do ponto central os espectros dos resíduos obtidos no *trap* foram semelhantes aos obtidos no *Dean-Stark*, concluindo-se que a água que não condensou para o *Dean-Stark* foi arrastada pelo sistema e condensou-se no *trap*.

Conclui-se que as reações conduzidas a 140 °C, utilizando 1 e 3% de H₂SO₄, apresentaram alterações nos aspectos físicos (cor e viscosidade), indicando a formação de oligômeros. Contudo, as reações conduzidas acima de 180 °C geraram sólidos com formação de carbonilas terminais, indicando que esta é uma condição drástica, indesejada para a formação dos polímeros.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pelos fundos do projeto Produtos da reação oxidativa de glicerina e seus polímeros doados por FINEP/CNPq.

Referências

MEDEIROS, M. Influência da temperatura e da natureza do catalisador na polimerização do glicerol. **Polímeros**, São Carlos, v. 20, n. 3, p. 188-193, 2010.

SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. Biodiesel: uma alternativa de combustível líquido. **Revista Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 58-62, 2009. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc31_1/11-EEQ-3707.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2015.

UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. Valorização do glicerol. **Revista BiodieselBR**, dez. 2010 / jan. 2011. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/revista/020/direto-do-laboratorio-20.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2015.

VASCONCELOS, Y. Glicerina, resíduo bem-vindo do biodiesel e as pesquisas em destaque. **Revista BiodieselBR**, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/glicerina/glicerina-residuo-biodiesel-pesquisas-040712.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2015.

Preparo de amostra em metabolômica de leveduras para a determinação dos metabólitos produzidos na fermentação de xilose

Christiane G. Campos^{1,2}, Henrique C. T. Veras^{1,3}, José Antônio de A. Ribeiro¹, Patrícia P. K. G. Costa¹, Clenilson M. Rodrigues¹, João Ricardo M. Almeida^{1,3}, Patrícia V. Abdelnur^{1,2}

Introdução

O preparo de amostra em metabolômica é um dos fatores determinantes para a obtenção de dados representativos e reprodutíveis da via metabólica de microrganismos e consiste em duas etapas: *quenching* e extração. O *quenching* é a interrupção do metabolismo celular realizado através de variações bruscas de pH ou temperatura. Durante a etapa de extração, as paredes celulares são quimicamente, termicamente ou mecanicamente rompidas para a passagem dos metabólitos para a fase líquida (BERGDAHL et al., 2012). Diversos estudos encontrados na literatura não detalham o preparo de amostra, sendo necessário o desenvolvimento de um protocolo aplicável ao laboratório.

Este trabalho tem como objetivo otimizar e aplicar o preparo de amostra em metabolômica para identificação dos metabólitos intra e extracelulares produzidos por leveduras fermentadoras de xilose em diferentes condições de crescimento aeróbico. O estudo do metabolismo destes microrganismos pode facilitar a compreensão dos fatores limitantes para conversão de xilose a etanol e fornecer dados para a obtenção de linhagens melhoradas geneticamente. Dois métodos analíticos baseados em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas *tandem* (UPLC-MS/MS) foram utilizados para a identificação de metabólitos.

Métodos

Inicialmente foi realizada a fermentação das leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum* em quadruplicata nas condições aeróbica e microaeróbica. O experimento foi feito em um fermentador sob condições controladas para o crescimento celular a: 28 °C, agitação de 200 rpm, fluxo mínimo de ar em 0,05 L.min⁻¹, pH 5,5 e O₂ inicial com 100%, sendo consumido no decorrer do tempo de cultivo, até ficar em condição microaeróbica. Para a condição aeróbica foi mantido 100% de ar com fluxo de 0,5-0,8

1 Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, Brasília/DF, Brasil

2 Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil

3 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil

*camposgchristiane@gmail.com

L.min⁻¹. As amostras foram coletadas em três pontos específicos e em triplicata durante a fase exponencial de crescimento, entre 20 e 40 horas de fermentação para as duas condições testadas. Após a coleta da amostra seguiu-se as etapas de *quenching* e extração.

O método do *quenching* foi realizado a partir da adição de 2 mL de amostra em 8 mL de uma solução tampão de metanol 60% submerso em um banho termostático a -40°C. Em seguida esta mistura foi centrifugada a -9°C, e o *pellet* resultante congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até futura extração. A etapa de extração foi realizada utilizando o método do etanol fervente [CAMPOS et al., 2014; CARNICER et al., 2012]. Inicialmente as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e colocadas no banho termostático a -40°C, por 5 minutos. Uma solução tampão de etanol (75% de etanol, 10mM de acetato de amônio, pH 7,4) foi aquecida à aproximadamente 85°C. O etanol quente foi adicionado diretamente no *pellet* na proporção (1:1). As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex, transferidas para um tubo *ependorf* e incubadas por 3 minutos a 85°C, em um termoagitador para tubo *ependorf* com agitação vigorosa constante. As células foram resfriadas a -40°C no banho termostático e centrifugadas em uma microcentrifuga refrigerada, a 5000 rpm e -9°C por 3 minutos. Os restos celulares foram descartados e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *ependorf* de 2 mL. As amostras foram então levadas à secura em um concentrador a vácuo e armazenadas a -80°C. Para a análise dos metabólitos, as amostras foram reconstituídas em 200 µL de água ultra pura e submetidos ao ultrassom por 5 minutos, a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante resultante transferido para o *vial*. Em seguida as amostras foram analisadas por UHPLC-MS/MS segundo método descrito por Campos et al. (PARK et al., 2012).

Resultados e Conclusões

A otimização do preparo de amostra foi essencial para a determinação de fatores como: i) número de replicatas e pontos de coleta, ii) volume de amostra e iii) escolha dos materiais e equipamentos a serem utilizados. Entre os diferentes tempos de coleta durante a fase exponencial de crescimento é esperado similaridade do metabolismo, tendo em vista que nesta etapa as células se adaptaram ao meio e passaram a se dividir igualmente. No entanto, o mínimo de três determinações (triplicata) é recomendado para obter-se resultados estatísticos representativos, por este motivo foi estabelecido a coleta em triplicata de três diferentes pontos durante a fase de crescimento exponencial da levedura. A retirada de mais replicatas poderia influenciar diretamente no processo fermentativo, alterando suas condições controladas de oxigênio. O volume escolhido para a otimização do preparo de amostra foi 2 mL, pois este foi o volume máximo que se adequou ao preparo de amostra com as menores perdas durante o processo. Além disso, este volume de amostra permitiu a utilização dos equipamentos utilizados na incubação e na centrifugação durante a etapa de

extração. Através dos métodos analíticos baseados em UHPLC-MS/MS, as amostras foram analisadas qualitativamente e alguns metabólitos puderam ser identificados: xilose, xilitol, xilulose, fosfo(enol)piruvato, glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ácido málico e glicerol. Pode-se concluir que o protocolo de preparo de amostra desenvolvido mostrou-se eficiente e será fundamental para o estudo e comparação do metabolismo da fermentação da xilose por leveduras, os quais poderão ter diferentes aplicações em biotecnologia.

Apoio Financeiro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

BERGDAHL, B.; HEER, D.; SAUER, U.; HAHN-HÄGERDAL, B.; VAN NIEL, E. W. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 34, 2012.

CAMPOS, C. G.; RIBEIRO, J. A. de A.; COSTA, P. P. K. G.; RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V. Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação de metabólitos em leveduras por UPLC-MS/MS. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, 2014, Campos do Jordão, SP. **Livro de resumos**. [S.l.]: AB Sciex, 2014. p. 293.

CARNICER, M.; CANELAS, A. B.; TEN PIERICK, A.; ZENG, Z.; VAN DAM, J.; ALBIOL, J.; FERRER, P.; HEIJNEN, J. J.; VAN GULIK, W. Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*. **Metabolomics**, New York, v. 8, n. 2, p. 284-298, 2012.

PARK, C.; YUN, S.; LEE, S. Y.; PARK, K.; LEE, J. Metabolic profiling of *Klebsiella oxytoca*: evaluation of methods for extraction of intracellular metabolites using UPLC/Q-TOF-MS. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Totowa, v. 167, n. 3, p. 425-438, 2012.

Desenvolvimento de protocolo analítico para raízes de dendê utilizando UPLC-ESI-Q-TOF-MS

Maria Esther Ricci-Silva¹, Jorge C. Rodrigues Neto^{1,2}, José Antônio de Aquino Ribeiro¹, Clenilson Martins Rodrigues¹, Patrícia V. Abdelnur^{1,2}*

Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) possui uma alta produção de óleo, sendo, portanto, uma matéria-prima promissora para a produção do biodiesel (EDEM et. al., 2002). No entanto, esta cultura é afetada pelo “amarelecimento fatal (AF)”, uma doença que resulta na morte das plantas (BERGMAN et. al., 2013). A análise dos compostos químicos presentes no dendê pode auxiliar na descoberta da causa do AF.

Este trabalho tem como objetivo descrever o desenvolvimento de protocolo analítico na extração de metabólitos secundários presentes na raiz de dendê, assim como a análise preliminar das frações polar e apolar do extrato, feita por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com o intuito de, futuramente, analisar folhas com e sem sintomas de AF identificando as diferenças químicas decorrentes da doença.

Diversos trabalhos mostram resultados da identificação de metabólitos em frutos (TEH et al., 2013) e folhas (HASHIM et al., 2013), assim como proteínas em raiz (AL-OBAIDI, 2014), mas não são mostrados resultados de metabólitos em raiz, o que torna o presente trabalho inovador em seu objetivo, já que os metabólitos encontrados na raiz provavelmente serão diferentes dos encontrados em outras partes da planta.

Métodos

A raiz foi coletada na Embrapa Agroenergia, armazenada a -80°C e seus metabólitos foram extraídos com metanol (LISEC et. al., 2006). Foram pesados 100 mg de raiz em tubos eppendorff, sendo feitas 3 réplicas biológicas. As raízes foram trituradas em moinho de bolas utilizando 2 esferas de metal de 3 mm usando nitrogênio líquido. Foram adicionados 1,4 mL de metanol 100% e 20 µl de ampicilina (2.5 mg/ml), sendo vortexados. A seguir, os tubos foram agitados em bloco thermomixer a 70°C durante 10 minutos a 600 rpm. Os tubos foram centrifugados a 11.000G por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para um tubo maior, onde foram adicionados 750 µl de clorofórmio e 1400 µl de água milli-Q, posteriormente vortexados. Foi feita a centrifugação a 3.000G durante 15 minutos e 150 µl do sobrenadante e 150 µl da fase inferior (apolar) foram transferidos para um tubo

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Goiânia/GO, Brasil, 74001-970.

*jorge.rodrigues@colaborador.embrapa.br

ependorff e solubilizada em isopropanol:acetonitrila (3:7). A parte superior foi solubilizada em água. Para as análises por cromatografia líquida, foi utilizado o sistema Nexera X2 (Shimadzu). A coluna utilizada foi a Acquity UPLC BEH C8 (1.7 um 2.1x150 mm) (marca Waters), mantida a 45°C. A fase móvel foi composta por solução A (100% água milli-Q), solução B (100% acetonitrila), solução C (5% ácido fórmico) e solução D (100% isopropanol), com fluxo de 0.4 mL/min e programa de gradiente. A análise no espectrômetro de massas MaXis 4G (Bruker Daltonics) foi realizado no modo positivo, voltagem do capilar +4000V, fonte a 200°C, sob fluxo de nitrogênio de 9 L/min e 4 bar, *end plate offset* 500V, range de massas m/z de 90 a 1200, tune funnel 1RF 200 Vpp, energia de colisão 8 eV, transfer time 100 us, colisão RF 800 Vpp, pré-pulse storage 10 us, range de spectra 2 Hz. Os dados foram adquiridos através do software otof control versão 3.4 (Bruker Daltonics) e Hystar versão 3.2 (Bruker Daltonics). Posteriormente, os dados cromatográficos e espectros obtidos foram analisados com auxílio do software DataAnalysis versão 4.2 (Bruker Daltonics).

Resultados e Conclusões

Foram detectados 106 compostos na fração polar do extrato da raiz de dendê utilizando UHPLC-MS. Alguns picos co-eluíram, nos tempos de 5 a 12 min e 15 a 18 min. Nas próximas etapas, serão realizadas alterações no gradiente do solvente a fim de obter maior resolução na separação dos compostos. A fração apolar ainda não foi avaliada e faz parte dos próximos passos do projeto, assim como a otimização do método para análise de MS/MS para identificação dos compostos detectados. Assim que o protocolo estiver desenvolvido, ele será utilizado para a comparação metabólica de raízes de dendê com e sem sintomas de AF.

Apoio Financeiro

Embrapa, CAPES e FINEP.

Referências

- AL-OBAYDI, J. R. Identification of Proteins of Altered Abundance in Oil Palm Infected with *Ganoderma boninense*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 5175-5192, 2014.
- BERGMANN, J. C. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, 2013.
- EDEM, D. O. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, n. 3-4, p. 319-341, 2002.
- HASHIM, T., RAMLI, U. S. Identification of oil palm (*Elaeis guineensis*) spear leaf metabolites using mass spectrometry and neutral loss analysis. **Journal of Oil Palm Research**, v. 25, n. 1, p. 72-83, 2013.
- LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387-396, 2006.
- TEH, H. F. et al. Differential metabolite profiles during fruit development in high-yielding oil palm mesocarp. **Plos One**, v. 8, n. 4, e61344, 2013.

Rendimento de proteína bruta em biomassa de microalga *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em vinhaça utilizando fotobiorreatores

Valérya C. Teles¹, André F.P. Oliveira¹, Itânia P. Soares¹, Raquel B. Campanha¹, Bruno S. A. F. Brasil¹.

Introdução

Nos últimos anos, as questões ambientais atreladas a fatores econômicos têm sido alvo de debates de interesse mundial, resultando na busca por novas matrizes de bioprodutos. Nesse cenário, a exploração de biomassa originária de microalgas tem se apresentado como uma alternativa sustentável para o suprimento da demanda de compostos químicos de interesse para a indústria de bens de consumo, dos gêneros alimentícios, farmacológicos, bioquímicos e insumos agrícolas. As algas verdes (*Chlorophyta*) são microalgas eucariontes fotossintetizantes encontradas em todos os ambientes úmidos do planeta. A composição química da biomassa de microalgas baseia-se majoritariamente nas frações de pigmentos, carboidratos, proteínas e lipídeos. Esse conteúdo sofre alterações de acordo com o gênero, espécie ou estirpe (ANDRADE et al., 2014) e condições de cultivo. A fração proteica de microalgas pode ser ressaltada como fonte promissora para ração animal e suplementos alimentares, pois apresenta alta qualidade nutritiva e pode ser comparada com a de outras proteínas alimentares, devido ao seu perfil e proporção de aminoácidos (BECKER, 2007).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a potencialidade para produção de proteína de uma nova cepa de microalga da espécie *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em vinhaça. A vinhaça é o mais abundante efluente da indústria sucroalcooleira, constituindo um passivo ambiental com alta carga orgânica e baixo pH que deve ser tratado antes de sua disposição final. Usualmente, este efluente é redirecionado para a fertirrigação de canaviais, porém esta prática acarreta no empobrecimento do solo e na possibilidade de contaminação do lençol freático quando utilizada por períodos prolongados.

Métodos

A cepa de microalga *Chlamydomonas biconvexa* (LBA40), proveniente da coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia, foi cultivada em fotobiorreator tipo placas planas com sistema de agitação *air lift*. O cultivo foi realizado durante 3 dias com fotoperíodo de 12 horas de luz (35000 lux) e 12 horas de escuro, com injeção de

¹ Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;
*valerya.teles@colaborador.embrapa.br; itania.soares@embrapa.br.

ar atmosférico (48 L/h) e CO₂(4,8 L/h), com temperatura mínima de 26°C. Utilizou-se como meio de cultura vinhaça proveniente da usina Jales Machado S. A. (Goianésia- GO). Foram realizadas duas formulações distintas para o meio de cultivo: vinhaça clarificada em concentração 100% e vinhaça bruta em concentração 50%(diluída em água destilada). No procedimento de clarificação da vinhaça foram utilizadas 3 g de cal hidratada/ L de vinhaça, sendo que a solução foi mantida em repouso por 40 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 800 x g e o *pellet* descartado. O pH foi ajustado para 8,0 e o material obtido foi esterilizado por autoclavagem (15 minutos a 1 atm). A concentração utilizada foi de 100% no meio de cultivo. Para o segundo processo, a vinhaça foi centrifugada a 800 x g e o *pellet* descartado. O pH do resíduo foi ajustado para 8,0 e o material foi esterilizado por autoclavagem (15 minutos a 1 atm). Posteriormente, o meio foi diluído no momento da efetuação da inoculação para 50% vinhaça e 50% água destilada). As microalgas foram colhidas após 3 dias de cultivo por centrifugação, lavadas com água destilada e submetidas a congelamento a -20 °C. Em seguida realizou-se a liofilização da biomassa. O teor de proteína bruta foi medido em triplicata, a partir de biomassa algal previamente liofilizada e triturada em moinho analítico de bancada. Para a determinação de proteína bruta (método Kjeldahl) foi usado como referência o protocolo (AOAC, 1990) e utilizou-se como fator de conversão de nitrogênio N=4,78 proposto para microalgas (LOURENÇO et. al., 2004).

Resultados e Conclusões

Foi verificado que a cepa LBA-40 apresentou as seguintes percentagens médias de proteína bruta: 1) Formulação vinhaça 50%: 41,68±0,35; 2) Formulação vinhaça clarificada 100%: 39,92±0,60. A produtividade média (mg/L/dia) encontrada foi de 75,95±0,00 e 88,71±0,00 respectivamente. Os valores de percentual proteico encontrados são semelhantes aos reportados para a espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, 39,42% cultivada em meio sintético (LOHMAN, et. al.,2014). A pesquisa possibilitou a caracterização da biomassa de uma nova cepa de microalga da espécie *Chlamydomonas biconvexa*, cultivada em meio a base de vinhaça em duas formulações, vinhaça 50 % e vinhaça clarificada 100%, usando fotobiorreatores de placas planas. Os resultados obtidos das análises de proteínas para os tratamentos considerados, não apresentaram diferenças significativas.

Pode-se afirmar que as diferentes formulações do meio de cultivo contendo vinhaça não propiciaram alterações relevantes no percentual de proteínas, mas a produtividade foi maior na formulação vinhaça clarificada 100%. Os teores de proteína obtidos demonstram o potencial da cepa estudada como fonte de biomassa para obtenção de proteínas, podendo ser empregada, na indústria farmacêutica, de suplementos alimentícios, fertilizantes e de ração para animais. No entanto, estudos adicionais de palatabilidade, digestibilidade e toxicidade em animais são necessários para garantir a segurança desta nova fonte de proteínas.

Apoio Financeiro

Este trabalho recebeu recursos financeiros do projeto da Embrapa (ALGAVIN - SEG: 02.12.11.001.00.00).

Referências

ANDRADE, D. S. et al. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas. In: ANDRADE, D. S.; Colozzi-Filho, A. (Ed.). **Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo**. v. 1. Londrina: IAPAR, 2014.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists - Official methods of analysis. 11TH ed. Washington D. C.; AOAC., 1990. 1051p.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

LOHMAN, E. J. et al. Carbon partitioning in lipids synthesized by *Chlamydomonas reinhardtii* when cultured under three unique inorganic carbon regimes. **Algal Research**, v. 5, July 2014, 171–180, 2014.

LOURENÇO S. O. et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 5, p. 17–32, 2004.

Avaliação da eficiência de aditivos comerciais no aumento da estabilidade à oxidação do biodiesel produzido a base de óleo de soja

Rodrigo B.C. Dutra^{1*}, Itânia P. Soares^{1*}

Introdução

O biodiesel é um éster monoalquílico derivado da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais que se tornou objeto de interesse de diversos estudos por ser de uma fonte renovável e emitir menos poluentes quando comparado ao diesel (MONYEM e VAN GERPEN, 2001). Certas propriedades relativas ao biodiesel, como viscosidade, acidez e presença de peróxido são alteradas com a oxidação do combustível, o que acarreta problemas em sua utilização, por danificarem o motor (JAIN e SHARMA, 2010). Em vista disso, é necessário que o biodiesel possua uma estabilidade oxidativa de 8 h, a 110 °C, conforme descrito na Resolução ANP 45/2014. Essa condição não é atingida pelo biodiesel não aditivado, devido à eliminação dos antioxidantes naturais no processo de produção, tornando necessária a adição de antioxidantes ao combustível, sendo que a concentração máxima permitida desse aditivo é de 5000 ppm (AGARWAL et al., 2015). Essa medida garante maior qualidade ao biodiesel, mas por outro lado não é interessante para o produtor, já que a aditivação onera o valor do combustível. Sendo assim, as pesquisas têm buscado encontrar aditivos que tenham um baixo custo e que possam ser adicionado na menor concentração possível. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a utilização de aditivos comerciais A, B, C e sua alteração na oxidação do biodiesel.

Métodos

As substâncias escolhidas para testes como aditivos ainda não são empregadas comercialmente com a finalidade de antioxidante para biodiesel, mas como aditivos que melhoram a eficiência de combustão dos combustíveis.

O biodiesel foi produzido utilizando óleo de soja, seguindo a razão molar metanol/óleo de 6:1 e 0,8 % de hidróxido de potássio, como catalisador. A reação ocorreu na temperatura de 50 °C por 1 h, sob agitação constante e com uso de condensador. O biodiesel foi lavado com 10 % da massa de óleo utilizada de água destilada e ácido cítrico 1 %, posteriormente filtrado e o resíduo de metanol e água evaporados com a utilização de um rotaevaporador. A análise de estabilidade a oxidação foi realizada em duplicata utilizando 3 g de biodiesel, contendo o aditivo para cada réplica, e para controle o biodiesel sem aditivo, utilizando um

1 rodrigo.dutra@colaborador.embrapa.br itania.soares@embrapa.br

analisador de estabilidade à oxidação Metrohm modelo Rancimat 873, segundo a norma EN 14112. A preparação das amostras foi feita adicionando 5000 ppm aos aditivos A, B e 5000 e 3000 ppm ao aditivo C.

Resultados e Conclusões

O aditivo A (LQB-633-14) obteve um oxidação de 1,19 h em uma das réplicas, sendo a outra réplica não detectada pelo equipamento, não atingindo o valor especificado de 6 h. O aditivo B (LQB-635-14) teve seu tempo de oxidação de 0,07 h na réplica 1 e 0,06 h na réplica 2, não atingindo o valor necessário. O aditivo C (LQB-634-14) obteve tempo de oxidação de 13,23 h na réplica 1 e 13,12 h na réplica 2, quando utilizado 5000 ppm. Como o aditivo C obteve um ótimo resultado, foi realizada uma análise em menor concentração, em que foi adicionado 3000 ppm do aditivo C a 7 g de biodiesel para a realização da análise. Ao se utilizar 3000 ppm, foi obtido um tempo de oxidação de 9,85 h na réplica 1 e 9,90 h na réplica 2 para o aditivo C. Dessa forma, o aditivo C foi o único a atender a exigência de estabilidade à oxidação segundo a Resolução ANP 45/2014. Além disso, o resultado foi importante para esse aditivo considerando que a concentração utilizada foi de apenas 3000 ppm. Em vista que o aditivo C atingiu os valores definidos na Resolução ANP 45/2014, foram realizados também testes de massa específica à 20 °C em duplicata utilizando 3000 ppm do aditivo em biodiesel de óleo de soja e testes de viscosidade à 40 °C em duplicata, utilizando 3000 ppm do aditivo em biodiesel de soja.

A análise de massa específica do biodiesel contendo o aditivo C mostrou resultados de 0,88759 g/cm³ para a réplica 1 e 0,88758 g/cm³ para a réplica 2, o que está de acordo com os valores estipulados pela resolução Resolução ANP 45/2014., assim como os ensaios de viscosidade, que mostraram resultados de 5,1406 mm²/s para a réplica 1 e 5,1566 mm²/s para a réplica 2. Dessa forma, o aditivo C quando utilizado na concentração de 3000 ppm obtém valores de estabilidade à oxidação na faixa estipulada pela Resolução ANP 45/2014 sem alterar a viscosidade e densidade do biodiesel.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pelo CNPq, Edital 40, projeto Biobom.

Referências

AGARWAL, A. K.; KHURANA, D.; DHAR, A. Improving oxidation stability of biodiesels derived from Karanja, Neem and Jatropha: step forward in the direction of commercialization. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 107, n. 16, p. 646-652, 2015.

BRASIL. Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 ago. 2014, Seção 1, p. 68.

JAIN, S.; SHARMA, M.P. Stability of biodiesel and its blends: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 667-678, feb. 2010.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J.H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emission. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 317-325, abr. 2001.



RESUMOS – GRADUADOS

**GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

DNA barcoding of green microalgae using *rbcl* and *nuITS2* markers reveals putative new species

Sámed I. I. A. Hadi^{1,2*}; Hugo Santana^{1,3}; Patrícia P. M. Brunale¹; Taísa G. Gomes^{1,4}; Márcia D. Oliveira⁵; Alexandre Matthiensen⁶; Marcos E. C. Oliveira⁷; Flávia C. P. Silva¹; Bruno S. A. F. Brasil¹

Background

DNA barcoding is a method for species identification, which identifies specimens based on DNA sequence similarity against a sequence database of *a priori* defined species. DNA-based identification is particularly useful unveiling cryptic diversity at various taxonomic levels and identifying species where structural characters are few or difficult to observe (HEBERT et al., 2004). The green algae, Chlorophyta, comprise an ancient and taxonomic diverse lineage with approximately 8,000 described species. It is estimated that at least 5,000 species still remain undescribed, notably in tropical and subtropical areas (GUIRY, 2012). There is a growing interest in using green microalgae for biotechnological applications such as the production of fuels, chemicals, food and animal feed. This study aimed to identify neotropical green microalgae specimens isolated from Brazilian inland waters through the use of *rbcl* and *nuITS2* markers as DNA barcodes. Novel primers for neotropical specimens' *rbcl* gene amplification and sequencing are presented, as well as comparisons between *rbcl* and *nuITS2* markers variability, primers universality and databases accuracy and completeness.

Methods

The environments of collection included natural freshwater bodies within the Amazon rainforest, the Cerrado Savanna and the Pantanal flooded grasslands, as well as anthropogenic wastewater deposits from the sugarcane industry (vinasse), pisciculture ponds and swine farm derived wastewater. A total of 51 strains were isolated and deposited in the Collection of Photosynthetic Microorganisms for Agroenergy Research at Embrapa (Brasília/DF – Brazil). Total genomic DNA was isolated from 30 mg of fresh algal biomass using the CTAB DNA extraction protocol adapted by Doyle e Doyle (1987). Sequences were determined bi-directionally for at least two different amplicons using the BigDye

1 Embrapa Agroenergy, Brasília/DF – Brazil;

2 UFMG, Belo Horizonte/MG – Brazil;

3 UFBA, Vitória da Conquista/BA – Brazil;

4 UnB, Brasília/DF – Brazil;

5 Embrapa Pantanal, Corumbá/MS – Brazil;

6 Embrapa Swine and Poultry, Concórdia/SC – Brazil;

7 Embrapa Amazônia Oriental, Belém/PA – Brazil;

*s.ihadi@hotmail.com

Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit on the automated DNA sequencer ABI 3130. The *nuITS2* sequences were annotated and trimmed using the *ITS2 Annotation* tool available at ITS2 Database (KOETSCHAN et al., 2012). For similarity searches, the *rbcl* sequences were submitted to the Barcode of Life Data Systems (BOLD systems) using the *Plant identification* tool, while *nuITS2* sequences were submitted to BLASTN for comparisons against sequences deposited at Genbank.

Results and Conclusions

The *nuITS2* region could be successfully sequenced from DNA samples extracted from 47 strains (94,12% sequencing success rate) by using a pair of universal primers. On the other hand, primers described in the literature for the *rbcl* gene does not achieved a satisfactory success rate, thus novel sets of primers were designed. Two of the newly designed primer pairs could successfully amplify and sequence 82,35% and 50,98% of the dataset. The combination of the sequencing results obtained from these two *rbcl* primer pairs allowed the construction of quality consensus sequences (QV>20) for 49 samples (96,08% sequencing success rate). DNA from all 51 Embrapa|LBA strains could be amplified and sequenced for at least one of the markers tested. A total of 23 distinct *nuITS2* genotypes and 26 distinct *rbcl* genotypes were obtained. Similar levels of diversity were observed among *nuITS2* (0.482) and *rbcl* (0.461) sequences. In order to perform the molecular identification of Embrapa|LBA strains, the *rbcl* sequences obtained were submitted to similarity searches against the DNA barcoding dedicated database, BOLD systems. The closest matches retrieved for *rbcl* sequences ranged from 90% to 99% of similarity. Currently, there are very few *nuITS2* sequences from chlorophytes deposited at taxonomically curated databases such as BOLD, therefore similarity searches were performed against the GenBank. The closest matches retrieved for *nuITS2* sequences ranged from 81% to 100% of similarity. Of all Embrapa|LBA *nuITS2* and *rbcl* sequences, only 8 *nuITS2* sequences retrieved matches with 100% similarity. Embrapa|LBA strains retrieved matches from species that belong to the Chlorophyceae and Trebouxiophyceae classes, especially to the orders Chlamydomonadales, Chlorococcales, Sphaeropleales and Chlorellales. Noteworthy, 66% of the *nuITS2* matches retrieved from GenBank lacked the Latin binomial that characterizes the complete species name, compared to 10% of the *rbcl* matches retrieved from BOLD. The results reported so far indicate that 17 and 0 Embrapa|LBA strains can be unambiguously identified to the species level based on *nuITS2* or *rbcl* sequences, respectively. Since the closest *nuITS2* matches retrieved for strains Embrapa|LBA#2-3, #26, #30, #32-36 and #42-44 lack the Latin binomial that characterizes the complete species name, phylogenetic analysis using reference sequences from currently accepted *Chlorella*, *Micractinium* and *Desmodemus* species were conducted to check if it is possible to assign a specific Latin name to this samples. The results demonstrate that *nuITS2* sequences from these strains group

together with their closest matches in monophyletic clades, suggesting that they probably belong to species not formally described. The results presented here indicate that a dual marker DNA barcoding pipeline based on *nultS2* (primary marker) and *rbcL* (secondary marker) might be useful not only for green microalgae species identification, but also to assist new species discovery. Once available at its full potential, a DNA-based Chlorophyta identification method, together with its large-scale applications (e.g.: Metabarcoding), will bring considerable advances to areas such as biodiversity monitoring, water quality control and microalgae biotechnology.

Financial Support

Embrapa, CAPES and CNPq.

References

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, New Jersey, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.
- KOETSCHAN C. HACKL, T.; MULLER, T.; WOLF, M.; FORSTER, F.; SCHULTZ, J. ITS2 DATABASE IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Copenhagen, v. 63, n. 3, p. 585-588, 2012.

Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis

Táisa G. Gomes^{1,2*}, Antony Enis V. Machado¹; Ana Paula Araújo¹; Bruno Laviola¹; José Antonio A. Ribeiro¹; Raquel C. Bombarda¹; Cristiane V. Helm²; Simone Mendonça¹; Félix G. de Siqueira^{1,2*}

Introdução

Jatropha curcas (pinhão-manso) é uma oleaginosa promissora para produção de biodiesel, devido ao alto rendimento de óleo pela semente e adaptação a diversos tipos de solos e fatores ambientais. O resíduo gerado após a extração mecânica do óleo é chamado de torta (MENDONÇA; LAVIOLA, 2008), que tem em sua constituição fibras lignocelulósicas, proteínas (46-63%), lipídeos, carboidratos solúveis e minerais (MENDONÇA; LAVIOLA, 2008). A composição da torta de pinhão-manso torna este coproduto um potencial candidato para ser usado como suplementação animal, adubo orgânico e/ou insumo para produção de etanol de segunda geração (celulósico). Dentre estas possibilidades, seu uso como insumo para ração animal é a mais atrativa; no entanto, faz-se necessária a inativação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais que estão presentes nesta biomassa vegetal. Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos neste coproduto, cujos efeitos biológicos em animais dependem da estrutura molecular, podendo induzir respostas inflamatórias agudas e a formação de tumores (MENDONÇA; LAVIOLA, 2008; RIBEIRO et al., 2014).

Diversas estratégias químicas ou biológicas tem sido abordadas na tentativa de destoxificação da torta de pinhão-manso, com sucesso limitado em alguns casos (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013). Estudo prévios utilizando-se macrofungos em meio axênico indicaram grande potencial na produção de cogumelo comestível, associado à destoxificação do substrato (MENDONÇA; RIBEIRO, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo a destoxificação da torta de pinhão-manso por macrofungos visando a produção de dois possíveis produtos: a torta destoxificada que será destinada a ração animal e cogumelos comestíveis. A produção e consumo de macrofungos comestíveis (cogumelos) cresce a cada ano no Brasil de forma que a possibilidade de integração desta cadeia de alimentos, com a utilização de um coproduto da cadeia do

1 Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, Brasil;

2 Embrapa Florestas, Colombo-PR, Brasil

Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi Brasil

*taisa.gomes@colaborador.embrapa.br / felix.siqueira@embrapa.br

biodiesel e o uso do substrato pós-cultivo na cadeia de ração animal, torna esta solução tecnológica muito atrativa.

Métodos

A coleção de macrofungos utilizados nesse trabalho foi cedida pela Embrapa Florestas (Colombo-PR). O *screening* inicial do fungo foi realizado utilizando-se um meio de cultura à base de torta de semente de pinhão-manso (ágar-ágar + TPM 5%). O crescimento micelial foi medido a cada 24 h. Os fungos foram cultivados em frascos de 300mL com 100g de substrato (torta de pinhão-manso-TPM), e ajustou-se a umidade para 60%, para isso os substratos foram umedecidos com 70mL de água. Antes da inoculação do fungo, as amostras foram autoclavadas durante 1 h a 121°C. Após a esterilização os fungos selecionados foram então inoculados em 100 g de torta de pinhão-manso. Inoculou-se uma placa de petri com crescimento micelial completo (placas de petri 3 cm de diâmetro) para cada fungo, e foram incubados por 30 dias em estufa a 28 ± 2 °C. Após o término do período de cultivo o éster de forbol foi extraído das biomassas e analisado seguindo o protocolo desenvolvido na Embrapa Agroenergia (RIBEIRO et al., 2014). A partir desse resultado, o fungo mais efetivo na destoxificação foi cultivado em formulações contendo 80% de torta de pinhão-manso e resíduos lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, casca PM, serragem, pós cultivo *L. edodes*), com 60% de umidade, em sacolas de polipropileno de alta densidade (PEAD) com filtro. Os substratos ensacados foram autoclavados durante 2 horas a 121 °C, e inoculou-se 10 g de *spaw* (fragmentos miceliais). O cultivo durou 60 dias, 30 dias em temperatura ambiente e 30 dias em estufa climatizada (etapa de frutificação). Realizou-se a extração e quantificação dos ésteres de forbol da biomassa pós-cultivo dos macrofungos (Spent Mushroom Substrate-SMS) e nos cogumelos produzidos. Foram realizadas análises bromatológicas nos pós-cultivos (SMS) gerados.

Resultados e Conclusões

A seleção inicial dos fungos em meio de cultura à base de pinhão-manso se mostrou efetiva. A cepa EF-88 reduziu em 94 % a concentração de éster de forbol, após 30 dias de cultivo. Após 60 dias de cultivo, esta mesma cepa reduziu 99,5% da concentração inicial de ésteres de forbol nas formulações testadas. A frutificação do macrofungo selecionado (EF-88) ocorreu apenas em 4 das 6 formulações avaliadas neste trabalho. A eficiência biológica (razão entre a o peso de substrato seco e o peso de cogumelos frescos produzidos) ficou em torno de 25%, na formulação com adição de serragem. As análises bromatológicas do SMS da formulação TPM+serragem apresentaram aumento no teor proteico, FDN, FDA, celulose e hemicelulose; e redução dos teores de lignina e extrato etéreo quando comparados com a formulação inicial. SMS gerado nas 6 formulações testadas não sofreram perdas nutricionais importantes, pelo contrário o cultivo de EF-88 agregou valor a torta de

pinhão-manso em relação ao substrato não tratado. Em termos bromatológicos a torta de pinhão-manso destoxificada com o cultivo do macrofungo EF-88 poderá ser usada como suplementação na alimentação de animais, contudo antes dessa destinação, será necessária a validação biológica dessa destoxificação. O macrofungo selecionado demonstrou ser eficiente na degradação dos ésteres de forbol presentes na torta de pinhão-manso, e este resíduo apresentou potencial para ser usado como substrato para produção de cogumelos comestíveis e de enzimas de interesse biotecnológico. Os resultados obtidos até o presente momento são promissores, mostrando ser possível eliminar o componente tóxico desse substrato, juntamente com a produção viável de cogumelos comestíveis.

Apoio Financeiro

Finep (Projeto BRJATROPHA) CNPq (processo 404786/2013-8).

Referências

MENDONCA, S.; LAVIOLA, B. G. **Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 001).

MENDONCA, S.; RIBEIRO, J. A. de A. Desafios na destoxificação da torta de pinhão-manso. In: RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V. (Ed.). **Destoxificação e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona**: perspectivas em pesquisa, desenvolvimento e inovação. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 95-123. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 016).

RIBEIRO, J. A. de A.; FERREIRA, O. R.; MENDONCA, S.; ABDELNUR, P. V.; RODRIGUES, C. M. Desenvolvimento de método RP-UPLC-PDA para determinação de ésteres de forbol em *Jatropha curcas*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, 2014, Campos do Jordão. **Livro de resumos**. [S.l.]: AB Sciex, 2014. p. 207.

Fungos como agentes destoxicadores de torta de caroço de algodão (Gossipol)

*Ana Paula Fernandes Araujo^{*1,2}; Taísa Godoy Gomes^{1,2}; Antony Enis Virginio Machado¹; Aparecido A. Conceição¹; José Antônio de Aquino Ribeiro¹; Raquel Bombarda Campanha¹; Arailde F. Urben³; Simone Mendonça¹; Félix Gonçalves de Siqueira¹.*

Introdução

O algodoeiro (*Gossypium* spp) é cultivado primariamente para a produção de fibra e óleo, após a extração destes produtos são gerados subprodutos como torta ou farelo (dependendo da metodologia empregada na extração) do caroço de algodão. A disponibilidade do caroço e do farelo de algodão no mercado e características nutricionais de interesse para ração animal, como teor energético e proteico, têm estimulado pecuaristas a adotarem este insumo nas dietas de ruminantes (ROMERO, 2013). No entanto, um fator limitante na utilização desse subproduto na alimentação de animais monogástricos é a presença do gossipol, um composto antinutricional.

O gossipol é um composto polifenólico, de coloração amarelada, presente em várias partes do algodão. A função deste componente na planta é a proteção contra ataques de insetos (KONG, 2010). O gossipol é altamente tóxico para animais monogástricos, enquanto que poligástricos toleram uma determinada concentração, dependendo do tipo de animal e idade. Por essa razão, atualmente, a torta/farelo de algodão é comercializada apenas como ração para ruminantes (bovinos, caprinos e ovinos). Os efeitos do gossipol são cumulativos, e podem surgir abruptamente após um período variável de ingestão (ABDURAKHIMOV et al, 2009; CHEEKE, 1998; MCCAUGHEY, 2005).

Os fungos são microrganismos eucariotos e saprófitos, portanto, possuem um arsenal enzimático capaz de desconstruir parte ou toda a parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina). Estes microrganismos estão sendo aplicados em diversos setores industriais, como alimentação humana e animal, biorremediação, biodestoxificação e produção de enzimas. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de fungos (coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia) como agentes desconstrutores (ação enzimática) e destoxicadores de estruturas e biomoléculas presentes na torta do caroço de algodão.

1 Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil;

2 Programa de pós-graduação em Biotecnologia, nível de mestrado, Universidade Federal do Tocantins2, Gurupi/TO;

3 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília/DF, Brasil

*anapaula.araujo@colaborador.embrapa.br; felix.siqueira@embrapa.br

Métodos

O trabalho foi dividido em duas etapas de cultivo, variando a escala de produção, onde o primeiro cultivo foi feito em placa de petri (20 ml de meio de cultivo, com 100 g torta de caroço de algodão para 1000 ml de água destilada) e o segundo utilizando 100 g da torta (massa seca, umedecido a 60%) em frascos de vidro (tipo Erlemeyes). Etapa 1: os fungos, 36 espécies diferentes, foram inoculados (um disco de 5 mm) no meio Agar-Torta de Caroço de Algodão (ATCA) e incubados em estufas ventiladas a 28°C por até 15 dias, para avaliar a capacidade de crescimento micelial (mm/dia). Na segunda etapa, os fungos com melhor desempenho no crescimento micelial (fase de triagem) foram cultivados em frascos de vidros contendo 100 g de torta de caroço de algodão (TCA), sem acréscimo de quaisquer outras fontes nutricionais e umidade de 60%. Os cultivos ocorreram nas mesmas condições de crescimento da primeira etapa, por período de tempo estendido para 30 dias. Os teores de gossipol foram determinados junto aos tratamentos biológicos (Fungos) que apresentaram colonização total e/ou melhor crescimento micelial na torta de caroço de algodão. A ação para avaliar a concentração de gossipol junto a biomassa vegetal pré-tratada pelos fungos ocorreu por análises de amostras em UPLC (*ultra performace liquid chromatography*), por um método em validação pelo Laboratório de Química de Biomassa (Embrapa Agroenergia).

Resultados e Conclusões

Os resultados de crescimento micelial mostram que os fungos F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, F13, F14, F15, F16, F17 e F18 foram capazes de crescer no meio ATCA. O F14 foi o que apresentou melhor resultado com 6,83 mm/dia. Enquanto que os fungos de F19 à F25 não foram capazes de crescer no meio ATCA. Os demais (F26 a F36) apresentaram crescimento lento e/ou parcial, não sendo capaz de colonizar todo meio de cultivo contido nas placas de petri. Na etapa seguinte, quando os cultivos fungicos foram escalonados para frascos (100 g TCA), os fungos F1, F2, F3 e F4 não se desenvolveram. No entanto, os fungos F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, F13 e F14, colonizaram todo meio de cultivo em até 20 dias, sendo possíveis candidatos a agentes biotransformadores do gossipol, contido na TCA. No entanto, a colonização total da TCA por estes fungos não implicam que o gossipol fora totalmente biotransformado ou biodestoxificado.

A confirmação se estes fungos são agentes destoxificadores de gossipol será umas das etapas avaliada por meio da determinação das concentrações dos teores desta molécula e posterior análises toxicológicas utilizando ensaios biológicos com *Artemenia salina* e roedores (rações). Os resultados dos teores de degradação de gossipol ainda precisam ser analisados e avaliados quanto a divulgação pública ou não, após os ensaios toxicológicos.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 404786/2013-8.

Referências

ABDURAKHIMOV, R. S. VESHKUROVA, O. N.; UZBEKOV, V. V.; ARZANOVA, I. A.; SULTANOVA, E. M.; SALIKHOV, S. I. Effect of cotton-seed biocidal peptides and gossypol on resistance to biotic factors. **Chemistry of Natural Compounds**, New York v. 45, n. 2, p. 213-216, 2009.

CHEEKE, P. R. **Natural toxicans in feeds, forages, and poisonous plants**. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479 p.

KONG, G.; DAUD, M. K.; ZHU, S. Effects of pigment glands and gossypol on growth, development and insecticide-resistance of cotton bollworm (*Heliothis armigera* (Hübner)). **Crop Protection**, Lincoln, v. 29, p. 813-819, 2010.

MCCAUGHEY, K. M.; DEPETERS, E. J.; ROBINSON, P. H.; SANTOS, J. E. P.; PAREAS, J. W.; TAYLOR, S. J. Impact of feeding whole Upland cottonseed, with or without cracked Pima cottonseed with increasing addition of iron sulfate, on productivity and plasma gossypol of lactating dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, n. 3-4, p. 241–256, 2005.

ROMERO, A. C. **Resíduos da produção de biodiesel: Avaliação de moléculas bioativas e potencial de aplicação na alimentação animal**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

Engenharia metabólica de *Pichia pastoris* para produção de ácido glicérico

Talita G. S. Ramos^{1,2*}; Fernanda Justen^{1,2}; João R. M. Moreira².

Introdução

A produção de biodiesel aumentou consideravelmente no mundo, passando de 4 milhões de m³ para 19 milhões de m³ entre 2005 e 2010. Como a produção de biodiesel resulta na formação de glicerina bruta na proporção de 10:1 m³ a valoração desse coproduto é de importância para a economicidade da cadeia produtiva. Desta forma tem sido proposta a conversão da glicerina por rota microbiana a produtos químicos com maior valor agregado (ALMEIDA et al., 2012). A glicerina pode ser convertida a ácido glicérico, o qual pode ser utilizado em indústrias químicas, farmacêuticas e na produção de polímeros e surfactantes (HABE et al., 2009a). A produção de ácido glicérico se dá pela oxidação da glicerina por desidrogenases. Desidrogenases não são enzimas altamente específicas, podendo oxidar diferentes substratos (HABE et al., 2009b).

Neste trabalho, novas glicerol desidrogenases foram identificadas por análises filogenéticas e utilizadas para construir linhagens de *Pichia pastoris* capazes de produzir ácido glicérico.

Métodos

Genes codificantes de glicerol desidrogenase GDH foram identificados com base em análises filogenéticas de sequências disponíveis no banco de dados NCBI. Para tanto, sequências de enzimas previamente descritas foram utilizadas como padrão em alinhamentos na base de dados. Posteriormente, as sequências obtidas foram utilizadas para construção de árvores filogenéticas, a partir das quais genes de interesse foram selecionadas para síntese. Os genes CC, AP e BS foram sintetizados e depois clonados no vetor de expressão pGAPZB, gerando os plasmídeos pGAP-CC, pGAP-AP, pGAP-BS. Cada um dos plasmídeos foi linearizado com a enzima de restrição *Pme I* e utilizado para transformar *P. pastoris* X-33. Transformantes positivos foram selecionados e a produção de ácido glicérico avaliada em fermentações contendo glicerol. O ácido glicérico produzido foi identificado e quantificado por cromatografia líquida.

1 Universidade de Brasília Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900;

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*talitagabrielasr@gmail.com; joao.almeida@embrapa.br

Resultados e Conclusões

Os genes de glicerol desidrogenase CC, AP e BS foram identificados por análises filogenéticas. Após síntese, três genes foram clonados no vetor de expressão pGAPZB para *P. pastoris*. Posteriormente, os plasmídeos com os genes de interesse foram transformados na levedura, gerando linhagens capazes de produzir ácido glicérico. Fermentações em condições aeróbicas demonstraram a eficiência das linhagens construídas de produzirem ácido glicérico.

Apoio Financeiro

CNPq ,CAPES e Embrapa Agroenergia

Referências

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, n. 48, p. 1-16, 2012.

HABE, H.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; SAKAKI, K. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 3, p. 445–452, 2009a.

HABE, H.; SHIMADA, Y.; YAKUSHI, T.; HATTORI, H.; ANO, Y.; FUKUOKA, T.; KITAMOTO, D.; ITAGAKI, M.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H.; MATSUSHITA, K.; SAKAKI, K. Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 75, n. 24, p. 7760–7766, 2009b.

Proteases e fitases de macrofungos cultivados em meio submerso com tortas de pinhão-manso ou caroço de algodão como fonte de carbono

Thaís D. D. Santana¹; Thaís Demarchi Mendes; Pérola O. Magalhães²; Simone Mendonça¹; Félix G. de Siqueira¹.

Introdução

Os óleos vegetais podem ser matrizes para obtenção de biodiesel. No País, existem diversas espécies vegetais cujos frutos e grãos possuem óleos. Devido a rápida expansão, nos últimos anos, da demanda mundial tanto por biocombustíveis quanto por produtos obtidos de fontes renováveis se tornou preciso aproveitar, de maneira racional, os potenciais regionais brasileiros para a produção de biocombustíveis, considerando tanto as culturas tradicionais como, por exemplo, a do algodão (*Gossypium hirsutum*), quanto as culturas de novas oleaginosas, como o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (LAVIOLA; ALVES, 2011). Contudo, as tortas e farelos, subprodutos da extração de óleos dessas fontes, possuem algumas limitações e podem ser usados apenas após passar por modificações. Uma forma de viabilizar a utilização destes subprodutos é realizar tratamentos, que podem ser físicos, químicos e biológicos. Outro desafio mundial se encontra na produção de rações animais pois quase sempre é preciso melhorar o valor nutricional dos ingredientes e manipular as condições existentes no trato digestivo (KUMAR et al., 2012).

Desta forma a utilização de enzimas exógenas na nutrição de monogástricos auxilia na solução de alguns problemas, sendo que, seu uso tem se tornado cada vez mais comum na atualidade (MONTEIRO et al., 2012). Esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas pelas atividades enzimáticas para de proteases e fitases de dois macrofungos quando cultivados em meio submerso com fontes de carbono e nitrogênio sendo as tortas provenientes da extração de óleos.

Métodos

Os cultivos foram realizados com os macrofungos EF87 e CC400 da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia. Estes foram cultivados em meio com 5 g de torta de pinhão-manso, no caso do EF 87, e 5 g torta de caroço de algodão no caso do CC400, ambos acrescidos de 95 mL de água destilada. Após a esterilização foram inoculados o

1 Embrapa Agroenergia, , Brasília/DF, Brasil;

2 Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília – UnB, Brasília/DF.

*thaís.santana@colaborador.embrapa.br; felix.siqueira@embrapa.br

5 discos de 10 mm diâmetro de micélio dos respectivos macrofungos, que foram então dispostos em estufas ventiladas com temperatura constante de 28°C e agitação de 150 rpm. As duplicatas biológicas foram avaliadas quanto as atividades para proteases e fitases a cada dois dias durante 14 dias de cultivos. O líquido fermentado filtrado foi chamado de extrato bruto e dele as atividades enzimáticas. As atividades enzimáticas para proteases e fitases foram realizadas a partir dos extratos brutos utilizando as respectivas metodologias estabelecidas. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos, sendo expressa em U ml⁻¹ enquanto, unidade de atividade de fitase foi definida como a quantidade de extrato bruto que foi capaz de liberar 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto.

Resultados e Conclusões

As duas linhagens macrofungos testadas, nas condições estabelecidas, desenvolveram-se e apresentaram as atividades enzimáticas para fitases e proteases. Os melhores resultados obtidos foram para a produção de enzima protease. Os extratos brutos obtidos do fungo CC400, cultivado em meio nutrico com torta de algodão, apresentando 215,0 U.ml⁻¹ de atividade de protease e 4,14 U.ml⁻¹ de atividade de fitase máximas, no 3° dia. Por outro lado, os extratos brutos do fungo EF 87, *quando cultivados no meio com torta de pinhão-manso*, apresentaram atividades máximas para proteases e fitases de 850,0 U.ml⁻¹ e 4,04 U.ml⁻¹ no 14° dia, respectivamente. Os dois macrofungos testados em cultivos submersos contendo tortas oleaginosas mostraram resultados promissores para produção de extratos brutos enzimáticos com atividades para proteases e fitases. A purificação parcial e caracterização quanto ao pH, temperatura, termoestabilidade são as próximas etapas da pesquisa. A concentração das amostras pode ser realizada empregando-se métodos de precipitação proteica, utilizando-se sal (sulfato de amônia) ou solventes orgânicos (etanol ou acetona). Sistemas contendo duas fases líquidas em equilíbrio termodinâmico são muito úteis para aplicações em extração e/ou purificação de biocompostos (proteínas, enzimas, células, vírus, organelas) presentes em inúmeros processos tecnológicos. Os extratos concentrados podem então serem purificados em sistema bifásico aquoso polímero-polímero (NaPa/PEG) com delineamento experimental e protocolo adequados as características das proteínas de interesse nos extratos obtidos.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 404786/2013-8.

Referências

LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Matérias-primas oleaginosas para biorrefinarias. In: VAZ JUNIOR, S. (Ed.). **Biorrefinarias: cenários e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 29-43.

KUMAR, V.; AKINLEYE, A. O.; MAKKAR, H. P. S.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Hoboken, v. 96, n. 1, p. 37-46, 2012.

MONTEIRO, S. P.; MELO, R. R. de.; TAVARES, M. P.; FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; PEREIRA, O. L.; REZENDE, S. T. Otimização da produção, caracterização e avaliação da fitase de *Rhizopus stolonifer* na hidrólise. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.18, n. 2-4, p.117-132, 2012.

Cellulolytic and accessory enzymes from brazilian microbiota for biomass deconstruction

Ana C. Bitencourt^{1*}, Gustavo C. Portela^{1,2}, Betúlia M. Souto¹, Ohana Y. A. Costa¹, Léia C. L. Fávoro¹, Thaís D. Mendes¹, Dasciana S. Rodrigues¹ and Betania F. Quirino¹

Background

With the increasing global demand for fuels and materials from petroleum, sustainable alternatives are essential to minimize the environmental impact. To complement the growing worldwide demand and reduce the environmental impact of oil exploration, research is being developed. Agro-industrial residues such as sugarcane bagasse can be converted to fermentable sugars. However, the cellulose-hemicellulose-lignin matrix present in biomass is highly recalcitrant and thus the cellulose and hemicellulose present in it are not efficiently converted to sugars by enzymes only. Because of this, a pre-treatment of the lignocellulosic material is commonly used to disrupt the crystal structure, facilitating the access of enzymes that will act on the biomass. The use of enzymes in the lignocellulosic biomass saccharification process is considered more sustainable technology for second-generation ethanol (HORN et al., 2012). The bioconversion of these materials into sugars require not only cellulases but also auxiliary enzymes, for example, lytic polysaccharide monoxygenases (LPMO). These enzymes carry out oxidative cleavage of cellulose and hemicellulose (AGGER et al., 2014.), and now the degradation of these polysaccharides must be considered a hydrolytic and oxidative process (AGGER et al., 2014). In this context, the aim of this study was to characterize enzymatically and molecularly cellulolytic fungi, and evaluate a metagenomic library aiming to discover auxiliary and cellulolytic enzymes for lignocellulosic biomass degradation.

Methods

Enzymatic assays (adapted from GHOSE, 1987) targeting activities FPase, β -glucosidase, endoglucanase and exoglycanase were performed for both fungi isolates, the CBF13 come from Cerrado soil and the 147, endophytic of sugarcane. To accomplish the production of enzymes, it was used Mandel's culture medium (MANDELS; WEBER 1969), with modifications, because the carbon source has been or Avicel[®], or bagasse sugarcane *in natura* and pre-treated, or elephant grass *in natura* and pre-treated, or lactose; all at a

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final) – Asa Norte, Brasília/DF, Brasil, 70770-901

2 Universidade Católica de Brasília, QS 07, Lote 01, EPCT, s/n- Águas Claras, Brasília/DF, Brasil, 71966-700

*ana.araujo@embrapa.colaborador.br

concentration of 1%. The genomic DNA of the fungi was extracted according to the protocol suggested by Cenis (1992). The coding regions ITS1-5.8S-ITS2 and β -tubulin for filamentous fungi were amplified and sequenced, thereby the microorganisms were properly identified by comparing the sequences deposited in GenBank. The isolate CBF13 were also identified by the BIOLOG[®] system. In order to identify a filamentous fungus monooxygenase a PCR was performed on isolated CBF13. Degenerated primers focused on phyla Firmicutes and Bacteroidetes were constructed with the intention of amplifying bacterial LPMO enzymes in metagenomic library goat rumen. Furthermore, a bacterial LPMO from *Thermobifida fusca* YX already described in literature and named E7 (MOSER et al., 2008) was synthesized (Life-Technologies) in order to be used as a model test of the activity of this accessory enzyme (LPMO). This enzyme was expressed in the pET21 α + vector using *E. coli* BL21 DE3, Tuner DE3, Rosetta blue DE3, Pelac I and BL21 DE3 pLIS S strains as a host cell. Then three clones out of each host cell were selected and expressed in a small scale. An electrophoresis SDS PAGE gel was performed and the best clones selected for expression on a large scale to purify the enzyme and then perform enzymatic assays.

Results and Conclusions

FPase and endoglucanase activities were the highest ones for both fungi. Therefore, if it were to be done an enzymatic cocktail from these isolates based on these assays, it is possible to determine that the best substrate to obtain the highest endoglucanase activity is lactose. Although to obtain FPases and β -glucosidases for both isolates, the best substrate is elephant grass and to obtain exoglucanases the best substrate is Avicel[®] to isolate CBF13. From the analysis of the ITS region and the gene encoding the β -tubulin was possible to determine that these isolates belong to the phylum Ascomycota, eurotiomycetes class, Eurotiales order and Aspergillaceae family. Despite all belong to the same family, they don't belong to the same genera, isolate 147 is an *Aspergillus fumigatus*, a human pathogen; and isolate CBF13 is a *Penicillium citrinum*, a ubiquitous fungi. The biochemical identification method Biolog is a good tool for identification of fungi, ranking isolated CBF13 correctly as belonging to the genus *Penicillium*. Apart from cellulases, another important class of enzymes to the biomass deconstruction are the copper dependent accessory enzymes that include monooxygenases. Isolated CBF13 has a copy of a fungal monooxygenase similar to other *Penicillia* LPMO, it is therefore possible to invest in studies of this accessory enzyme. From three different methods was reached the same identification of the isolated CBF13. To identify bacterial LPMO a screening in a small inserts metagenomics library from rumen goat was performed, these primers were tested in individuals of the Bacillales order and metagenomics goat rumen library, obtaining no success amplifying any bacterial LPMO. An SDS PAGE gel was performed showing the clones that better expressed the synthetic LPMO E7.

Financial Support

CNPq and Embrapa supported this work with project grants.

References

AGGER, J. W.; ISAKSEN, T.; VARNAL, A.; VIDAL-MELGOSA, S.; WILLATS, W. G. T.; LUDWIG, R.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H.; WESTERENG, B. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.

CENIS, J. L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 2380, 1992.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxon, v. 59, n. 2, p 257-268, 1987.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 5, artigo 45, 2012.

MOSER, F.; IRWIN, D.; CHEN, S. L.; WILSON, D. B. Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 100, n. 6, p. 1066-1077, 2008.

Engenharia Metabólica de *Pichia pastoris* para Produção de Ácido Xilônico

Fernanda Justen^{1,2*}, Talita G. S. Ramos^{1,2}, João R. M. de Almeida²

Introdução

A crise energética e as pressões ambientais tem gerado interesse industrial pela biomassa lignocelulósica como fonte de matéria-prima renovável, devido às suas aplicações para a produção de combustíveis e produtos químicos (LI et al., 2015). A biomassa vegetal é composta de lignina, celulose e hemicelulose, e quando hidrolisada, pode liberar uma fração substancial de xilose. A xilose é uma pentose, principal componente da hemicelulose, podendo ser oxidada em ácido xilônico e convertida em etanol ou reduzida ao xilitol (TOIVIARI et al., 2013). Segundo Werpy e Petersen (2004) o ácido xilônico é um dos produtos químicos desejáveis de ser produzido a partir de açúcares. Ele pode ser utilizado na indústria como agente de complexação ou quelante, na agricultura, indústria alimentícia e produtos farmacêuticos. A conversão da xilose em ácido xilônico é realizada pela enzima xilose desidrogenase (XDH). Alguns microrganismos não conseguem utilizar a xilose como única fonte de carbono, sendo a levedura *Pichia pastoris* um desses (INAN et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo construir linhagens recombinantes de *P. pastoris* capazes de produzir ácido xilônico.

Métodos

A partir de um screening de sequências gênicas depositadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), possíveis genes codificantes para xilose desidrogenase (XDH) foram selecionados e sintetizados. Os genes nomeados *AM*, *CO*, *TM* foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xba* I e ligados ao vetor integrativo pGAPZ B previamente digerido com as mesmas enzimas. *Escherichia coli* XL10-Gold foi transformada e clones carregando os plasmídeos positivos pGAP-AM, pGAP-CO e pGAP-TM foram obtidos. Os plasmídeos foram linearizados com Sac II e posteriormente utilizados para transformar a linhagem X33 de *P. pastoris*. Os transformantes foram selecionados por resistência à ZeocinaTM e pela integração do gene via PCR.

1 Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília/DF, Brasil, 70910-900;

2 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

*fernanda.justen@colaborador.embrapa.br; joão.almeida@embrapa.br

Resultados e Conclusões

Os genes *AM*, *CO*, *TM* codificantes para XDH foram clonados no plasmídeo pGAPZB em *E. coli*, obtendo os plasmídeos recombinantes pGAPZ B-AM, pGAPZ B-CO e pGAPZ B-TM. A confirmação da construção destes plasmídeos recombinantes foi realizada empregando-se a digestão com as enzimas de restrição Eco RI e XbaI, resultando na liberação dos genes *AM*, *CO* e *TM* e linearização dos plasmídeos. Após a construção, os plasmídeos foram linearizados e transformados em *P. pastoris*. Linhagens expressando os genes *AM*, *CO*, *TM* foram selecionadas. Finalmente, as linhagens foram crescidas e a produção de ácido xilônico foi avaliada em cultivos de frascos. A produção de ácido xilônico foi positiva para uma linhagem obtida com rendimentos acima de 50% do máximo teórico.

Apoio Financeiro

Este trabalho é financiado pela Embrapa, CAPES, CNPq.

Referências

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOXI) promoter of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Malden, v. 92, n. 6, p. 585-589, 2001.

LI, P.; SUN, H. B.; CHEN, Z.; LI, Y.; ZHU, T. C. Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 14, artigo 22, 2015.

TOIVARI, M.; VEHKOMAKI, M. L.; NYGARD, Y.; PENTTILA, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 133, p. 555-562, 2013.

WERPY, T.; PETERSEN, G. (Coord.). **Top value added chemicals from biomass: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. Oak Ridge: U.S. Department of Energy, 2004. 76 p.

Avaliação da diversidade microbiana do processo de produção de etanol de cana-de-açúcar por meio de abordagem independente de cultivo

Ohana Y.A. Costa^{1}; Betúlia M. Souto¹; Daiva D. Tupinambá²; Jessica C. Bergmann³; Ricardo H. Kruger⁴; Cynthia M. Kyaw³; Cristine C. Barreto⁵; Betania F. Quirino¹*

Contexto

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar e o segundo maior produtor de etanol. Embora o processo de produção de etanol esteja bem estabelecido, melhorias sempre podem ser implementadas. A produção industrial de etanol não ocorre sob condições estéreis, logo a presença de microrganismos contaminantes é esperada e tolerada. Porém, esses microrganismos podem diminuir a produtividade por meio de competição pelos nutrientes necessários para a fermentação e o crescimento da levedura, assim como podem produzir ácidos orgânicos que inibem seu metabolismo. Além disso, produzem gomas, promovem floculação e sintetizam toxinas que inibem o crescimento das leveduras e diminuem sua viabilidade. A maioria dos trabalhos que caracterizaram microrganismos contaminantes do processo de produção do etanol utilizam técnicas de microbiologia clássica, e, embora técnicas independentes de cultivo tenham sido utilizadas para a descrição de contaminantes de diferentes processos industriais, ainda não foram empregadas para o estudo dos contaminantes presentes no processo de produção de etanol.

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade microbiana em seis etapas da produção industrial de etanol utilizando técnicas independentes de cultivo.

Métodos

Amostras triplicadas de seis estágios da produção de etanol foram coletadas: caldo da cana crua, caldo misto, caldo clarificado, caldo evaporado, mosto e vinho. O DNA total das amostras foi extraído com o FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) e usado para a amplificação do gene que codifica o RNA ribossomal 16S dos domínios *Bacteria* e *Archaea* com os pares de primers 27F-519R (domínio *Bacteria*), 109F-915R (domínio *Archaea*) e

1 Embrapa-Agroenergia, Brasília, DF, Brasil

2 Embrapa Sede, Brasília, DF, Brasil

3 Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brasil.

4 Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brasil.

5 Programa de Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, DF, Brasil

*Ohana.costa@colaborador.embrapa.br; betania.quirino@embrapa.br.

região ITS (Espaçador Interno Transcrito) do reino Fungi com o par de primers ITS1f-ITS4R. Os amplicons foram purificados e enviados para pirosequenciamento utilizando a plataforma GS FLX Titanium. As sequências foram analisadas utilizando o pacote de softwares Mothur (SCHLOSS et al., 2009), com o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013) para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, e o banco de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2013) para o reino Fungi.

Resultados e Conclusões

O pirosequenciamento demonstrou a presença, em todas as amostras juntas, de 355 gêneros para o domínio *Bacteria*, 22 para o domínio *Archaea* e 203 para o reino Fungi. Análises das sequências bacterianas mostraram que as mudanças na comunidade estão relacionadas a aumentos de temperatura em determinados estágios do processo de produção de etanol. Após a fermentação, *Lactobacillus* e *Lactobacillaceae* não classificados perfazem aproximadamente 100% das sequências. Para o reino Fungi, assim como para *Archaea*, foram obtidas sequências apenas para o caldo da cana crua e o caldo misto. Os grupos predominantes de Fungi identificados foram Fungi não classificados, *Meyerozima* e *Candida*. Para *Archaea*, o grupo predominante identificado foi Thaumarchaeota não classificados. A Cobertura de Good demonstrou que o número de sequências obtidas para o caldo evaporado, mosto e vinho foram suficientes para cobrir a diversidade bacteriana nas amostras, assim como cobriu a diversidade de *Archaea* e Fungi no caldo da cana crua e no caldo misto. Porém, a diversidade bacteriana não foi coberta nas amostras de caldo da cana crua, caldo misto e caldo clarificado, o que evidencia que a diversidade de bactérias nas amostras é maior do que o esperado. Esse foi o primeiro trabalho a caracterizar a diversidade de *Bacteria*, *Archaea* e Fungi associados com o processo de produção de etanol a partir de cana de açúcar no Brasil por meio de técnicas independentes de cultivo.

Apoio Financeiro

O projeto foi financiado por Embrapa, CNPq e FAP-DF.

Referências

KÖLJALG, U.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; TEDERSOO, L.; TAYLOR, A. F. S.; BAHRAM, M.; BATES, S. T.; BRUNS, T. D.; BENGTSOON-PALME, J.; CALLAGHAN, T. M. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 22, n. 21, p. 5271–5277, 2013.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLOCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J. Introducing mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

Avaliação comparativa da capacidade fermentativa de leveduras consumidoras de xilose

Henrique C. T. Veras^{1,2*}, Nádia S. Parachin², Gabriel R. Fernandes³, João Ricardo M. de Almeida¹

Introdução

A biomassa lignocelulósica é uma das fontes de energia renovável para a produção de etanol (JEFFRIES, 2006). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui capacidade para consumir carboidratos, como a glicose, presentes nesta matéria prima e convertê-los até etanol (ALMEIDA, et al., 2011). Embora esse processo fermentativo seja bem estabelecido apenas para hexoses (açúcares de 6 carbonos), aproximadamente 25% da biomassa lignocelulósica é composta por hemicelulose, parte da biomassa que possui significativa concentração de pentoses, especialmente xilose (SASSNER; ZACCHI, 2008). A conversão de xilose até etanol realizada por microrganismos tem potencial para aumentar em até 40% a produção de etanol de segunda geração.

Assim, o objetivo deste trabalho é investigar a capacidade fermentativa e a atividade metabólica das leveduras *Candida tenuis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum* para produção de etanol a partir de xilose.

Métodos

O crescimento e a capacidade de fermentação dessas leveduras foram avaliados em meio mínimo suplementado com 40g/L de xilose, em condições aeróbicas e microaeróbica. Amostras foram coletadas para monitoramento do crescimento celular, consumo do substrato e formação de produtos em intervalos regulares durante a fermentação. Na fase exponencial de crescimento foram coletadas amostras de extrato celular para avaliar a atividade das enzimas XR, XDH e XK. As atividades foram medidas seguindo-se Smiley e Bolen (1982). O desempenho fermentativo das quatro leveduras também foi analisado em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Em paralelo, um modelo descritivo das vias de conversão de xilose a etanol dessas leveduras foi montado utilizando-se de ferramentas de bioinformática, como o banco de dados KEGG e o visualizador de mapas metabólicos IPATH (Qi et al., 2014).

1 EMBRAPA Agroenergia (Parque Estação Biológica – PqEB s/n°. W3 Norte Final- Brasília – DF, Brasil, 70770-901).

2 UnB- Universidade de Brasília (Campus Universitário Darcy Ribeiro, IB- Brasília – DF, Brasil, 707910-900),

3 FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou (Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto – Belo Horizonte – MG, Brasil, 30190-002). *henrique.veras@colaborador.embrapa.br; joao.almeida@embrapa.br

Resultados e Conclusões

Entre as leveduras fermentadoras de xilose, *S. stipitis* e *S. passalidarum* destacaram-se por apresentar melhor taxa de consumo de xilose e crescimento (OD_{600} de 19.4 e 16.8, respectivamente). Na condição aeróbica, as leveduras avaliadas apresentaram crescimento duas vezes maior e demandaram menos tempo para alcançar o crescimento (OD_{32} ; 30; 21 e 16). Nas fermentações microaeróbicas, realizadas pelas leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum*, foi observada maior concentração final de etanol, cerca de 10g/L. Quando foi realizada a fermentação em hidrolisado, essas leveduras também mostraram melhor consumo de xilose, porém a taxa de crescimento e a concentração de etanol diminuíram. Em geral, observamos que os resultados das fermentações realizados em hidrolisados são semelhantes aos resultados obtidos em meio mínimo, destacando *S. stipitis* e *S. passalidarum* como as melhores fermentadoras de xilose. As atividades enzimáticas da xilose reductase e da xilitol desidrogenase dependentes de NAD(P)H em extratos celular foram medidas. A atividade específica para as enzimas de cada levedura mostraram-se variáveis, especialmente de acordo com o cofator utilizado. Baseando-se nos substratos e produtos da via de conversão da xilose, os EC numbers das enzimas foram obtidos e utilizados na montagem da via de conversão de xilose até etanol. Esses resultados, permitiram a modelagem do metabolismo de xilose nessas leveduras. Adicionalmente, novos alvos moleculares poderão ser identificados, na tentativa de melhorar a fermentação de pentoses e produção de bioetanol.

Apoio Financeiro

O projeto é apoiado pela EMBRAPA, CAPES e CNPq.

Referências

- ALMEIDA, J. R. M.; RUNQUIST, D.; SÀNCHEZ I NOGUÉ, V.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, Hoboken, v. 6, n. 3, p. 286-299, 2011.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.
- QI, Q.; LI, J.; CHENG, J. Reconstruction of metabolic pathways by combining probabilistic graphical model-based and knowledge-based methods. **BMC Proceedings**, London, v. 8, suppl. 6, n. S5, p. 1-10, 2014.
- SASSNER, P.; ZACCHI, G. Integration options for high energy efficiency and improved economics in a wood-to-ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 4, p. 1-11, 2008.
- SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xilose reductase and D-xilitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, London, v. 4, n. 9, p. 607-610, 1982.

Evolutionary engineering as strategy to improve xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*

Bárbara G. Paes^{1,2}, Lidia Maria Pepe Moraes², João Ricardo Moreira Almeida¹

Background

The increasing demand for sustainable energy drives the development of biotechnological strategies for the production of fuels and chemicals from renewable resources, and the development of biorefineries (PAES; ALMEIDA, 2014). In this context, lignocellulosic biomass is an essential feedstock for the production of second generation biofuels, especially being considered for bioethanol production (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2015). Biomass utilization is especially advantageous because it does not compete with food crops and does not require the increase of farmlands. Biomass is mainly composed of three parts: cellulose, hemicellulose and lignin. The first two components are formed by polymers of pentose and hexose sugars (SAHA, 2004) which can be converted by microorganisms into bioethanol. The yeast *S. cerevisiae*, the main organism utilized in the industrial production of bioethanol, is unable to use pentoses, such as xylose (GONG et al., 1983), which is the second most abundant sugar in some biomasses. Thus, several strategies have been employed to genetically engineer this yeast for xylose utilization. In this work, new *S. cerevisiae* strains able to ferment xylose were obtained employing genetic and evolutionary engineering strategies. The strains obtained were characterized genetically and physiologically.

Methods

The *Piromyces sp.* xylose isomerase (XI) encoding gene was amplified by PCR using gene specific primers and the plasmid pRH218, which carries the *xylA* gene (HECTOR et al., 2011). The gene was cloned in the episomal plasmid p424 (MUMBERG et al., 1994), under the expression of GPD1 promoter. In addition, the endogenous gene coding for *S. cerevisiae* xilulokinase (XK) was cloned in the episomal plasmid p426 (MUMBERG et al., 1994). The laboratory strains of *S. cerevisiae* CEN.PK 113.14A $\Delta trp1-289$ (L2) and CEN.PK 113.3C $\Delta trp1-289$, $\Delta ura-52$ (L7) were transformed with the constructed plasmids. Thus, recombinant strains of *S. cerevisiae* expressing solely XI (L2XI), or in combination with XK (L7XIXK) were obtained. A third strain, L7XI Φ , expressing XI and carrying an empty plasmid

1 Embrapa Agroenergia (Parque Estação Biológica W3 Norte, 70770-901 Brasília – DF),

2 UNB – Universidade de Brasília (Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília – DF) barbara.paes@colaborador.embrapa.br

was constructed as control. The obtained strains L2XI, L7XIΦ and L7XIXK underwent a conditioning process in selective medium with xylose as sole carbon source. The strains obtained after conditioning processes were then submitted to a curing process, in order to remove the plasmids initially introduced in rich medium supplemented with tryptophan. After curing, the strains were once again transformed with the same plasmids in order to investigate if changes observed in the conditioned strains were conserved or disappeared as a result of the removal of the episomal plasmids. Physiological characterization of the obtained strains was performed in minimal medium supplemented with xylose in flasks and in bioreactor fermentations.

Results and Conclusions

Three recombinant strains of *S. cerevisiae* expressing solely XI from *Piromyces sp.* (L2X and L7XIΦ) or in combination with endogenous XK (L7XIXK) from *S. cerevisiae* were obtained by genetic engineering. Among these three, the L7XIXK strain presented better fermentative rates of xylose aerobically than the other two, confirming the positive effect of XK overexpression. To improve fermentation capability of L2, L7XIΦ and L7XIXK strains, they were submitted to a conditioning process on minimal medium containing xylose. After conditioning, single adapted isolates were obtained and compared with the original strains. Results clearly demonstrated that the adapted strains presented shorter lag growth phase, increased growth rate, xylose consumption (1,8 to 18,5 fold) and ethanol yield (47% for L7XIXK). The performance of the strains was also investigated under anaerobic conditions, which showed significant improve in xylose fermentation for conditioned strains. These conditioned strains were submitted to the curing process for the plasmid removal. The strain LC7 was obtained from L7XIXK curing process and its incapability to grow in minimal medium supplemented with xylose or glucose was confirmed. This result is consistent with the removal of plasmids from the cytoplasm. However, still the XylA gene was identified through PCR when using yeast total DNA as template. The retransformation of this curated yeast with the originally constructed plasmids showed that the pattern of improvements observed in the conditioned strains was conserved after re-transformation. The LC7 strain has a great potential for the development of a screening strain for new enzymes of the xylose catabolic pathway.

Financial Support

This work was supported with project grants by CNPq.

References

GONG, C. S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCracken, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 25, n. 1, p. 85-102, 1983.

HECTOR, R. E.; MERTENS, J. A.; BOWMAN, M. J.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A.; HUGHES, S. R. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**, Hoboken, v. 28, n. 9, p. 645-660, 2011.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **IEA Bioenergy Task 39**: commercializing liquid biofuels. Disponível em: <<http://task39.org/about/definitions/>>. Acesso em: 6 mar.2015.

MUMBERG, D.; MULIER, R.; FUNK, M. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 25, p. 5767–5768, 1994.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. de. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, artigo 21, 2014.

SAHA, B. C. **Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology structure and composition of lignocellulosic biomass**. Washington, DC: American Chemical Society, 2004. (ACS Symposium Serie).

Estudo do desenvolvimento meiótico de cromossomos em microsporócitos coletados de inflorescências de *Elaeis oleifera* subamostra coari

Priscila B. Morais^{1*}; Guy de Capdeville¹, Marcelo P. Farias²;
Manoel T. S. Júnior¹; Rosana Falcão¹; André P. Leão¹.

Introdução

A palmeira *Elaeis oleifera*, também conhecida como caiaué, originária das Américas Central e do Sul (PALOMINO; QUERO, 1992) é considerada uma potencial produtora de óleo. Porém, o cultivo em larga escala desta planta ainda não é viável economicamente em razão da baixa produtividade, comparada à palma de óleo (*Elaeis guineensis*). Esta constitui-se, atualmente, uma das principais fontes vegetais de óleo no mundo, com grande importância econômica tanto para a culinária quanto para a produção de biocombustíveis. Apesar da baixa produção, a espécie *E. oleifera* possui características importantes, tais como porte baixo e óleo de melhor qualidade, que podem ser usadas para o melhoramento da palma de óleo, além da resistência às principais doenças, incluindo o amarelecimento fatal e a fusariose, que afetam a produção de *Elaeis guineensis* na América e na África, respectivamente (BERGAMIN et al., 1998). Pouco se sabe sobre a constituição genética do caiaué.

Um primeiro “draft” do genoma do caiaué foi montado por pesquisadores da Embrapa, o qual será utilizado como base para estudos genéticos e citogenéticos em apoio aos programas de melhoramento. A partir do genoma, há a perspectiva de se descobrir informações de características de interesse agrônomo de forma mais rápida sem a necessidade de experimentos em campo, principalmente ao se lançar mão do conhecimento de marcadores moleculares (MORETZSOHN et al., 2002). Uma das principais ferramentas utilizadas para apoiar o melhoramento e os estudos de genômica é o mapeamento físico de genes por meio da técnica de Hibridização In Situ por Fluorescência (FISH).

No presente trabalho, objetivou-se realizar estudos microscópicos para identificar o padrão do desenvolvimento meiótico de cromossomos presentes em microsporócitos desenvolvidos nas inflorescências de *E. oleifera*. Este tipo de estudo se fez necessário para identificar o momento correto para coletar inflorescências de *Elaeis oleifera* onde

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Pioneer, Fator Agrícola Rep Pioneer Sementes, R. Antônio Prado, 1567- Jardim Riva, Primavera do Leste, MT, 78850-000.

*priscila.morais@colaborador.embrapa.br

podem ser encontrados cromossomos em estágio de paquíteno ideais para utilização em experimentos de FISH voltados ao mapeamento físico de genes (CAPDEVILLE et al., 2009). A identificação dos estádios de desenvolvimento dos microsporócitos será útil, também, para identificar o estágio de tétrade para experimentos de cultura de antera.

Métodos

Inflorescências de *Elaeis oleifera*, subamostra Coari, foram coletadas de plantas do banco ativo de germoplasma de caiaué da Embrapa Amazônia Ocidental. Cada inflorescência recebeu uma numeração em função do número atribuído às folhas de acordo com o diagrama da filotaxia da palma de óleo, proposto por Farias (2014). As inflorescências avaliadas foram coletadas a partir da F+13 até a F+22. Imediatamente após a coleta, as inflorescências foram fixadas em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 24h a 4°C e, depois, armazenadas em etanol 70% a 4°C até sua utilização. As ráquias foram medidas e, logo após, as flores foram dissecadas, retirando-se as peças florais e deixando apenas as anteras expostas. As anteras foram lavadas em água destilada autoclavada por 5 minutos e, em seguida, por mais 5 minutos, em tampão MacIlvaine. Após a lavagem, as anteras foram maceradas sobre lâminas de microscopia contendo 20 µL de DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole) na concentração 4µg/mL e visualizadas em microscópio ótico de fluorescência (Carl Zeiss mod. Axiophot Z).

Resultados e Conclusões

A maioria das fases meióticas foram encontradas na inflorescência F14, que possuía 15 cm de comprimento. Do 1° e 2° cm foram encontradas células em estágio de intérfase; do 2° ao 8° cm leptóteno da prófase I; do 8° ao 9° cm zigóteno da prófase I; do 8° ao 13° cm paquíteno da prófase; do 12° ao 13° cm diplóteno da prófase I; do 13° ao 15° cm foi encontrado estágio de tétrade. No 13° cm foi encontrada a maioria das fases da meiose, além das que já foram citadas, também, foram encontradas as fases diacinese, metáfase I, anáfase I, telófase I, díade, prófase II, anáfase II e telófase II. Todas as flores de F13 estavam em estágio de intérfase e a partir da F15 foi encontrado somente o micrósporo maduro (pólen). A partir destes resultados, observou-se que a melhor região da inflorescência para isolar a fase paquítenica encontra-se do 10° ao 11° centímetros. Nesta região encontrou-se o estágio de paquíteno isolado e no momento ideal para ser utilizado no preparo de “spreads” de cromossomos em estudos de mapeamento de genes pela técnica de Hibridização In Situ Fluorescente. A melhor região para selecionar micrósporos em tétrade para cultura de anteras vai do 14° ao 15° centímetros.

Apoio Financeiro

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos – Projeto: “Estratégias Genômicas e Agregação de Valor para a Cadeia Produtiva do Dendê” Convênio - 01.13.0315.00.

Referências

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. F.; BERGER, R. D.; HAU, B. Análise temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 23, n. 3, p. 391-396, 1998.

CAPDEVILLE, G.; SOUZA JÚNIOR, M. T.; SZINAY, D.; DINIZ, L. E. C.; WIJNKER, E.; SWENNEN, R.; KEMA, G. H. J.; JONG, H. D. The potential of high-resolution BAC-FISH in Banana breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v. 166, n. 3, p. 431-443, 2009.

FARIAS, M. P. de. **Caracterização do desenvolvimento floral de *Elaeis oleifera* (H.B.K) Cortés**. 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MORETZSOHN, M. C.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; COELHO, P. J. A.; GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M. E. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon forest. **Euphytica**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 35-45, 2002.

PALOMINO, G.; QUERO, J. H. Karyotype analysis of three species of Sabal, L' (Palmae: Coryphoideae). **Cytologia**, Tokyo, v. 57, n. 4, p. 485-489, 1992.

RESUMOS - DOUTORES

**QUÍMICA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E BIOMASSA
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA MICROBIANA
GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

Molecular characterization and genetic structure of American oil palm (*Elaeis oleifera*) based on genome-wide SNP markers

Valquiria M. Pereira¹²; Jaire A. Ferreira Filho¹²; André P. Leão¹; Eduardo F. Formighieri¹; Manoel T. Souza Junior¹², Sara A. Rios³ and Alexandre A. Alves^{1*}

Background

African oil palm (*Elaeis guineensis*, Jacq.) is by far the most productive oil crop and alone is capable to fulfill the large and growing world demand for vegetable oils that is estimated to reach 240 million tons by 2050 (BARCELOS et al. 2015) . Per hectare of cropland, oil palm plantations give 3–8 times more oil than any other temperate or tropical oil crop. The species is, however, susceptible to a wide range of diseases including bud rot (or fatal yellowing) and basal stem rot caused by *Ganoderma* sp. In African germplasm there are no good sources of natural genetic disease resistance. Also African oil palm trees can reach 15–18 meters in height, making its exploration challenging. Because of that, *Elaeis oleifera*, also known as, American Oil Palm is currently being used as source of variability for disease resistance, plant architecture and oil quality, in the genetic improvement programs of Oil palm (*E. guineensis*). These two species hybridize well producing fertile offspring. Therefore, genetic improvement programs are focusing its effort in generating and evaluating interspecific hybrids. Despite the fact that relatively large germplasm collections have been established (MORETZSOHN et al. 2002) and evaluated for both species, little is known about its population dynamics and patterns of genetic diversity in its natural range of occurrence. Here, we evaluated the genetic diversity patterns and structure of subpopulations of *E. oleifera* in the Amazon River basin.

Methods

To access the natural genetic diversity *Elaeis oleifera* we sampled 552 palms that represent collections made in 19 different sites (presumably populations) within 6 major regions. The number of plants analyzed per population varied between 2 and 140. Total genomic DNA was extracted from freeze-dried adult leaf tissue using a modified CTAB protocol and quantified using NanoDrop[®]. Samples were then genotyped using the DARTSeq

1 Embrapa Agroenergy, PqEB, Av W3 Norte (Final), Brasília- DF, Brazil, 70770-901

2 Plant Biotechnology Graduate Program, Federal University of Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras- MG, Brazil, 37200-000

3 Embrapa Western Amazon, Rodovia AM 10- s/n Km 28, Manaus- AM, Brazil. 69090-000.

valquiria.pereira@colaborador.embrapa.br, alexandre.alonso@embrapa.br

platform. Briefly, genomic DNA of the 5552 plants were sent to Australia in dry ice, and after checks of quantity and quality, it was treated with a combination of restriction enzymes (Res) (a common cut, e.g. *BstNI* and rare cutting, *PstI*) to reduce the complexity of the DNA being sequenced. The reduced complexity of DNA samples was then individually labeled by binding *PstI* adapters containing barcodes specifically designed for each of the 552 plants. The resulting products were amplified by PCR, and subsequently sets of 96 samples were mixed and sequenced together in a lane of Illumina HiSeq 2000 platform (SE 100bp). The *PstI* adapter includes a sequencing primer so that all the generated tags are always read from the *PstI* restriction site. The resulting sequences were filtered and allocated to their respective genotypes based on the barcodes. The sequences were then trimmed at 69 bp (5 bp of the restriction site plus 64 bases with a min Q score of 20). A proprietary pipeline of DArT Pty was used to carry out the score of the presence absence variants (PAV markers). Cases in which the presence or absence of reads of the fragment resulting from restriction enzyme cleavage were not clear (i.e. less than 6x) were recorded as missing data. Reads almost identical (i.e. less than 3 polymorphisms) were combined so that one or more SNPs in the read would not confuse the analysis. In parallel the total sequences generated were used to generate a low-coverage consensus sequence that was used as reference, since by the time the genotyping was carried out no oil palm reference genome was available. The SNP and genotype calling was then performed by aligning reads of 69 bp to the reference consensus sequence, using the bowtie v0.12 software. To characterize the polymorphic sites, we aligned the sequences on which SNPs were discovered, to the public available reference genome (RG) (SINGH et al. 2013) (portioned in 130 5M intervals) using BLASTN. This allowed us to check for genome-wide distribution of the markers, and to assign the SNPs to one of the 16 chromosomes. The molecular data were then used to estimate the allelic frequencies, the heterozygosity, the F statistics, population effective sizes (N_e) and the genetic distance among the subpopulations and among individuals using the PowerMarker v3.25 software. The genetic distance between the individuals was estimated according to the proportion of common alleles and grouping performed using the neighbor-joining method. Population structuration was then evaluated through a bayesian clustering analysis (Structure) and AMOVA. The most probable number of clusters in the Structure analysis was determined by ΔK value.

Results and Conclusions

The genotyping platform provided over 1.500 high-quality SNPs (Call Rate > 0.90; MAF > 0.05). Of these 812 were effectively mapped against the RG with an average of 6.25 SNPs per bin, providing relatively good coverage of all chromosomes. Based on this genome-wide set of SNP markers, we found only moderate genetic diversity (0.301) among the subpopulations. The neighbor joining analysis revealed the existence of 06 (six) major

groups, being the grouping pattern mainly related to the geographical origin of the samples. In general, samples from the same river basin tended to be grouped together, corroborating previous findings of Moretzsohn et al. (2002). This same pattern was also evidenced by PCA analysis. The F index, which measures the inbreeding coefficient, was relatively low for all subpopulations. Conversely, the observed heterozygosity (H_o) was moderate (0.185 on average) which may be indicative that the subpopulations reproduce mainly by crosses between unrelated individuals. The F_{ST} index was, however, high (0.315 on average), demonstrating the existence of structuration, or genetic differentiation among the *E. oleifera* subpopulations. Structure analysis indeed revealed the existence of 02 to 03 major clusters and the AMOVA indicated that only 54% of the molecular variance occurs within populations. This results contrasts with previous findings that were indicative of major contribution of populations to the overall genetic variance. Based on the results reported in here, for *ex situ* conservation, new collections should include as many sites as possible. For breeding purposes, testing of different subpopulations in hybrids crosses should prove to be more effective based on the distribution of SNP variation within and among subpopulations.

Financial Support

This work was supported by PRODENDE and DENDEPALM grants provided by FINEP/MCTI to Embrapa and its partners. VMP and JAF were supported, respectively, with doctoral and masters fellowships provided by CNPq.

References

- BARCELOS, E. et al. Oil palm natural diversity and the potential for yield improvement. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2015.
- MORETZSOHN, M. C. et al. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n.1, p. 35-45, 2002.
- SING, R., et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in old and new worlds. **Nature**, London, v. 500, n. 7462, p. 335-339, 2013.

Development of a protocol for exocellulase activity direct detection in culture medium from metagenomics library clones for a high-throughput screening

Valquíria A. Michalczechen-Lacerda^{1*}, Betúlia de M. Souto¹ and Betania F. Quirino¹

Background

Sugarcane bagasse can be used to produce second-generation ethanol. To make this possible, cellulose needs to be degraded to glucose by three classes of enzymes: endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-cellobiohydrolases and β -glucosidase. Prospecting the Brazilian microbial biodiversity for new enzymes, may lead to the identification of enzymes with high activity on plant biomass (Cunha et al, 2011). However, traditional assays for enzyme detection employs solid media, and among the limitations encountered by this approach are high cost, low sensitivity and incompatibility with quantitative high-throughput screening (HTS) systems (Ko et al, 2013). We aimed to develop a HTS method for exocellulase activity detection directly from culture media from metagenomic clones. Here we report our results using 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) and 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside (MUG) and bacteria grown in LB and TB media.

Methods

To develop the HTS method, bacteria presenting β -glucosidase activity (BGL11) were grown in 15 mL tubes with LB medium and 20 μ g/ mL tetracycline at 180 rpm, 37 °C for 24 hours and was used as a positive control. Bacteria with empty pCF430 vector were used as a negative control. The assay used as substrates pNPG (0, 10, 25, 50, 100, 200 μ M) and MUG (0, 10, 25, 50, 100 μ M). All assays were performed in 96 well plates. Each well had a total volume of 100 μ L, containing the substrate, 90 μ L medium LB or TB, 5 mM potassium phosphate buffer pH 6.0, 0.02% arabinose and 5 μ L of overnight grown strains (methods adapted from Bergmann et al, 2014 and Ko et al, 2013). Plates were then incubated at 37 °C for 24 hours. Cell growth was determined by measuring absorbance at OD 600 nm. The enzymatic reaction containing pNPG was stopped by addition of 100 μ L sodium carbonate buffer 0.5 M pH 6.0, and that containing MUG by adding 100 μ L glycine buffer 0.5M pH 10.3. Exocellulase activity was detected by measuring the release of p-nitrophenol group

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;
*valquiria.lacerda@colaborador.embrapa.br; betania.quirino@embrapa.br

from pNPG with a spectrophotometer at 405 nm, and the release of methylumbelliferyl from MUG, with excitation at 365 nm and emission at 448 nm. All assays were performed in triplicate.

Results and Conclusions

Both strains, the β -glucosidase-activity presenting strain (i.e., BGL11) and the negative control (i.e., EPI 300 strain containing empty pCF430), grew well at the tested conditions. The results for OD 600 measurements for EPI300 pCF430 were 0.18 ± 0.02 in LB medium and 0.39 ± 0.04 in TB medium, while for EPI300 BGL11 these were 0.18 ± 0.03 in LB medium and 0.36 ± 0.07 in TB medium. There were no differences in growth between strains when the same medium was used, but they grew better in a richer nutrient medium (i.e., TB). Detection of enzyme activity in assays using pNPG occurred with 50, 100 and 200 μ M pNPG when LB medium was used, whereas in TB medium detection was only possible with 100 and 200 μ M pNPG. Therefore, the substrate concentrations that allowed detection of enzyme activity were lower in LB medium than in TB medium. For the MUG substrate, detection of enzyme activity occurred at 10, 25, 50 and 100 μ M in LB medium, whereas in TB medium detection of enzyme activity started at 25 μ M. As for pNPG, LB medium allowed detection of enzyme activity with lower concentration of MUG. It is known that assays based on fluorescent substrates are more sensitive than colorimetric assays (Bell et al, 2013). As expected, enzymatic assays with MUG were more sensitive than those with pNPG. Therefore, although the bacterial biomass was higher in TB medium than in LB medium, because the detection of p-nitrophenol and methylumbelliferyl released during enzymatic activity is easier in LB medium, this medium should be preferred. This protocol is compatible with HTS for a fast and qualitative identification of new enzymes with β -glucosidase activity, directly from culture cells of metagenomics libraries.

Financial Support

This work was supported by a grant from BNDES.

References

- BELL, C. W.; et al. High-throughput fluorometric measurement of potential soil extracellular enzyme activities. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, MA, v. 81, e50961, p.1-16, 2013.
- BERGMANN, J. C.; et al. Discovery of two novel β -glucosidases from an Amazon soil metagenomic library. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, MA, v.352, p.147-155, 2014.
- CUNHA, I. S.; et al. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, Los Angeles, CA, v.17, n. 3, p. 118-124, 2011.
- KO, K. C.; et al. Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system. **Journal of Microbiological Methods**, v.94, n. 3, p. 311-316, 2013.

Caracterização química de resíduo de pinus e eucalipto da indústria de papel e celulose

Ana Elisa B. Matias^{1*}, Eveline S. da Costa^{1*}, Raquel B. Campanha, Itânia P. Soares¹ e Silvio V. Junior¹

Introdução

Estudos envolvendo a conversão termoquímica de biomassa lignocelulósica têm se tornado cada vez mais importantes visto que formam produtos de interesse industrial, com uso para biocombustíveis, formação de compostos fenólicos e hidrocarbonetos aromáticos (Yoshikawa et al., 2014). Os recursos lignocelulósicos são compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, além de extrativos e sais inorgânicos.

A lignina é uma macromolécula de estrutura amorfa, complexa, que constitui entre 17 a 33% da madeira. Trata-se de uma ampla fonte de polímeros aromáticos de natureza fenólica, cujos precursores são os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico, distribuídos em diferentes proporções, de acordo com a espécie vegetal (Kirk, Higuchi, Chang, 1981). Na indústria de papel e celulose a lignina é o constituinte indesejável e a sua remoção é a principal etapa na conversão da madeira em polpa. As diferenças estruturais da lignina e o seu teor podem afetar o rendimento da polpação (Campbell e Sederoff, 1996). No entanto, a lignina tem potencial para aproveitamento na formação de produtos de maior valor agregado.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os finos de madeiras de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e de pinus (*Pinus* sp.) de resíduo da indústria de papel e celulose, utilizando métodos clássicos de caracterização de madeiras e seus coprodutos, recomendados pela TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), para aplicações posteriores da lignina.

Metodologia

Os finos de pinus e eucalipto foram cedidos pela empresa Klabin. Foram realizados os seguintes ensaios: finos de pinus e de eucalipto foram triturados em um moinho tipo Wiley, para obtenção de uma granulometria de 40 *mesh*. Os teores de umidade e cinzas foram obtidos pelos métodos recomendados pela TAPPI (TAPPI T210 cm-03 e TAPPI T211 om-02, respectivamente). Para o isolamento da lignina as amostras devem estar livres de extrativos, a fim de se evitar interferência destes materiais orgânicos de baixo peso molecular na determinação do teor de lignina. A norma TAPPI T204 sugere que, para a determinação do

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;
*ana.matias@colaborador.embrapa.br; eveline.costa@colaborador.embrapa.br

teor de extrativos e obtenção de amostras livre de extrativos, sejam empregados solventes tóxicos, como o benzeno e diclorometano. Com a intenção de evitar o uso de tais compostos, dois sistemas de solventes foram avaliados para finos de pinus e quatro sistemas para finos de eucalipto. Os extrativos foram obtidos utilizando um sistema Soxhlet, por 4 horas, empregando-se uma mistura dos solventes etanol:ciclohexano (1:1 v/v) e etanol:tolueno (1:2 v/v), para finos de pinus (TAPPI T204 cm-97 adaptada), além de acetona e um sistema de extrativos totais (soma de três extrações sucessivas: etanol:tolueno (1:2), seguido por etanol, e por água) para finos de eucalipto (TAPPI T280 pm-99). Para determinação do teor de lignina Klason, realizou-se a hidrólise em ácido sulfúrico 72% (m/m) e a fração insolúvel foi filtrada para posterior pesagem (TAPPI T 222 om-22).

Os carboidratos totais (holocelulose) foram determinados por oxidação do material vegetal com cloro em meio ácido, proveniente da reação entre ácido acético e clorito de sódio a quente, por um período total de 5 h, após esse período o meio reacional seguiu para um banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, a holocelulose foi filtrada e seca em estufa a 60 °C por 12h. A holocelulose de eucalipto e pinus foi obtida do material livre de extrativo em etanol:ciclohexano e em etanol:tolueno. As amostras de lignina obtidas foram caracterizadas qualitativamente em um espectrofotômetro de infravermelho (FTIR), modelo Affinity-1 da Shimadzu, utilizando-se uma mistura de 1% da amostra diluída em KBr. Os espectros foram adquiridos a 4 cm⁻¹ de resolução, após o acúmulo de 32 varreduras, abrangendo a região de 4000 a 400 cm⁻¹.

Resultados e Conclusões

Os resultados do teor de umidade e cinzas obtidos para pinus e eucalipto foram, respectivamente: 4,06 ± 0,59%; 0,41 ± 0,04% e 3,43 ± 0,25%; 0,47 ± 0,03%. Esses dados correspondem aqueles encontrados na literatura para a porção inorgânica da madeira, que apresenta um teor de cinzas em torno de 0,5% (FENGEL e WEGENER, 1989). Em relação ao teor de extrativos, os resultados demonstram que a extração com etanol:tolueno (1:2) foi mais eficiente para finos de pinus, com teor de extrativos de 3,6 ± 0,51%, enquanto para finos de eucalipto o sistema de extrativos totais foi o que apresentou os melhores resultados, com teor de 2,73 ± 0,06%, em decorrência, provavelmente, da extração de compostos mais polares. Todavia, os valores de lignina insolúvel e holocelulose obtidos a partir das amostras submetidas a essa extração, não foram maiores do que aqueles encontrados para os outros sistemas testados, com variações de 29,54% a 30,38% de teor de lignina e 71,48% a 79,49% de teor de holocelulose. Os maiores valores de lignina insolúvel e holocelulose foram observados para as amostras extraídas com acetona. No entanto, os teores de lignina insolúvel observados para as amostras extraídas com diferentes solventes não diferem entre si, segundo o teste Turkey (p<0,05). Os espectros de FTIR para as amostras exibem bandas características da região de impressão digital da lignina e confirmam que não houve

uma alteração na composição química das amostras de pinus ou eucalipto em decorrência do tipo de solvente empregado na obtenção de amostras livre de extrativos. Dessa forma, os resultados sugerem que o tipo de solvente empregado na obtenção de amostras livres de extrativos não influencia no teor de lignina obtido, possibilitando o uso de acetona como solvente para estas determinações. Em etapas posteriores serão realizadas análises complementares de caracterização, como determinação de celulose, hemicelulose e ácidos orgânicos.

Apoio Financeiro

Esse trabalho foi financiado pelo BNDES/Rhodia.

Referências

CAMPEBELL, M. M.; SEDEROFF, R. R. Variation in Lignin Content and Composition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p.3-13, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood – chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

KIRK, T. P.; HIGUCHI, T.; CHANG, H. **Lignin biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potencial Applications**, v. 1. 1981. 154 p.

YOSHIKAWA, T. et al. Production of phenols from lignin-derived slurry liquid using iron oxide catalyst. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 146, p. 289-297, 2014.

Qualidade de extrato de carotenoides obtido a partir das fibras da prensagem de dendê híbrido BRS-Manicoré (*Elaeis spp.*) com dióxido de carbono supercrítico

Paula A. O. Carmona¹, Gislaïne Ghiselli², Marcos E. C. Oliveira², Luiz F. de França³; Simone Mendonça^{1*}.

Introdução

O Brasil é o décimo produtor mundial de óleo de palma, com produção anual em 2013 de 340.000 t. Essa quantia é insignificante se comparada com a cifra do maior produtor mundial, a Indonésia, que no mesmo ano produziu 26.895.500 t. Entretanto, a produção encontra-se em constante crescimento, atingindo um aumento de cerca de 250% com relação às últimas décadas (FAOSTAT, 2013). Apesar de o óleo ser o principal produto da prensagem do mesocarpo do fruto de dendê, durante sua produção são gerados resíduos que podem ser utilizados para a obtenção de produtos de maior valor agregado. Dentre esses resíduos destacam-se as fibras, pois são gerados 120 kg para cada tonelada de cachos processada, que contém mais de 5% do óleo original, o qual é rico em carotenoides.

Os carotenoides são compostos bioativos reconhecidos por sua alta capacidade antioxidante e alguns são precursores da vitamina A. São utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global com cifras de bilhões de dólares. A tecnologia supercrítica constitui uma alternativa importante em termos de impacto ambiental, pois elimina a necessidade de uso de solventes orgânicos e aumenta a eficiência da extração dos componentes apolares. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram (i) produzir um extrato apolar (óleo) das fibras prensadas de dendê com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico, e (ii) caracterizar o óleo quanto aos índices de acidez e de peróxidos e teor de carotenoides totais.

Métodos

A matéria-prima utilizada foi o resíduo da prensagem industrial do mesocarpo de dendê da variedade BRS-Manicoré obtido na indústria Denpasa. As fibras foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C, reduzindo-se o teor de água de 27,6 para 13,05%. O material resultante foi armazenado em freezer e utilizado em porções durante as sucessivas extrações. A unidade de extração supercrítica, lotada na Universidade Federal do Pará, é

1 Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901;

2 Embrapa Amazônia Oriental, Travessa Dr. Eneas Pinheiro, Marco- Belem/PA, Brasil, 66095-100; 3Universidade Federal do Pará, ITEC, Fac. de Eng. de Alimentos, Av. Augusto Corrêa, 01, Guamá- Belem/PA, Brasil, 66075-900; *simone.mendonca@embrapa.br

dotada de um extrator de 2,5 L, com camisa de aquecimento e capacidade para trabalhar em condições operacionais máximas de 35 MPa e 80 °C. Antes da extração, cada porção de fibras foi seca até cerca de 8% de umidade; pesaram-se 700 g e realizou-se a extração do óleo residual a 25 MPa e 50 °C, utilizando CO₂ como fluido de trabalho, a uma vazão de 20 L/min. O óleo obtido foi armazenado a 5 °C até posteriores análises, realizadas na Embrapa Agroenergia. Utilizou-se como referência uma técnica de extração de óleo em aparelho Soxhlet, empregando éter de petróleo. O óleo extraído com CO₂ supercrítico foi analisado quanto ao teor de ácidos graxos livres e índice peróxidos, determinados pelos métodos AOCS Cd 3d-63 e Cd 8-53 (2007), respectivamente. O teor de carotenoides totais, no óleo extraído pelas duas técnicas, foi quantificado pelo método padrão AOAC 941.15 (2012).

Resultados e Conclusões

Dado que o processo de obtenção do óleo durou em torno de dois meses, pois o mesmo foi resultado de várias extrações, sua qualidade foi avaliada no início e após a finalização de todas as extrações. Para o óleo oriundo das primeiras extrações, o teor de ácidos graxos livres (0,59 mg KOH/g) ficou dentro do limite estabelecido pela Resolução RDC nº 270 (ANVISA, 2005), cujo valor máximo permitido é de 10,0 mg KOH/g. Contudo, após o término do ciclo de extrações, esse valor apresentou um ligeiro incremento (13,38 mg KOH/g), ultrapassando o limite admitido pela legislação. Tal resultado poderia indicar uma alteração hidrolítica enzimática na própria matéria prima (fibras), pois a mesma foi armazenada em freezer.

Há relatos na literatura científica de que a lipase é ativada pelo frio, uma vez que baixas temperaturas de armazenamento ocasionam danos nos tecidos do mesocarpo devido à ruptura dos oleossomas, que libertam as enzimas ligadas à membrana e aumentam a disponibilidade de triacilgliceróis (substrato) armazenados nessas organelas. Outra hipótese é que possam ter ocorrido reações de hidrólise não-enzimática, decorrentes da umidade e do calor associados.

Ácidos graxos livres são mais suscetíveis à oxidação, que gera rancidez indesejada no produto e pode também afetar o estado oxidativo dos carotenoides presentes. Por isto, foi empregado o método do índice de peróxidos, que detecta compostos formados na primeira fase das reações oxidativas. O valor observado (1,60 meq/kg) encontra-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação para óleos brutos (máximo 15 meq/kg), indicando boa estabilidade oxidativa. Cabe destacar que o óleo de palma bruto é boa fonte de antioxidantes naturais, como os carotenoides e a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), os quais atuam inibindo ou retardando o processo de peroxidação lipídica sobre os ácidos graxos insaturados, conferindo-lhe maior estabilidade oxidativa. O óleo obtido com fluido supercrítico apresentou um teor de carotenoides totais de 5.797 ppm, valor semelhante à concentração observada no óleo extraído por solvente em Soxhlet (5.566 ppm). No entanto,

após o período de armazenamento, até o término de todos os ciclos de extrações, o teor de carotenoides mostrou um decréscimo de 20,51% (4.608 ppm); perda que pode ser atribuída à alta reatividade dessas moléculas a fatores pró-oxidantes, tais como o oxigênio, a umidade, a luz e o calor, os quais podem provocar reações de isomerização e oxidação.

Em conclusão, foi possível obter um óleo rico em carotenoides a partir da extração, com CO₂ supercrítico, das fibras prensadas de dendê. Em estudos futuros, a microencapsulação será empregada como uma alternativa para proteger esses compostos contra danos oxidativos e aumentar a vida-de-prateleira do óleo e os carotenoides nele dissolvidos. Adicionalmente, as fibras devem ser processadas na maior brevidade possível para reduzir as alterações hidrolíticas dos triacilgliceróis pela ação das lipases e/ou calor/umidade.

Apoio Financeiro

FINEP – Projeto DendePalm.

Referências

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 19th ed., Gaithersburg, 2012.

FAOSTAT. **Dirección de estadística**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 16 jul. 2015.

Embrapa
Agroenergia

Apoio



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA